

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMPRAPE MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**Ferramentas moleculares para a caracterização de *Colletotrichum*  
spp. associados à antracnose da mandioca**

**LEANDRO LOPES DA SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JULHO – 2016**

**Ferramentas moleculares para a caracterização de *Colletotrichum*  
spp. associados à antracnose da mandioca**

**LEANDRO LOPES DA SILVA**

Engenheiro Agrônomo

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Saulo Alves S. de Oliveira

Co-orientador: Dr. Carlos Augusto D. Bragança

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO – 2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586f	<p>Silva, Leandro Lopes da. Ferramentas moleculares para a caracterização de <i>Colletotrichum</i> spp. associados à antracnose da mandioca / Leandro Lopes da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2016. 93f.; il.</p> <p>Orientador: Saulo Alves Santos de Oliveira</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Mandioca – Doenças e pragas. 2.Mandioca Fitopatologia. 3.Antracnose – Controle – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 632.4</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
LEANDRO LOPES DA SILVA**

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)

Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dr. Aristóteles Pires de Matos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em\_\_\_\_\_.”

A minha mãe, Maria Lucília, por ser meu  
alicerce e sempre me incentivar.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência.

Aos meus pais, Lucília e Manoel, e irmãs, Lucineide e Lucileide, pelo apoio, afeto e por sempre acreditarem em mim, eles são e serão os mais importantes sempre;

A minha família, que por mesmo estando longe sempre tem me dado apoio;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade do curso e a todos os professores pelos conhecimentos transmitidos;

A Embrapa Mandioca e Fruticultura pela estrutura na qual pude realizar os trabalhos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Dr. Saulo Oliveira pela orientação e disponibilidade;

Ao Dr. Carlos Bragança pela co-orientação e por toda contribuição;

A todos do laboratório de Fitopatologia, onde realizei maior parte dos trabalhos, e do laboratório de Biologia Molecular.

A família mandioca (Camila, Daniela, Juliana, Luiz, Mariana, Thiago) pela convivência diária, amizade, conversas e distração;

Aos amigos da Microbiologia Agrícola, em especial a Grazielle, Josélia, Marcellly, Noely e Valdenia pelo afeto, companheirismo e troca de conhecimentos;

Aos amigos que fiz em outros programas de pós-graduação e graduação da UFRB e UFBA, em especial a Aldo, Amanda, Erivelton, Fábio, Gabriel, Nathan, Paulo Henrique, Paulo Pedroso e Rafael;

Enfim... a todos que de alguma forma contribuíram nessa etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO .....	12
CAPÍTULO 1 - Revisão de Literatura .....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
A cultura da mandioca.....	17
Antracnose.....	18
Taxonomia de <i>Colletotrichum</i> .....	19
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2- BOX e ERIC-PCR na diferenciação de linhagens filogenéticas e espécies do complexo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> associadas a antracnose da mandioca. ....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAL E MÉTODOS .....	35
Obtenção dos isolados.....	35
Extração de DNA .....	36
Amplificação e análises filogenéticas .....	36
Amplificação de sequências BOX e ERIC .....	42
Análise de dados.....	42
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÃO .....	54
AGRADECIMENTOS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO 3- Diferenciação de linhagens filogenéticas do complexo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> associados a antracnose da mandioca com base no PCR-RFLP do gene da Calmodulina (CAL).....	58

<b>RESUMO.....</b>	<b>59</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>60</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
<b>Obtenção dos isolados.....</b>	<b>62</b>
<b>Extração de DNA.....</b>	<b>62</b>
<b>Análise RFLP <i>in silico</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>PCR-RFLP.....</b>	<b>67</b>
<b>Análise de dados.....</b>	<b>67</b>
<b>Validação de árvore “híbrida”.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>AGRADECIMENTO.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>



## RESUMO

### **SILVA, L. L. Ferramentas moleculares para a caracterização de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da mandioca**

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* é uma importante doença em diversas culturas, dentre elas a mandioca. Devido a dificuldade de identificação do patógeno por meio de características morfológicas, métodos moleculares vêm sendo utilizados no auxílio de diferenciação e identificação do patógeno. O presente estudo teve por objetivo testar métodos moleculares na diferenciação de linhagens filogenéticas de *C. gloeosporioides sensu lato* que possam ser utilizados para o direcionamento do sequenciamento. Desta forma, materiais vegetais que apresentavam sintomas da doença foram coletados em 17 cidades pertencentes ao Recôncavo da Bahia para a realização do isolamento e obtenção de culturas monospóricas do patógeno. Folhas sadias de mandioca foram utilizadas para a inoculação do patógeno e teste de patogenicidade. Duas estratégias foram utilizadas, sendo a primeira o agrupamento dos isolados por meio de regiões repetitivas BOX e ERIC; e segunda técnicas baseadas em PCR-RFLP realizadas *in silico* e *in gel*. Para a análise das regiões repetitivas, os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 1,5%, seguido de análise das bandas apresentadas. Para a análise dos dados, os padrões de bandas apresentados nos géis foram convertidos em matrizes sendo '0' ausência da banda e '1' presença. As matrizes binárias obtidas foram utilizadas para estimativa de distância genética e construção de dendrogramas. Enquanto que para a técnica de PCR-RFLP, análises *in silico* foram realizadas para a determinação das regiões gênicas de maior potencial de separação das linhagens filogenéticas do complexo, bem como as melhores combinações de enzimas de restrição a serem utilizadas. Após a escolha da região, foram realizados ensaios *in gel* (amplificação por PCR e digestão com enzimas de restrição). Os produtos da clivagem foram observados em gel de agarose 2%. Para as regiões repetitivas, o BOX-PCR apresentou um baixo polimorfismo para os isolados testados, enquanto que a amplificação baseada em ERIC-PCR apresentou um maior grau de polimorfismo, e permitiu um melhor agrupamento de indivíduos e separação de algumas linhagens filogenéticas dentro

do complexo *C. gloeosporioides*. O uso conjunto de dados do BOX e ERIC-PCR diminuiu a capacidade discriminatória apresentada somente por ERIC. Em relação à técnica de PCR-RFLP, a combinação (região de interesse + enzima de restrição) que apresentou maior potencial discriminatório das linhagens filogenéticas foi a Calmodulina (CAL), nas análises *in silico*. Sendo que as enzimas que apresentaram melhor resultado foram AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI. A validação destas análises *in gel* permitiu observar os mesmos padrões esperados das análises *in silico*, inclusive, possibilitando a utilização de dados “híbridos”, ou seja, estimativa da provável linhagem filogenética dos indivíduos com base no padrão esperado para cada uma das espécies do complexo *C. gloeosporioides* gerados nas análises *in silico*, comparando-os com os padrões de banda obtidos nas análises *in gel*. A utilização de ERIC-PCR e CAL PCR-RFLP na diferenciação de linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* mostrou-se eficiente na diferenciação de espécimes, podendo ser utilizada como ferramentas de auxílio na identificação e direcionamento do sequenciamento.

Palavras-chave: rep-PCR; CAL PCR-RFLP; Complexo de espécies; *Manihot esculenta* Crantz.

## ABSTRACT

**SILVA, L. L. Molecular tools for the characterization of *Colletotrichum* spp. associated with cassava anthracnose disease.**

Anthrachnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* is an important disease in different cultures, among them cassava. Because the pathogen identification difficulty through morphological characteristics, molecular methods have been used in supporting differentiation and identification of the pathogen. This study was conducted in order to test methods of molecular species differentiation of *C. gloeosporioides sensu lato* which can be used which can be used prior to sequencing. Plant material with symptoms of the disease were collected in 17 cities belonging to the Recôncavo da Bahia to perform the isolation and obtaining monosporic cultures of the pathogen. Healthy detached cassava leaves were used for inoculation of the pathogen and pathogenicity testing. Two strategies were used, the first based on the grouping of isolated by the repetitive regions BOX and ERIC; and second techniques based on PCR-RFLP performed *in silico* and *in gel*. For the analysis of repetitive regions, PCR products were run on 1.5% agarose gel, followed by evaluation of the bands for each isolate. For data analysis, the band patterns shown in the gels have been converted into a matrix with '0' the absence of the band and '1' presence. The obtained binary matrices were used to estimate genetic distance and to build the dendrograms. Regarding to PCR-RFLP, *in silico* analyzes were performed for determination of gene regions of greatest potential for separation of species of the complex as well as the best combinations of restriction enzymes to be used. After selecting the region in gel assays were performed (amplified by PCR and digestion with restriction enzymes). The cleavage products were observed in 2% agarose gel. For repetitives regions, the BOX-PCR showed a low polymorphism for the isolate tested, whereas the amplification based on ERIC-CRP showed a greater degree of polymorphism, and allowed a better grouping individuals and separation of some lineages within *C. gloeosporioides* complex. The combined use of data BOX and ERIC-PCR reduced the discriminatory capacity presented only by ERIC. In relation to PCR-RFLP technique, the combination (region of interest + restriction

enzyme) that showed the highest potential discriminatory phylogenetic lineages was Calmodulin (CAL), in the *in silico* analysis. Given that the enzymes that showed better results were AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI and TaqI. The validation of these analyzes *in gel* allowed to observe the same expected patterns of *in silico* analysis, including allowing the use of data "hybrid", ie, estimation of probable lineage phylogenetic of individuals based on the expected pattern for each species of the *C. gloeosporioides* complex generated by *in silico* analysis, comparing them with the band patterns obtained in the *in gel* analysis. The use of ERIC-PCR and PCR-RFLP CAL was effective in differentiating phylogenetic lineages belonging to the *C. gloeosporioides* complex and can be used as a tool in identifying and alternative to sequencing.

Keywords: Rep-PCR; CAL PCR-RFLP; Species complex; *Manihot esculenta* Crantz.

## INTRODUÇÃO

A mandioca representa uma importante cultura nos países em desenvolvimento, especialmente nos trópicos, por ser uma das principais fontes de carboidratos para a população dessas regiões. Grande parte da produção mundial é realizada por pequenos agricultores e utilizada principalmente para o consumo humano. Além disso, a mandioca também pode servir tanto para a alimentação animal, quanto como fonte de matéria prima para indústrias (EL-SHARKAWY, 2004).

A mandioca é uma cultura considerada rústica que mostra bom desenvolvimento em condições limitantes, no entanto, existem fatores que podem limitar a sua produtividade. As doenças causadas por fungos estão entre esses fatores que afetam a cultura de maneira significativa. A antracnose é uma das doenças que afetam a mandioca e que em muitos países é considerada umas das principais doenças relacionadas com essa cultura (PINWEHA et al., 2015).

A antracnose é uma doença causada principalmente por fungos do gênero *Colletotrichum*, que são conhecidos por ocasionar perdas em diversas culturas ao redor do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Essa doença atinge a parte aérea das plantas, com sintomas e sinais nas folhas, caule, flores e frutos (HYDE et al, 2009a; 2009b). A antracnose da mandioca é causada por *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, e pode afetar a cultura em qualquer fase do seu desenvolvimento (KUNKEAW et al., 2010). Esse mesmo patógeno também é relatado com uma ampla gama de hospedeiros (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

A identificação do agente causal da doença era feita principalmente através de caracteres morfológicos e culturais, juntamente com o hospedeiro (SCHENA et al., 2013). Entretanto, a similaridade encontrada nos caracteres utilizados para a diferenciação do patógeno apresenta-se como fator limitante para a distinção adequada (HYDE et al., 2009a). Devido a isso, o uso de ferramentas moleculares vem ganhando popularidade e mostrando-se extremamente útil como um auxílio para a diferenciação de fungos fitopatogênicos (CAI et al., 2011; SILVA-MANN et al., 2002).

Estudos sobre o gênero *Colletotrichum* utilizando filogenia de mais de um gene têm revelado numerosas espécies morfológicamente indistinguíveis agrupadas em complexos (CROUCH, 2014), que podem variar desde virulência até resistência a determinados fungicidas (LIMA et al., 2015). *C. gloeosporioides* (*sensu lato*) é um representante do gênero que possui diversas espécies agrupadas em um complexo e que a identificação precisa torna-se possível através da análise de múltiplas sequências (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Recentemente, outras espécies do gênero *Colletotrichum* foram descritas associadas à mandioca cultivada e espécies silvestres do gênero *Manihot* no Brasil, sendo *C. tropicale* e *C. fructicola* (BRAGANÇA et al., 2016a; OLIVEIRA; BRAGANÇA; SILVA, 2016).

Técnicas como RAPD, RFLP, PCR-RFLP, rep-PCR que mostram o polimorfismo apresentado pelos indivíduos quando analisado os perfis de bandas, são bastante utilizados para diferenciação de isolados e algumas espécies de fungos (KELEMU et al., 1999; MAHARAJ; RAMPERSAD, 2012; SUZUKI et al., 2010). E vem sendo utilizado na tentativa de diferenciar as espécies existentes dentro de *C. gloeosporioides*.

Uma vez que essas espécies crípticas apresentam respostas diferentes as medidas de controle que possam ser empregadas, os programas de melhoramento genético de plantas devem considerar a diversidade de patógenos existentes na busca por variedades vegetais resistentes (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015).

Sendo assim a determinação da diversidade de espécies presentes em *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* associados à antracnose da mandioca, mostra-se necessária para uma melhor compreensão do agente causal da doença e das medidas de controle que possam ser utilizadas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi de avaliar diferentes técnicas de biologia molecular capazes de diferenciar espécies/linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides* associados à antracnose da mandioca, a fim de permitir o melhor aproveitamento de recursos financeiros, direcionamento do sequenciamento e para identificação polifásica, bem como, gerar subsídios para a seleção de plantas resistentes à antracnose, por meio da seleção de isolados representativos.

---

**CAPÍTULO 1**  
**Revisão de literatura**

---

## RESUMO

A mandioca é comumente utilizada tanto na alimentação humana quanto animal devido à presença de amido nas suas raízes tuberosas, que é uma importante fonte de energia. O Brasil é maior produtor de mandioca das Américas, sendo ela cultivada em todos os seus estados. Vários fatores podem contribuir para o decréscimo da produção da mandioca, dentre estes as doenças ocasionadas por fungos. A antracnose na mandioca é uma doença causada por espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* que são responsáveis por afetar diversas culturas ao redor do mundo. *C. gloeosporioides sensu lato* é conhecido por possuir uma ampla gama de hospedeiros, sendo também o responsável por ocasionar antracnose na mandioca. Para espécies de *Colletotrichum* muitas vezes a identificação do patógeno é problemática devido à falta de características de significância taxonômica, o que torna confuso o limite de espécie. Análises filogenéticas baseadas em múltiplos genes são indicadas para uma correta identificação de espécies pertencentes a esse gênero, entretanto estas técnicas apresentam custo elevado e demandam tempo. Algumas técnicas moleculares têm sido usadas para a discriminação entre as espécies e/ou linhagens filogenéticas do gênero, como um direcionamento do sequenciamento por apresentarem baixo custo e eficiência na utilização, podendo ser utilizadas para auxiliar na identificação.

Palavras-chave: Sistemática; Complexo de espécies; Taxonomia polifásica.



## ABSTRACT

Cassava is commonly used both in human and animal nutrition due to the presence of starch in their tuberous roots is an important source of energy. Brazil is the largest producer of cassava in the American continent; it is cultivated in all Brazilian states. Several factors may contribute to the decrease of yield of cassava, among these diseases caused by fungi. Anthracnose is a disease caused by species belonging to the genus *Colletotrichum* that are responsible for affecting different crops worldwide. *C. gloeosporioides sensu lato* is known to have a wide host range, and is also responsible for causing anthracnose in cassava. For *Colletotrichum* species often the identification of the pathogen is difficult due to lack of taxonomic significance characteristics, which makes it confusing regarding the limits of each species. Phylogenetic analyzes based on multiple genes are indicated for a correct identification of species belonging to this genus; however these techniques have a high cost and time required. Some molecular techniques have been used to discriminate between species and/or phylogenetic lineages within genus, as an alternative to sequencing by their low cost and efficient use and can be used to assist in identification.

Keywords: Systematics; Species complex; Polyphasic taxonomy.

## A cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz; Euphorbiaceae) é uma espécie nativa do Brasil, pertencente ao gênero *Manihot* que possui mais de 200 espécies, é importante tanto do ponto social quanto econômico (PINHO et al., 2004). A mandioca, assim como o milho e arroz constitui uma das mais importantes fontes de energia na dieta humana de muitos países tropicais, é produzida principalmente por pequenos agricultores, praticamente sem utilização de insumos, em virtude de sua notável tolerância a estresses abióticos (EL-SHARKAWY, 2004).

As raízes ricas em amido, uma valiosa fonte de energia, podem ser usadas tanto na alimentação humana quanto como base para a alimentação de animais (CEBALLOS et al., 2004). A mandioca também é usada como matéria-prima no processamento de têxteis, papel, adesivo e na indústria de petróleo, assim como para produtos derivados de açúcar, como manitol, glicoses e maltodextrinas (NASSAR; ORTIZ, 2007).

A maior parte da produção de mandioca no mundo concentra-se em três regiões; África Ocidental e adjacência da bacia do Congo, América do Sul e sudeste da Ásia (NASSAR, 2001). O Brasil é maior produtor de mandioca das Américas e está entre os cinco maiores produtores do mundo. A Nigéria é o principal produtor com mais de 54 milhões de toneladas e o Brasil com mais de 23 milhões de toneladas ocupa o quarto lugar no ranking do ano de 2014 (FAOSTAT, 2014). A mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, sendo os principais produtores do país o Pará, Paraná, Bahia, Maranhão, São Paulo e Acre, respectivamente, que responderam por mais de 65% da produção nacional de 2014 (IBGE, 2014).

Vários fatores podem contribuir para um decréscimo na produtividade da mandioca, dentre estes as doenças causadas por fungos, pois ocorrem desde a obtenção das manivas para o plantio até a pós-colheita (MORAIS et al., 2014). Entre as doenças fúngicas que podem afetar a produtividade da mandioca, estão as manchas foliares causadas por espécies do gênero *Passalora* spp. (WYDRA; VERDIER, 2002), superalongamento induzido por *Sphaceloma manihoticola*, ferrugem causada por *Uromyces* spp., antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (MORAIS et al., 2013) e doenças

radiculares causadas por espécies dos gêneros *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium* e *Fusarium* (CEBALLOS et al., 2004; MACHADO et al., 2014).

### **Antracnose**

O gênero *Colletotrichum* é responsável por causar antracnose em uma gama de culturas ao redor do mundo, sendo um patógeno importante tanto em pré-colheita quanto em pós-colheita (CAI et al., 2011). A doença além de afetar ramos, folhas e frutos, em qualquer fase do desenvolvimento, provoca lesões que favorecem a colonização por fungos oportunistas, que contribuem para a redução da produtividade (KAMEI et al., 2014).

Casos de várias espécies de *Colletotrichum* associadas a um único hospedeiro foram relatados, assim como uma única espécie de *Colletotrichum* infectando vários hospedeiros (BRAGANÇA et al., 2016b; LIMA et al., 2013; SCHENA et al., 2013; SILVA; MCHEREFF, 2013; TALHINHAS et al., 2015).

A antracnose da mandioca causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (sensu lato), é uma das principais doenças da mandioca (PINWEHA et al., 2015), e ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil, porém com maior intensidade no Nordeste e no Sudeste. Quando as condições climáticas são favoráveis ao fungo, as perdas da cultura são mais significativas (SILVA; ANDRADE, 2011), tornando a doença um obstáculo para a produção (FOKUNANG et al., 2000).

Os sintomas típicos de antracnose na mandioca são os cancrios encontrados no caule e no pecíolo, que são lesões com coloração de marrom clara a escura de formato irregular, podendo ser profundas. A desfolha pode ocorrer devido às lesões presentes na haste ocasionando a morte da planta (PERUCH et al., 2013). Os sintomas encontrados nas folhas incluem de pequenas a médias lesões necróticas, podendo ser regulares ou irregulares (WILLIAM; MBEGA; MABAGALA, 2012). O aparecimento da doença e os sintomas apresentados dependem da variedade de mandioca (FOKUNANG et al., 2002).

### **Taxonomia de *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella*) pertence à família Melanconiaceae, possui espécies encontradas em forma fitopatogênicas, responsáveis por doenças economicamente importantes e com extensa gama de hospedeiros. O gênero também possui representantes saprofíticos, endofíticos (GAUTAM; 2014) e até patogênicos a humanos (CANO; GUARRO; GENE, 2004).

Muitas espécies de *Colletotrichum*, assim como de vários outros gêneros de fungos fitopatogênicos, haviam sido nomeadas com base na associação com o hospedeiro, o que sugeria a especificidade entre o fitopatógeno e o hospedeiro. O número de espécies do gênero foi aumentando gradualmente, após a realização de estudos sobre morfologia, patogenicidade e características culturais (CAI et al., 2011).

Características como morfologia de conídios, taxa de crescimento, coloração de colônia, produção de pigmentos, presença de setas e do teleomorfo, têm sido usadas para a diferenciação dentro do gênero (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Porém, a similaridade fenotípica encontrada entre as diferentes espécies de *Colletotrichum* pode gerar dificuldades na identificação (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Para diminuir esse problema, a aplicação de outros métodos que possibilitem elucidar a estrutura da população e uma correta diferenciação de espécies devem ser utilizados (MENEZES, 2006).

A identificação de fungos basicamente através de características fenotípicas sem suporte molecular tem se mostrado insuficiente, já que as características morfológicas e culturais podem mudar ou serem perdidas, sob diferentes condições de crescimento, repetidas repicagens (SCHENA et al., 2013), ou serem influenciadas por fatores ambientais (PHOTITA et al., 2005).

Considerando as dificuldades que podem ocorrer no processo de identificação de espécies de *Colletotrichum*, abordagens que utilizam critérios polifásicos para a taxonomia, combinando características fenotípicas, culturais

patogênicas com dados moleculares têm sido usadas com o objetivo de fornecer uma melhor discriminação.

Considerando as dificuldades que podem ocorrer no processo de identificação de espécies de *Colletotrichum*, várias técnicas moleculares têm sido usadas com o objetivo de fornecer uma melhor discriminação (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PHOTITA et al., 2005; RAMPERSAD et al., 2014; SILVA et al., 2011).

Técnicas baseadas em regiões repetitivas do genoma conhecidas como rep-PCR, que aborda as técnicas BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR, primeiramente utilizadas para avaliar a diversidade genética existente entre procariotos (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995; VERSALOVIC et al., 1994), quando utilizadas para fungos mostraram-se úteis no agrupamento e diferenciação de isolados baseadas no perfil de bandas apresentado por cada indivíduo (JEDRYCZKA; ROUXEL; BALESSENT, 1999). Essas técnicas foram utilizadas com sucesso na diferenciação de isolados de *Colletotrichum* (BARDAS; KOUTITA; TZAVELLA-KLONARI, 2009; SUZUKI et al., 2010) e espécies de Botryosphaeriaceae (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014).

A existência de sequências de oligonucleotídeos específicos e o uso em conjunto com a técnica RFLP tem se tornado uma ferramenta eficiente no auxílio de identificação em diversas espécies de fungos. Baseando-se no perfil de bandas apresentados para cada indivíduo após a clivagem do fragmento amplificado com enzimas específicas, os isolados podem ser comparados e analisados quanto a sua similaridade (BALINI et al., 2015; GONZÁLEZ; SUTTON; CORRELL, 2006; MAHARAJ; RAMPERSAD, 2012).

Baseando-se no polimorfismo existente entre indivíduos relacionados, as técnicas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) começaram a ser utilizadas na tentativa de diferenciar espécies e isolados de *Colletotrichum* com base no perfil de bandas apresentado pelos indivíduos. O uso dessas técnicas permitiu a separação de isolados oriundos de culturas distintas, separação de espécies diferentes causando doença em um mesmo hospedeiro, além de relacionar alguns isolados com a origem geográfica dos mesmos (LIU et al., 2012; SERRA et al., 2006; SILVA-MANN et al., 2002; SREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992). Quando utilizadas em *C. gloeosporioides*, ambas as técnicas sugerem

haver grande variabilidade genética entre isolados pertencentes a essa espécie (KELEMU et al., 1999; ROJAS-MARTÍNEZ; ZAVALA-MEJÍA; NIETO-ÁNGEL, 2008; TAVERA et al., 2010).

Além disso, o uso de *primers* taxon-específicos como CgInt/TS4 específico para *C. gloeosporioides* e Calnt2/TS4 específico para *C. acutatum*, usados para amplificação da região ITS também possibilita a identificação de isolados de *Colletotrichum* apenas com a amplificação da região escolhida (CHOWDAPPA et al., 2012; SERRA et al., 2011a, 2011b).

Entre os métodos mais precisos de identificação, está o sequenciamento de regiões no genoma do indivíduo de interesse. A região ITS é indicada como *barcode* universal para a identificação de fungos é constantemente utilizada por diversos autores (SCHOCH et al., 2012). O produto da amplificação da região ITS1 e posterior sequenciamento, auxiliou na diferenciação de espécies de *Colletotrichum* (KAMEI et al., 2014; PHOTITA et al., 2005).

No entanto o uso somente da região ITS para discriminar espécies muito próximas como ocorre no complexo *C. gloeosporioides* deve ser evitado, devido a existência de uma baixa variação entre os nucleotídeos dessa região em algumas espécies desse gênero (CANNON et al., 2012; PHOTITA et al., 2005). Além do que, diversas sequências de ITS presentes no GenBank podem estar relacionadas incorretamente com as espécies de *Colletotrichum* (CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009).

Com a finalidade de uma melhor identificação, a análise filogenética baseada na combinação de genes vem sendo utilizada com frequência nos últimos anos (CANNON et al., 2012). Com isso, foi revelado que muitas espécies tradicionalmente aceitas, na verdade, representam complexos de espécies (HYDE, 2010). Para esse tipo de análise, é recomendado o uso de mais de um gene como  $\beta$ -tubulina (TUB2), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS), actina (ACT) e outros (CAI et al., 2009), que tem contribuído para a identificação e gerado inúmeras informações sobre as relações filogenéticas de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* agrupadas em complexos (DAMM et al., 2012a, 2012b; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Com a utilização de sequências obtidas de oito genes, actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

(GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS), glutamina sintetase (GS) e manganês superóxido dismutase (SOD2) foi possível a identificação de 22 espécies incluídas no complexo *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

O reconhecimento de espécies utilizando múltiplos genes vem ocorrendo constantemente para indivíduos do gênero *Colletotrichum* relacionados a diversas espécies vegetais. Além disso, novas espécies de *Colletotrichum* relacionadas com a mesma espécie vegetal também vêm sendo descritas (CROUCH et al., 2009a, 2009b; DAMM et al., 2012a, 2012b; MANAMGODA et al., 2013; PRIHASTUTI et al., 2009; ROJAS et al., 2010; TAO et al., 2013; VIEIRA et al., 2014; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; YANG et al., 2012;). No entanto, pouco se sabia sobre a presença de outras espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, ou mesmo outras espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* patogênicos à mandioca (FOKUNANG et al., 2000).

O uso de filogenia na identificação de espécies permite uma maior confiabilidade, no entanto o sequenciamento ainda apresenta um elevado custo. Outras técnicas moleculares, que visam a diferenciação de espécies, como rep-PCR, PCR-RFLP podem ser uma alternativa inicial ao sequenciamento quando se trabalha com um grande número de isolados. Por serem mais fáceis de obter resultados, apresentarem custo menor e por permitirem uma caracterização rápida do patógeno (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; RAMDEEN; RAMPERSAD, 2013).

O manejo da antracnose é um problema sério, devido tanto à ampla gama de hospedeiros susceptíveis (LIMA et al., 2015), quanto à diversidade da virulência entre diferentes espécies de *Colletotrichum* (TALHINHAS et al., 2015). Compreender a diversidade de patógenos, a interação patógeno-hospedeiro e outras informações associadas com estas espécies recém-reconhecidas certamente contribuirão nas decisões sobre as medidas adequadas para o controle da doença (CAI et al., 2011; TALHINHAS et al., 2015).

O estudo comparativo das espécies de *Colletotrichum* fornece informações importantes para o desenvolvimento de estratégias para manejo da antracnose, como o uso de cultivares com níveis elevados de resistência às diferentes espécies desse gênero de fitopatógenos (LIMA et al., 2015). Obter

novas cultivares com base em sua produtividade e resistência a doenças é um dos objetivos do melhoramento convencional da mandioca (NASSAR; ORTIZ, 2007), procurando diferentes níveis de resistência ou susceptibilidade por meio da avaliação de genótipos presentes em bancos de germoplasma (ONYEKA; DIXON; EKPO, 2005).

O resultado de estudos sobre a diversidade de fitopatógenos que buscam identificar e caracterizar os agentes causais de doenças é importante para a seleção de isolados adequados para a triagem de resistência em programas de melhoramento de plantas (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015). Pois, espécies distintas respondem de forma diferente a resistência do hospedeiro ou ao emprego de defensivos, assim como apresentam diferenças na disseminação, sobrevivência e capacidade de adaptação às condições do ambiente (KAMEI et al., 2014).



## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; ZOLFAGHARI, S. Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. **FEMS Microbiology Letters**, v. 361, p. 144–157, 2014.
- BALINI, L. C. et al. Identificação pela técnica de Pcr-Rflp, de *Aspergillus spp.* isolados de grãos de soja e milho. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p. 83-99, 2015.
- BARDAS, G. A.; KOUTITA, O.; TZAVELLA-KLONARI, K. Molecular diversity and assessment of biological characteristics of greek *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 311–318, 2009.
- BRAGANÇA C. A. D. et al. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n.4, 2016a.
- BRAGANÇA, C. A. D. et al. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal biology**, v. 120, p. 547-561, 2016b.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity** v. 39, p. 183-204, 2009.
- CAI, L. et al. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v.50, n. 2011. p. 121–133, 2011.
- CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p.181-213, 2012.
- CANO, J; GUARRO, J; GENE, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2450–2454, 2004.
- CEBALLOS, H. et al. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 503–516, 2004.
- CHOWDAPPA, P. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. **Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 567-572, 2012.
- CROUCH et al. Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas*. **Mycological Research**, v. 113, n. 12, p. 1411-1421, 2009a.

CROUCH et al. Systematic analysis of the falcate-spored *graminicolous Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. **Mycologia**, v. 101, n.5, p. 717–732, 2009b.

CROUCH, J. A. *Colletotrichum caudatum* s.l. is a species complex. **IMA Fungus**, v. 5, n. 1, p. 17-30, 2014.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v. 101, n. 5, p. 648–656, 2009.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012a.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012b.

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p 481–501, 2004.

**FAOSTAT**. Production quantities by country/Cassava, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>> Acesso em: 14 de junho de 2016.

FOKUNANG, C. N. et al. Cultural, morphological and pathogenic variability in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. manihotis isolates from cassava (*Manihot esculenta*) in Nigeria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 542-546, 2000.

FOKUNANG, C. N. et al. Rapid screening method of cassava cultivars for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. Manihotis. **Journal of Phytopathology**, v. 150, p. 6-12, 2002.

FREEMAN, S., KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GAUTAM, A. K. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v. 2, n. 2, 2014.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. Clarification of the etiology of glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. Based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v. 96, n. 9, 2006.

HYDE, K. D. et al. A case for re-inventory of Australia's plant pathogens. **Persoonia**, v. 25, p. 50-60, 2010.

HYDE, K.D. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009a.

HYDE, K.D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity** v. 39, p. 147-182, 2009b.

IBGE, **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, v. 41, p.1-100, 2014.

JEDRYCZKA, M.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M. Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. **European Journal of Plant Pathology**, n. 105, p. 813–823, 1999.

KAMEI, S. H. et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36 n. e. 1, p. 209-216, 2014.

KELEMU, S. et al. Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 261–272, 1999.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.

KUNKEAW, S. et al. An in vitro detached leaf assay for pre-screening resistance to anthracnose disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Australasian Plant Pathology**, v. 39, p. 547–550, 2010.

LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, n. 61, p. 75–88, 2013.

LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 679-688, 2015.

LIU, B. et al. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, p. 593–607, 2012.

MACHADO, A. R. et al. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 464-470, 2014.

MAHARAJ, A.; RAMPERSAD, S.N. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR–RFLP Fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, v. 50, p. 237–249, 2012.

MANAMGODA, D. S. et al. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 107–115, 2013.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 3, p.170-179, 2006.

MORAIS, M. S. et al. Survey and evaluation of the incidence of cassava diseases in the state of Paraíba. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 204-206, 2013.

MORAIS, M. S. et al. Epidemiologia das doenças da parte aérea da mandioca no Município de Alagoa Nova, Paraíba. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 264-269, 2014.

MORAIS, M. S. et al. Levantamento e avaliação da incidência das doenças da mandioca no estado da Paraíba. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 204-206, 2013.

NASSAR, N. Cassava, *Manihot esculenta* crantz and wild relatives: their relationships and evolution. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 00: 1–0, 2001.

NASSAR, N. M. A.; ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **Journal of Agricultural Science**, v. 145, p. 163–171, 2007.

OLIVEIRA, S. A. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; SILVA L. L. First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on the wild cassava species *Manihot dichotoma* and *M. epruinosa*. **Plant disease**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1136-PDN>

ONYEKA, T.J.; DIXON, A.G.O.; EKPO, E.J.A. Identification of levels of resistance to cassava root rot disease (*Botryodiplodia theobromae*) in African landraces and improved germplasm using in vitro inoculation method. **Euphytica**, v. 145, p. 281-288, 2005.

PERUCH et al. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 26, n. 2, p. 52-54, 2013.

PHOTITA, W. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.

PINHO, E. Z. Fermentation and nutritive value of silage and hay made from the aerial part of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 364-370, 2004.

PINWEHA, N. et al. Involvement of miR160/miR393 and their targets in cassava responses to anthracnose disease. **Journal of Plant Physiology**, v. 174, p. 26–35, 2015.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**. v. 39, p. 89-109, 2009.

RAMDEEN, S; RAMPERSAD, S. N. Intraspecific differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* based on *in silico* multilocus PCR–RFLP Fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 170–181, 2013.

RAMDIAL, H.; RAMPERSAD, S. N. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 37-49, 2015.

RAMPERSAD, S. N.; HOSEIN, F. N.; CARRINGTON, C. V.F. Sequence exploration reveals information bias among molecular markers used in phylogenetic reconstruction for *Colletotrichum* species. **SpringerPlus**, v. 3, n. 614, p. 1-15 2014.

ROJAS, E.I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010.

ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; NIETO-ÁNGEL, D.; ACOSTA-RAMOS, M. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 26, n. 1, p. 21-26, 2008.

SCHENA, L. et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 437–446, 2013.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**. v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SERRA, I. M. R. S. Et al. Morphophysiological and molecular analysis in the differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from cashew and mango trees. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 3, p. 216-241, 2006.

SERRA, I.M.R.S. et al. Molecular Analysis in the Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from the Cashew and Mango Trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1099-1108, 2011a.

SERRA, I.M.R.S. et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.42-51, 2011b.

SILVA, H. S. A.; ANDRADE, E. S. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Eds). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Embrapa Meio Ambiente, 2011. 356 p.

SILVA-MANN, R. et al. 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, n. 1, p. 27-32, 2002.

SILVA, D. M. et al. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 761-773, 2011.

SILVA, C. F. B.; MICHEREFF, S. J. Biology of *Colletotrichum* spp. And epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 130 – 138, 2013.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 265-281, 1992.

SUZUKI, T. et al. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne). **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p. 247–253, 2010.

TALHINHAS, P. et al. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 73- 83, 2015.

TAO G., et al. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 139–164, 2013.

TAVERA, V. M. et al. Genetic, pathogenic and morphological diversity of fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) from Michoacan, Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 1, n. 2, p. 159-174, 2010.

VERSALOVIC, J.; SCHNIEDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in Northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 181–202, 2014.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WILLIAM, M. N. M.; MBEGA, E. R.; MABAGALA, R. B. An outbreak of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *Manihotis* in cassava in North Western Tanzania. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 596-598, 2012.

WYDRA, K.; VERDIER, V. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 93, p. 211-226, 2002.

YANG, Y. et al. New species and notes of *Colletotrichum* on daylilies (*Hemerocallis* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 165-174, 2012.

---

## **CAPÍTULO 2**

**BOX e ERIC-PCR na diferenciação de linhagens filogenéticas e espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* associadas a antracnose da mandioca.**

---



**BOX e ERIC-PCR na diferenciação de linhagens filogenéticas e espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* associadas a antracnose da mandioca**

**L. L. Silva<sup>a</sup>, C. A. D. Bragança<sup>a</sup> e S. A. S. Oliveira<sup>b</sup>,**

<sup>a</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710 44380-00, Cruz das Almas, Brasil; <sup>b</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n 44380-000, Cruz das Almas, Brasil.

**RESUMO**

Diversas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para diferenciar espécies de micro-organismos, como um direcionamento ao sequenciamento. Entre elas, BOX-PCR e ERIC-PCR, que podem apresentar padrões de bandas específicos para espécies distintas, permitindo assim a sua diferenciação. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar essas duas técnicas como uma ferramenta para a diferenciação de linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* associados a antracnose da mandioca. Foram utilizados os conjuntos de primers BOX e ERIC para avaliar a diferenciação de linhagens dentro do complexo *C. gloeosporioides* em 81 isolados oriundos de diferentes regiões produtoras de mandioca. Alguns desses isolados foram identificados por sequenciamento como *C. siamense*, *C. fruticola*, *C. tropicale*, *C. gloeosporioides* e *C. cliviae*. Os primers utilizados foram capazes de amplificar o DNA dos isolados. Os padrões de bandas apresentados por isolados em que foram escolhidos para a repetição da amplificação foram os mesmos. O ERIC-PCR foi capaz de apresentar maior número de padrões de bandas, e permitir um melhor agrupamento de indivíduos. Já o BOX-PCR apresentou menor número de bandas e o pior agrupamento de indivíduos. Uma maior correlação com dados filogenéticos foi obtida por ERIC-PCR e ERIC-BOX. No entanto, a utilização em conjunto dos dados obtidos por BOX e ERIC-PCR reduziu a capacidade discriminatória apresentada somente por ERIC. Em vista disso, a técnica ERIC-PCR possibilitou a diferenciação eficiente de isolados pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, podendo ser utilizada para analisar vários isolados em uma coleção.

Palavras-chave: *Colletotrichum* spp.; Complexo de espécies; rep-PCR; DNA fingerprint.

## ABSTRACT

Several molecular techniques have been used to differentiate species of microorganisms, prior to sequencing. Among them, BOX-PCR and ERIC-PCR, that may have specific banding patterns for different species, thus allowing its differentiation. Based on this, the objective of this study was to evaluate these two techniques as a tool for differentiation of phylogenetic lineages belonging to the *C. gloeosporioides* complex associated with cassava anthracnose disease. Sets of BOX and ERIC-PCR primers were used to assess the differentiation of lineages in the complex with 81 *C. gloeosporioides* isolates from different regions producing cassava. Some of them were identified by sequencing as *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. Tropicale*, *C. gloeosporioides* and *C. cliviae*. The primers were able to amplify DNA from all isolated. Banding patterns displayed by isolates that were chosen for the repetition of amplification were the same. The ERIC-PCR was able to present as many bands patterns and allow better grouping individuals. But the BOX-PCR showed fewer bands and the worst group of individuals. A higher correlation with phylogenetic data was obtained by ERIC-PCR and ERIC-BOX. However, the use of concatenated data (BOX + ERIC-PCR) reduced the discriminatory capacity presented by ERIC alone. Therefore, ERIC-PCR technique enabled the efficient differentiation of isolates belonging to the *C. gloeosporioides* complex and can be used to analyze multiple isolated in a collection.

Keywords: *Colletotrichum* spp.; Species complex; Rep-PCR; DNA fingerprint.

## INTRODUÇÃO

A cultura da mandioca é importante em diversos países dos trópicos, usada principalmente na alimentação humana e animal. Assim como em outras culturas, algumas doenças podem afetar a sua produtividade. A antracnose é uma dessas doenças, sendo relatada como uma das que causam mais danos a essa cultura. O agente causal dessa doença na mandioca é conhecido como *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* (PINWEHA et al., 2015).

A identificação do patógeno causador da antracnose na mandioca, assim como para vários outros patógenos em diversas culturas, baseava-se no isolamento do patógeno das áreas lesionadas, observação e comparação de características morfológicas, culturais e patogênicas (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). No entanto, devido à similaridade fenotípica encontrada entre espécies do gênero *Colletotrichum*, as características adotadas para a

diferenciação dificultavam a identificação. Alguns complexos de espécies foram formados dentro desse gênero, e entre esses complexos está o *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012a, 2012b).

Para auxiliar na identificação de fitopatógenos, técnicas moleculares vêm sendo utilizado como um suporte na identificação. Com o constante uso do sequenciamento de regiões do genoma pode-se identificar de forma precisa diversas espécies (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012a, 2012b). As espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* foram diferenciadas por Weir, Johnston e Damm (2012) que utilizaram filogenia baseada em 8 genes para identificar as 22 espécies crípticas que compõem o complexo. A filogenia permite uma identificação precisa e revela a relação existente entre os indivíduos. Com base em análise multilocus de três genes, foram relatadas pela primeira vez duas espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em mandioca, sendo elas *C. fructicola* e *C. tropicale* (BRAGANÇA et al., 2016a; OLIVEIRA; BRAGANÇA; SILVA, 2016). No entanto, quando se utiliza um grande número de isolados, o sequenciamento pode apresentar um alto custo e elevado consumo de tempo para a realização das análises. Assim, o uso de técnicas alternativas que possibilitem a diferenciação rápida de linhagens filogenética ou espécies do complexo deve ser testado para auxiliar de forma rápida na diferenciação de isolados.

Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade e auxiliar na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (TALHINAS et al., 2005; VILA NOVA et al., 2011). Entre essas, a técnica rep-PCR comumente usadas para analisar diversidade genética em bactérias por meio da amplificação de regiões repetitivas, pode ser utilizada para analisar a diversidade genética de fungos e também para auxiliar na identificação (BARDAS; KOUTITA; TZAVELLA-KLONARI, 2009; SUZUKI et al., 2010). Quando utilizado rep-PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR) em fungos agrupados em complexos mostraram ser eficazes em diferenciar as espécies pertencentes ao complexo e com padrões de bandas produzidas específicas suficientes para diferenciar as espécies (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014).

Fungos pertencentes a diversos complexos de espécies foram identificados e relatados causando doença em várias culturas (BRAGANÇA et al., 2016b; DAMM et al., 2012a, 2012b; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Diante da grande diversidade de espécies de fitopatógenos encontradas nesses patossistemas, técnicas que possibilitem o direcionamento para a correta identificação de isolados, e que apresentem baixo custo e fácil procedimento devem ser adotadas.

Estudos que caracterizem os patógenos relacionados a antracnose da mandioca ainda são escassos, e o conhecimento sobre o patógeno é importante para que se possa adotar medidas adequadas para o controle da doença, sejam elas culturais ou químicas (TALHINHAS et al., 2015). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi identificar diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* causando antracnose em mandioca e avaliar a eficiência da técnica ERIC-PCR e BOX-PCR como uma ferramenta para a diferenciação de linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* associadas a antracnose da mandioca.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos isolados**

Foram coletados folhas, caules e frutos de mandioca com sintomas de antracnose em áreas de produção localizadas na região do Recôncavo da Bahia e no banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O material vegetal coletado foi fragmentado entre área do tecido necrosado e assintomático e desinfestado superficialmente por meio de imersão em álcool etílico 70% por 1 min e em seguida imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 min, em seguida lavadas com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e mantidas em estufas incubadoras B.O.D. (Biochemical oxygen demand) a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 h, por um período de quatro a cinco dias. Após o aparecimento das colônias, estas foram transferidas para novas placas. Culturas monospóricas obtidas de todos os isolados foram

testadas quanto a patogenicidade e preservadas pelo método Castellani em microtubos e em DMSO 15% ultra-freezer (-80 °C) (TABELA 1 e 2).

### **Extração de DNA**

As culturas monospóricas foram crescidas em meio líquido sacarose-extrato de levedura (10 g sacarose, 2 g extrato de levedura, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,44 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1000 mL de água destilada) em shaker orbital a 90 rpm por 10-15 dias. Após esse período, o micélio foi filtrado, seco, macerado com nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistílo. O produto macerado foi transferido para microtubos plásticos de 2,0 mL e adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  do tampão de extração (1 % CTAB, 20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, 0,7 M NaCl e 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol), seguido de incubação das amostras em banho maria a 65 °C por 45 min, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (v:v), e centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O Sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 100  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio, e centrifugado a 10.000 rpm por 12 min. Por fim, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, secado em temperatura ambiente, resuspendido com TE (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA) e 2  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e incubado a 37 °C por uma hora.

Após a extração, a solução contendo DNA genômico foi armazenada a -20 °C. A qualidade e quantidade de DNA foram mensuradas por comparação visual com o DNA do fago lambda na concentração de 50 e 100 ng, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% adicionado brometo de etídio (1,5  $\mu\text{L} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ ).

**Tabela 1.** Origem dos isolados.

Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Orgão
10F2	Santo Ant. de Jesus/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
14F3	Governador Mangabeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
14F5	Governador Mangabeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
17F5	Cabaceiras do Paraguaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
18F3	Cabaceiras do Paraguaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
1F2.2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
20F1	Muritiba/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
22F1	Conceição de Feira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
22F3	Conceição de Feira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
24F1	Conceição de Feira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
24F6	Conceição de Feira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
25F1	Cachoeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
26F6	Cachoeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
27F4	Cachoeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
27F5	Cachoeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
27F8	Cachoeira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
28F2	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
28F5	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
28F6	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
28F7	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
2F2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
2F6	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
2P1	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
33F10	Conceição do Almeida/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
34F1	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
34F3	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
34F4	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
34F5	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
34F6	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
35C2	Sapeaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
38C3	São Félix/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
38CX	São Félix/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
39C1	São Félix/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
3F1	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
3F2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
3F3.2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
40C0	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
40C2	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
40C4	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
40C7	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
40F4	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha

**Tabela 1.** Continuação...

Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Orgão
40P1	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
40P2	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
40P6	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
42C1	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
42C2	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
43F3	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
43P5	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
43P6	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo
44C*	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C1	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C10	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C11	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C12	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C19	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C3	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C4	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C5	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C6	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C7	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
44C8	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule
45F10	Nazaré/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
46F3	Aratuípe/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
48F1	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
48F2	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
48F3	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
48F4	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
48F5	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
5F1	Varzedo/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
5F5	Varzedo/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
7F5	São Miguel das Matas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
8F2	São Miguel das Matas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha
9P1	São Miguel das Matas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Pecíolo

**Tabela 2.** Origem e identificação dos isolados utilizados.

Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Orgão	Número de acesso genbank			Espécie
				CAL	CHS-1	GAPDH	
PPAM09	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-	<i>C. cliviae</i>
PPAM 02	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot epruinosa</i>	Folha	KP763671	KP763678	KP763684	<i>C. tropicale</i>
PPAM 05	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot dichotoma</i> Ule	Folha	KP763672	KP763679	KP763686	<i>C. tropicale</i>
PPAM 06	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot</i> sp.	Folha	KP763673	KP763680	KP763687	<i>C. gloeosporioides</i>
PPAM 08	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot carthaginensis</i> (Jacq.) Mull. Arg.	Folha	KP763674	KP763681	KP763688	<i>C. siamense</i>
PPAM 10	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	KP763675	KP763682	KP763689	<i>C. fruticola</i>
PPAM 13	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	KP763676	-	KP763690	<i>C. fruticola</i>
PPAM 15	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot tomentosa</i> Pohl	Folha	KP763677	KP763683	KP763691	<i>C. siamense</i>

(- ) Sequência não depositada.



## Sequenciamento Multilocus e filogenia

A amplificação parcial foi obtida a partir da técnica de PCR com a utilização dos *primers* CL1C (5'-GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC-3') e CL2C (5'-CTT CTG CAT CAT GAG CTG GAC-3') (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) para amplificação da região CAL. CHS-79F (5'-TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG-3 ') e CHS-345R (5'-TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG-3') (CARBONE; KOHN, 1999) para a amplificação da quitina sintase (CHS-1). GDF1 (5'-GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3') e GDR1 (5'-GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT-3') (GUERBER; LIU; CORRELL, 2003) para amplificação da região GAPDH. As reações de PCR possuíam um volume de 25 µL contendo 1X do tampão, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2 mM de cada *primer*, 1 U Taq DNA polimerase, 100 ng de DNA e água mili-Q (q.s.p. 25 µL). As condições de PCR para CAL foram 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 30 s, 72 °C por 45 s e por fim 7 min a 72 °C. A temperatura de anelamento para as outras regiões foi de 55 °C para TUB2 e 60 °C para GAPDH.

Os produtos da reação de PCR foram purificados com auxílio de Kits de purificação comercial por coluna (UltraClean® PCR, Clean-Up Kit - Mobio Laboratories, Inc.), e em seguida encaminhados para sequenciamento por empresa especializada, em duas direções (direta e reversa).

As sequências de DNA obtidas foram avaliadas quanto à qualidade de sequenciamento, com base nos respectivos eletroferogramas, alinhadas par-a-par e editadas manualmente, com auxílio do software BioEdit (HALL, 2011), para obtenção de uma sequência consenso para cada um dos isolados. As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLASTn, para confirmação do gênero de cada um dos isolados. A verificação da identidade das espécies associadas à antracnose da mandioca foi realizada a partir de análises filogenéticas via inferência Bayesiana, em comparação às demais sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e/ou de espécies-tipo presentes no MycoBank (<http://pt.mycobank.org>).

## **Análises filogenéticas**

Para as análises filogenéticas, as sequências das regiões de interesse (CAL, CHS-1 e GAPDH) foram alinhadas com isolados de diferentes espécies (TABELA 3) com auxílio da ferramenta “Muscle” implementada no software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013).

Para as análises de inferência Bayesiana, foram estimados os modelos evolutivos para cada uma das regiões com auxílio do programa “MrModeltest” (NYLANDER, 2004), e em seguida, as árvores consenso foram geradas por meio do software “MrBayes” (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) com 5.000.000 de gerações e “burn-in” de 25% (1.250.000 gerações). As análises foram realizadas para os genes de forma individual e concatenada (multilocus).

## **Amplificação de sequências BOX e ERIC**

As regiões BOX e ERIC foram amplificadas por meio de PCR utilizando os *primers* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (KOEUTH et al. 1995; VERSALOVICS et al., 1994), a combinação ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') ERIC2 (3'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-5') (VERSALOVICS et al., 1991). As reações de PCR foram ajustadas para um volume de 25 µL contendo 0,03 µM do *primer* BOX e 0,2 µM de cada *primer* ERIC, 50 ng de DNA genômico; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de Taq DNA polimerase e 1 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA (soro albumina bovina). As condições de PCR utilizadas foram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos, e uma extensão final a 65°C por 8 minutos.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1 X corado com brometo de etídio (1,5 µL.100ml<sup>-1</sup>), sob 80 V por 3h. Logo após, digitalizados utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, foi utilizado como marcador molecular TIANGEN 1 Kb DNA Ladder.

**Tabela 3.** Espécies e sequências utilizadas.

Espécie	Isolado	Número de acesso Genbank		
		GAPDH	CAL	CHS-1
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	JX010044	JX009683	JX009774
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673	JX009930	JX009721	JX009799
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67	JX009990	JX009738	JX009837
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	JX010028	JX009654	JX009882
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	JX010005	JX009611	JX009853
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580	JX010053	FJ917506	JX009867
<i>C. brevisporum</i>	L57/LC0600	JN050227	JN050222	KF687760
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	JX009989	JX009645	JX009877
<i>C. cliviae</i>	CBS:125375	JX546611	GQ849464	JX519232
<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579	JX009975	HM470238	JX009864
<i>C. dacrycarpi</i>	CBS:130241	JQ005323	JQ005757	JQ005410
<i>C. dianesei</i>	CMM4083	KC517194	KC517209	-
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581	JX010033	FJ917508	JX009866
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>C. ignotum</i> )	CBS 125397	JX010032	JX009674	JX009874
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>minor</i> )	CBS 238.49	JX009923	JX009671	JX009839
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878	JX010056	JX009731	JX009818
<i>C. gloeosporioides</i> (syn. <i>Gloeosporium pedemontanum</i> )	CBS 273.51	JX010054	JX009745	JX009903
<i>C. horii</i>	ICMP 10492	GQ329681	JX009604	JX009752
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 12952	JX009971	JX009648	JX009757
<i>C. musae</i>	CBS 116870	JX010050	JX009742	JX009896
<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96	JX009972	JX009663	JX009835
<i>C. orbiculare</i>	CBS 570.97	KF178490	-	KF178515
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29	JX009967	JX009743	JX009901
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	JX009934	JX009691	JX009899
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	JX009916	JX009696	JX009863
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	JX009924	FJ917505	JX009865
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i> )	CBS 125378	JX010019	JX009709	GQ856730
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. jasmini-sambac</i> )	CBS 130420	HM131497	JX009713	JX009895
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17895	JX010057	JX009600	JX009828
<i>C. ti</i>	ICMP 4832	JX009952	JX009649	JX009898
<i>C. torulosum</i>	CBS:128544	JQ005251	JQ005685	JQ005338
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949	JX010007	JX009719	JX009870
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094	JX009927	JX009653	JX009823
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	ICMP 10643	JX009908	JX009630	JX009891
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	ICMP 18542	JX009994	JX009628	JX009857

(-) Sem número de acesso no genbank

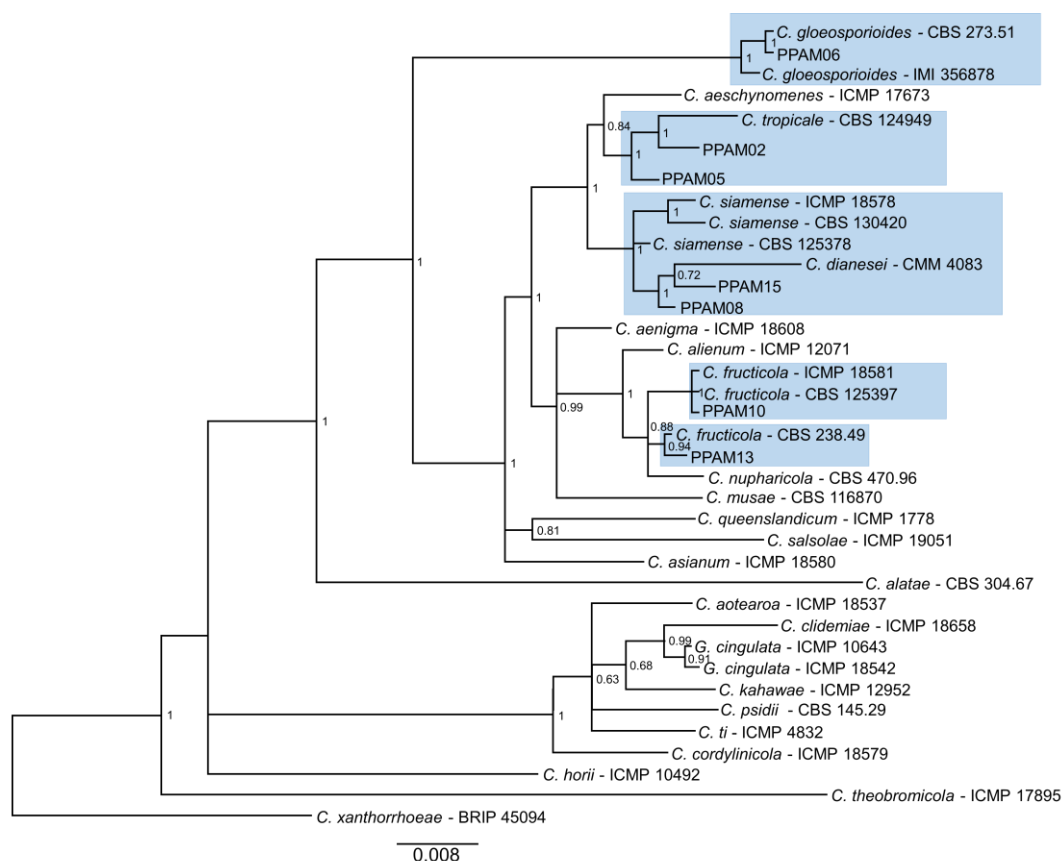
## **Análise dos dados**

Os padrões de bandas observados foram utilizados para a construção de matrizes binárias, sendo '0' = ausência de bandas e "1" presença de banda. Dendrogramas para cada técnica foram construídos baseados nos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) com bootstrap de 60 repetições, com auxílio dos pacotes Rcmdr e vegan (FOX; 2005; OKSANEN et al., 2016) implementado no software R (R CORE TEAM, 2015). As comparações das distâncias genéticas foram realizadas por meio do teste de Mantel (MANTEL, 1967) com auxílio do pacote ade4 (DRAY; DUFOUR, 2007) implementado no software R.

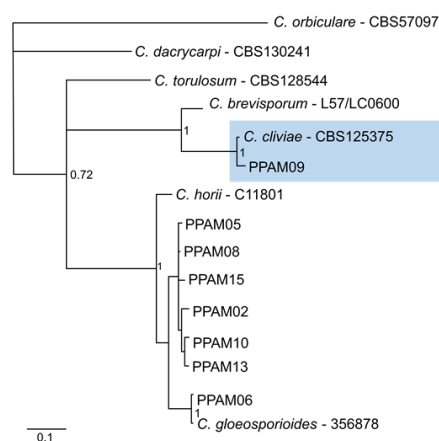
## **RESULTADOS**

Com base nos dados obtidos a partir das sequências de CAL, GAPDH e CHS-1 combinados dos 7 isolados de *C. gloeosporioides sensu lato* utilizando filogenia com probabilidade posterior Bayesiana, foi possível identificar 4 espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose em mandioca, sendo estas *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. fructicola* evidenciadas em verde (FIGURA 1). Baseado nos dados obtidos a partir da sequência GAPDH de todos os isolados, utilizando filogenia com probabilidade posterior Bayesiana, foi possível identificar uma espécie que não pertence ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose na mandica, sendo identificado como *C. cliviae* (FIGURA 2).

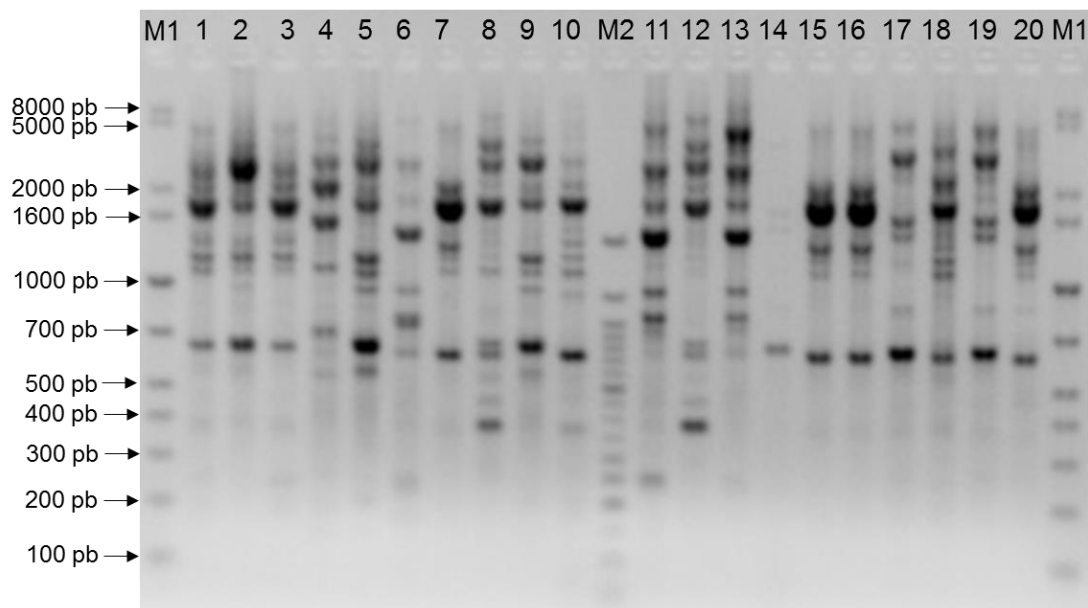
As técnicas ERIC-PCR e BOX-PCR revelaram polimorfismo entre os 81 isolados de *Colletotrichum* spp. testados. A técnica ERIC-PCR resultou em um total de 31 bandas distintas, com tamanhos variando entre 250 a 4700 pb aproximadamente (FIGURA 3). A técnica BOX-PCR resultou em um total de 15 bandas distintas, com tamanhos de 1100 a 8000 pb aproximadamente (FIGURA 4). O número e o tamanho das bandas variaram entre os isolados testados. Foram consideradas para as análises bandas bem definidas. Para avaliar a reprodutibilidade das técnicas foram realizadas reações separadas com os mesmos isolados com a finalidade de observar o padrão de bandas apresentado. Em ambas as reações, para todos os isolados testados, as bandas apresentaram mesmo padrão.



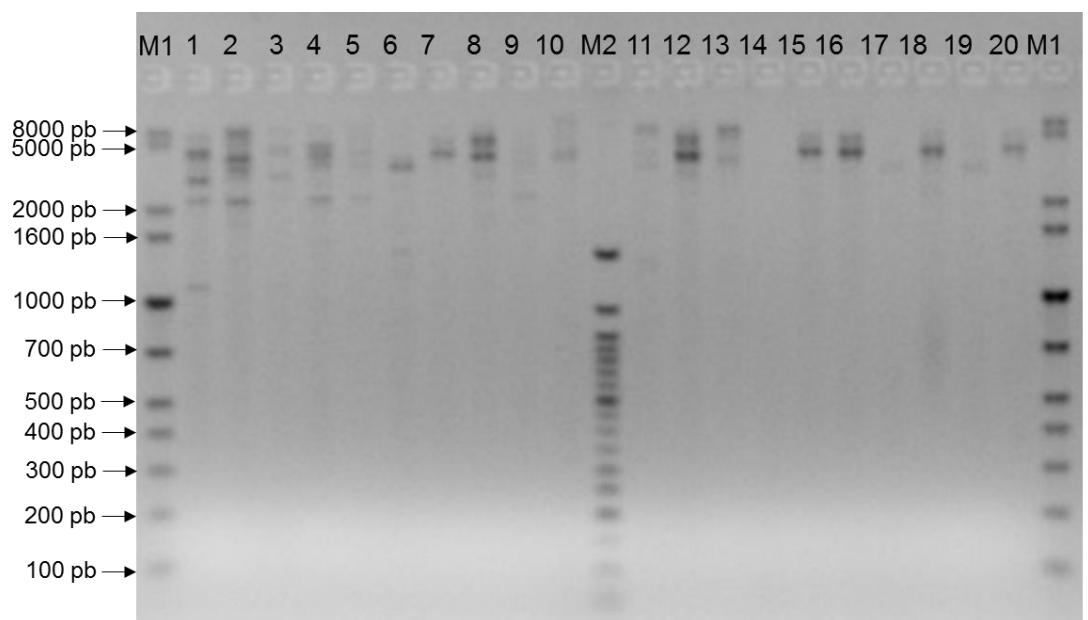
**Figura 1.** Árvore filogenética com inferência Bayesiana do alinhamento combinado de sequências parciais obtidos a partir de genes CAL, CHS-1 e GAPDH usado isolados e outros membros pertencentes ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. Delimitação das espécies em azul. Probabilidade posterior Bayesiana  $\geq 0,5$  são mostrados nos nós. *Colletotrichum xanthorrhoeae* foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica o número de mudanças esperadas por site.



**Figura 2.** Árvore filogenética com inferência Bayesiana construída utilizando sequências parciais obtidos a partir do gene GAPDH de isolados e outros membros que pertencem ao gênero *Colletotrichum*. Delimitação das espécies em azul. Probabilidade posterior Bayesiana  $\geq 0,5$  são mostrados nos nós. *Colletotrichum orbiculare* foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica o número de mudanças esperadas por site.

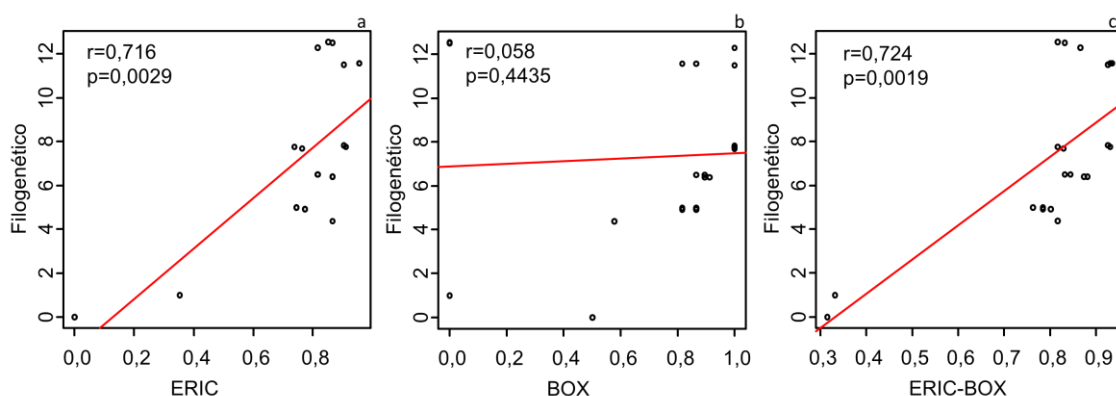


**Figura 3.** Padrões de bandas obtidos pela técnica ERIC-PCR dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* em gel de agarose 1,5%. M1 – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; M2 – Marcador Biolabs 50 pb; 1 – PPAM02; 2 – 40F4; 3 – PPAM05; 4 – PPAM06; 5 – PPAM08; 6 – PPAM09; 7 – PPAM10; 8 – PPAM13; 9 – PPAM15; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 20F1; 13 – 24F6; 14 – 27F3; 15 – 28F6; 16 – 33F10; 17 – 39FR1; 18 – 40C4; 19 – 44C4; 20 – 48F4.



**Figura 4.** Padrões de bandas obtidos pela técnica BOX-PCR dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* em gel de agarose 1,5%. M1 – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; M2 – Marcador Biolabs 50 pb; 1 – PPAM02; 2 – 40F4; 3 – PPAM05; 4 – PPAM06; 5 – PPAM08; 6 – PPAM09; 7 – PPAM10; 8 – PPAM13; 9 – PPAM15; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 20F1; 13 – 24F6; 14 – 27F3; 15 – 28F6; 16 – 33F10; 17 – 39FR1; 18 – 40C4; 19 – 44C4; 20 – 48F4.

Com os dados obtidos a partir dos padrões de bandas foi possível gerar matrizes de distância para todos os isolados. Foram selecionadas as matrizes de distância obtidas pelos dados de ERIC, BOX, ERIC-BOX e filogenéticos de sete isolados que foram identificados via análise multilocus (PPAM02, PPAM05, PPAM06, PPAM09, PPAM10, PPAM13, PPAM15). Os resultados da comparação entre as diferentes matrizes de distância mostraram valores de correlação e p diferentes para as combinações de matrizes avaliadas (FIGURA 5). Os maiores valores de correlação foram encontrados entre “filogenético x ERIC” e “filogenético x ERIC-BOX” em que apresentaram valores de correlação maiores do que 0,7 e valores para p menores que 0,05. Enquanto que o valor obtido para correlação “filogenético x BOX” foi menor que 0,06 e valor para p maior que 0,05. Os resultados obtidos da comparação entre os dados de ERIC e ERIC-BOX com o filogenético foram semelhantes, e ambos distintos de BOX.



**Figura 5.** Representação gráfica das correlações entre as matrizes de distâncias geradas pelas diferentes análises. (a) distância entre dados filogenéticos e obtidos por ERIC; (b) distância entre dados filogenéticos e obtidos por BOX; (c) distância entre dados filogenéticos e obtidos por ERIC-BOX. Valores de correlação e p para as matrizes de distâncias obtidos pela análise de Mantel.

Os percentuais de similaridade foram observados nas matrizes de distância geradas, e os valores comparados entre os indivíduos sequenciados e não sequenciados dos subclados formados para as três diferentes análises. A análise de agrupamento dos dados de BOX-PCR mostrou a formação de 3 subclados com os indivíduos sequenciados, designados subclado siamense-gloeosporioides, subclado fructicola e subclado tropicale (FIGURA 6). Não foi possível a obtenção de valores de bootstrap devido ao baixo número de locus.

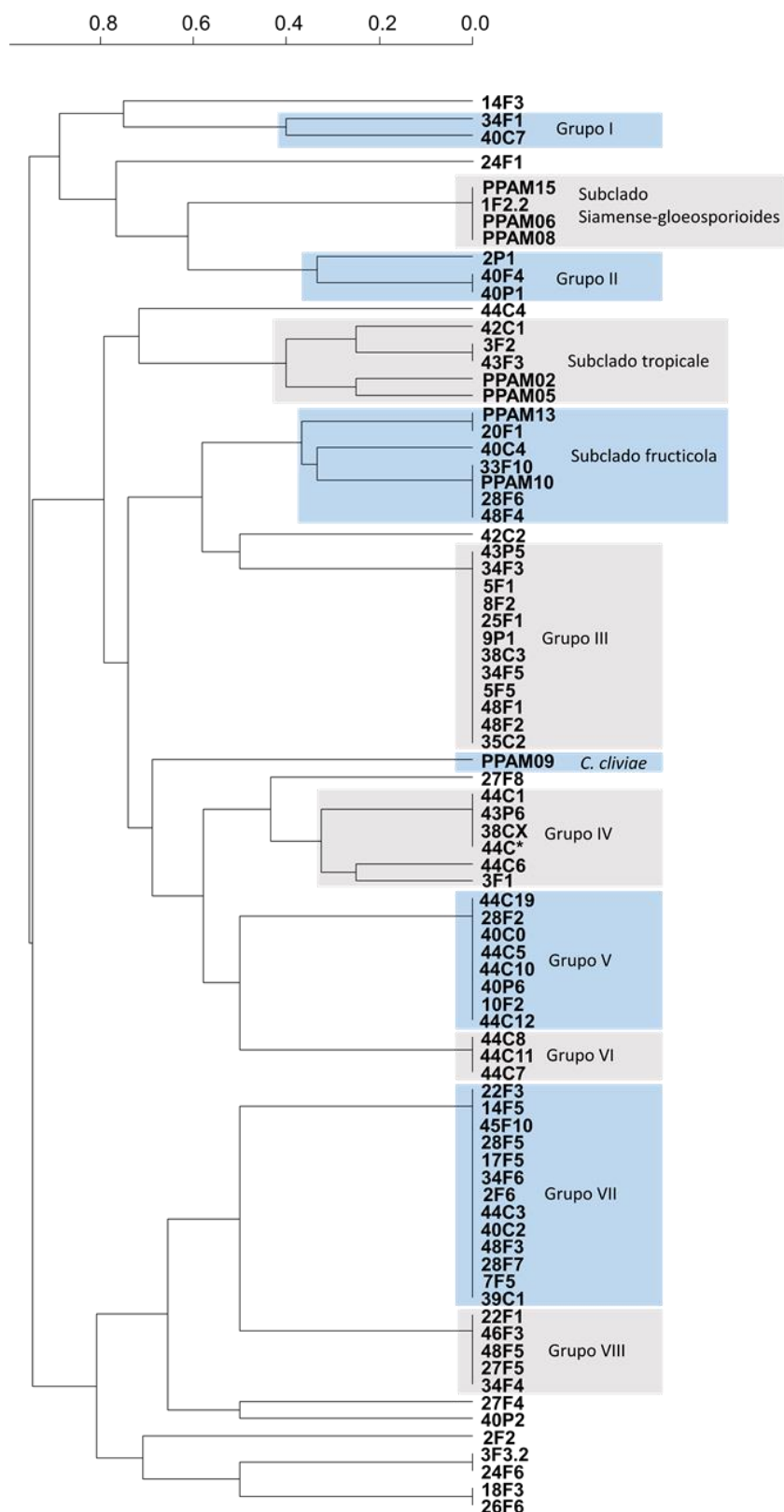
O isolado de *C. cliviae* não se agrupou com os demais isolados. O subclado siamense-gloeosporioides apresenta somente quatro isolados, sendo que agrupou indivíduos pertencentes a espécies diferentes, dois isolados de *C. siamense* e um de *C. gloeosporioides*. Os indivíduos apresentaram 100% de similaridade, de acordo com o agrupamento.

O subclado tropicale apresentou cinco indivíduos, sendo dois pertencentes a espécie *C. tropicale*. A menor similaridade encontrada entre os indivíduos sequenciados e não sequenciados no subclado foi de 40%. O subclado fructicola apresentou 7 indivíduos, dois deles pertencentes a espécie *C. fructicola*. A menor similaridade encontrada entre os indivíduos sequenciados e não sequenciados no subclado foi próxima de 67%. Ocorreu a formação de alguns subclados com 100% de similaridade, no entanto, nenhum deles apresentou isolados sequenciados.

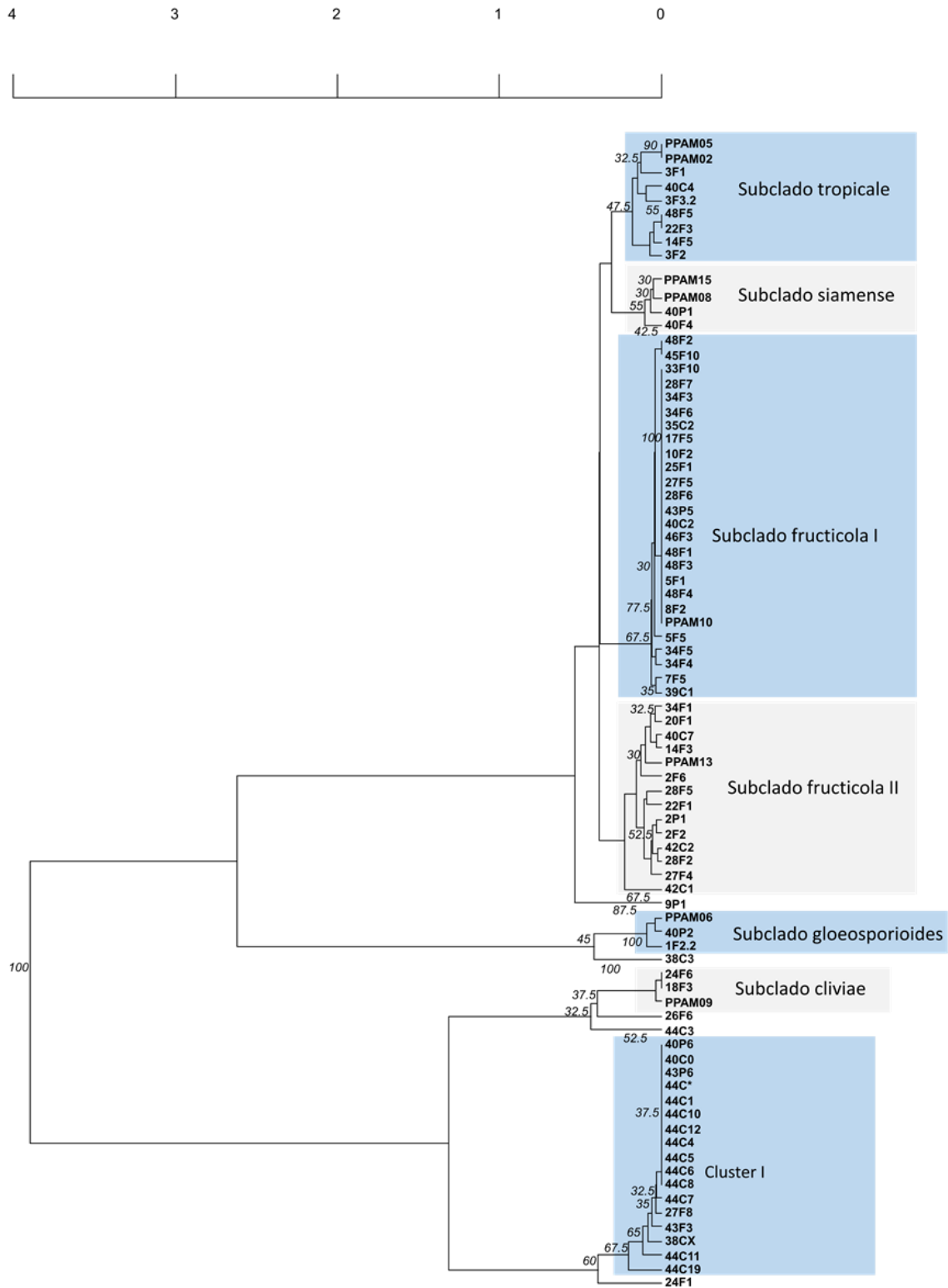
A análise de agrupamento dos dados de ERIC mostrou formação de sete subclados, designados subclado siamense, subclado gloeosporioides, subclado fructicola I, subclado fructicola II, subclado tropicale, subclado cliviae e grupo I (FIGURA 7). O subclado gloeosporioides apresentou três isolados, sendo um deles sequenciado. A menor similaridade encontrada foi de 67%. O subclado siamense apresentou cinco isolados, dois deles identificados como *C. siamense*. A menor similaridade encontrada foi de 55%. O subclado tropicale apresentou nove isolados, a menor similaridade de 43%. O subclado cliviae apresentou três isolados, com similaridade de 88%.

Houve a formação de dois subclados maiores apresentando indivíduos identificados como *C. fructicola*. O subclado fructicola I apresentou o maior número de isolados entre todos os subclados formados, com 26 isolados. A menor similaridade encontrada foi de 75%. O subclado fructicola II apresentou 14 isolados. Os percentuais de similaridade foram bastante variáveis dentro do subclado, a menor similaridade foi de 46%.





**Figura 6.** Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pela técnica BOX-PCR mostrando o agrupamento de 81 isolados de *Colletotrichum* spp. Dendrograma baseado nos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).



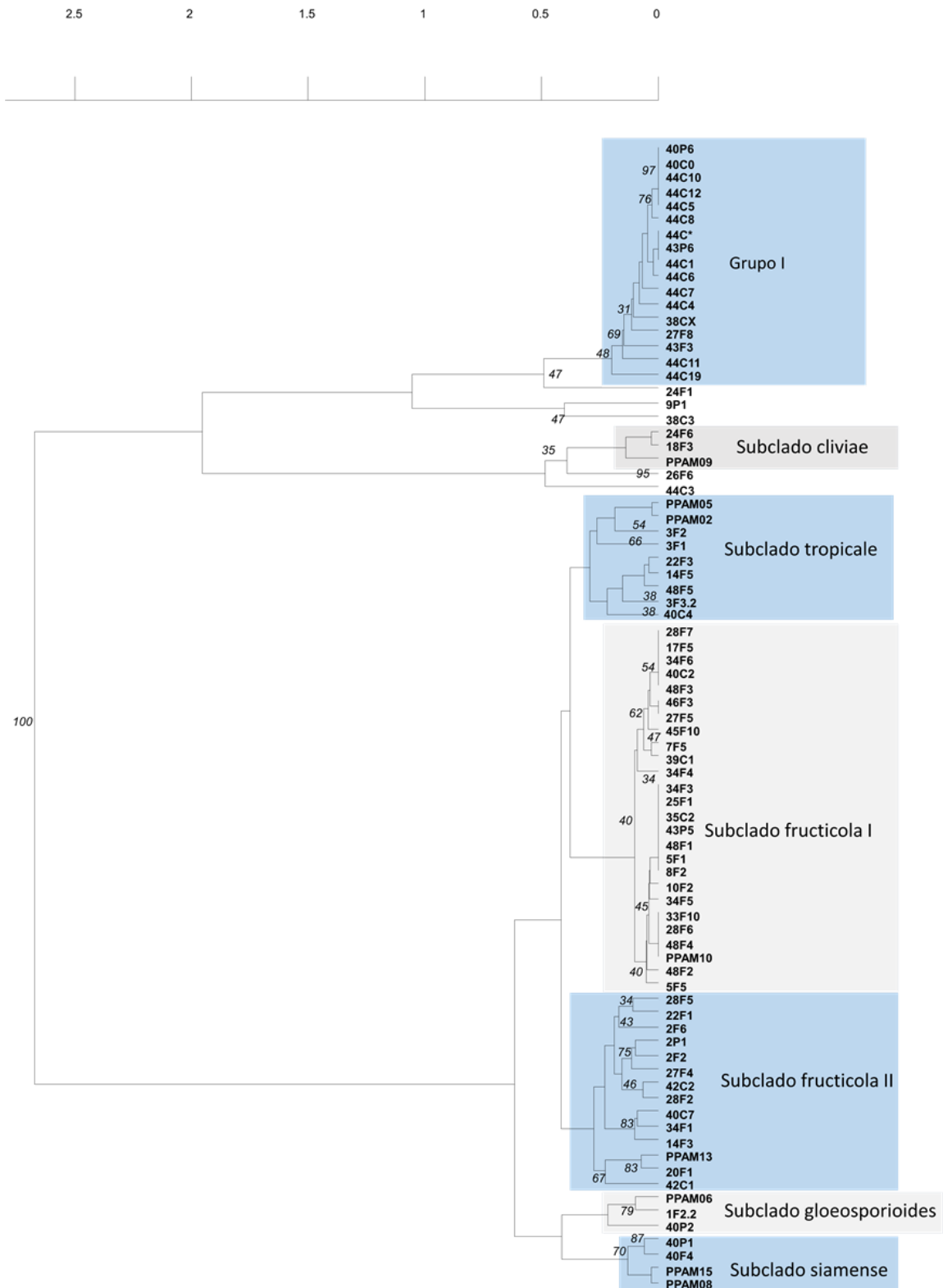
**Figura 7.** Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pela técnica ERIC-PRC mostrando o agrupamento de 81 isolados de *Colletotrichum* spp. Dendrograma baseado nos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) com bootstrap de 60 gerações.

A análise de agrupamento dos dados de BOX e ERIC em conjunto mostrou a formação de sete subclados designados subclado siamense, subclado gloeosporioides, subclado fructicola I, subclado fructicola II, subclado tropicale, subclado cliviae e grupo I (FIGURA 8). O subclado gloeosporioides apresentou três isolados, sendo um deles sequenciado. A menor similaridade encontrada foi de 50%. O subclado siamense apresentou cinco isolados, dois deles identificados como *C. siamense*. A menor similaridade encontrada foi de 53%. O subclado tropicale apresentou três isolados, a menor similaridade de 50%. O subclado cliviae apresentou três isolados, com similaridade de 58%.

Ocorreu a formação de dois subclados maiores apresentando indivíduos identificados como *C. fructicola*. O subclado fructicola I apresentou 26 isolados. Os percentuais de similaridade foram bastantes variáveis dentro do subclado, a menor similaridade encontrada foi de 36%. O subclado fructicola II apresentou o maior número de isolados entre todos os subclados formados, com 14 isolados. A menor similaridade encontrada foi de 64%.

De uma maneira geral, os isolados pertencentes ao subclados formados pela análise conjunta de ERIC-BOX foram semelhantes aos formados pela análise somente do ERIC, no entanto os percentuais de similaridades encontrados foram menores. A variabilidade genética encontrada no BOX foi menor que no ERIC.

Levando em consideração as espécies em estudo, pode-se observar que ERIC-PCR foi a técnica capaz de detectar polimorfismo intraespecífico e que apresentou melhor resultado.



**Figura 8.** Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pelas técnicas BOX e ERIC-PCR mostrando o agrupamento de 81 isolados de *Colletotrichum* spp. Dendrograma baseado nos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) com bootstrap de 60 repetições.

## DISCUSSÃO

Das quatro espécies do gênero *Colletotrichum* identificadas neste trabalho, duas (*C. fructicola* e *C. tropicale*) já haviam sido previamente relatadas em publicações desenvolvidas por este grupo de pesquisa (BRAGANÇA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016), entretanto, este é o primeiro relato no mundo da ocorrência de *C. siamense* e *C. cliviae* causando antracnose da mandioca. Vale resaltar, que este também é o primeiro relato de uma espécie não pertencente ao “complexo *C. gloeosporioides*” na cultura. O conhecimento sobre essas novas espécies influencia nas medidas de controle que podem ser empregadas, uma vez que essas espécies recém descobertas causando antracnose em mandioca podem responder de forma diferente ao emprego de defensivos ou mesmo a resistência do hospedeiro (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015). Estudos que busquem a compreensão da variabilidade genética e de espécies de patógenos, como técnicas de análise molecular, são fundamentais investigações de finalidade epidemiológica, de genética de populações e de controle do patógeno (BARDAS et al., 2009). Estudos que busquem a compreensão da variabilidade genética e de espécies de patógenos, como técnicas de análise molecular, são fundamentais investigações de finalidade epidemiológica, de genética de populações e de controle do patógeno (BARDAS; KOUTITA; TZAVELLA-KLONARI, 2009).

Marcas específicas são estratégias de diferenciação de micro-organismos bastante utilizadas, já que esses métodos podem facilitar a identificação de micro-organismos que apresentem dificuldades na diferenciação morfológica e culturais, além de reduzir o tempo gasto e custo para essas análises (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; BEHNIA et al., 2016).

As técnicas BOX-PCR e ERIC-PCR são métodos úteis e bastante utilizados para a identificação de espécies de bactérias e até mesmo para fungos (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; DAHAGHIN; SHAMS-BAKHSH, 2014). No entanto, para micro-organismos fitopatogênicos essas técnicas não são tão utilizadas. Ambas podem ser utilizadas para tentar entender a relação geográfica entre isolados, conforme relato de Bardas, Koutita e Tzavella-Klonari (2009), que observaram correlação positiva entre os grupos formados e origem geográfica de isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões da Grécia. Podem também ser usadas para tentar estabelecer relações de virulência entre isolados como observado por Mahuku e Riascos (2004), que avaliaram virulência e

diversidade genética entre isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de genótipos diferentes de *Phaseolus vulgaris* de diferentes regiões.

Fungos do gênero *Colletotrichum*, como *C. gloeosporioides* sensu lato são constantemente relatados por apresentar alta variabilidade patogênica (TALHINHAS et al., 2015). Métodos como o BOX e ERIC-PCR que foram utilizados para outras espécies de fungos e também do gênero *Colletotrichum* podem ser utilizados para observar variações genéticas que ocorrem em *C. gloeosporioides sensu lato* possibilitando a distinção de espécies pertencentes ao complexo.

Em outro estudo Abdollahzadeh e Zolfaghari (2014), conseguiram diferenciar 26 de 27 espécies crípticas presentes em oito gêneros de Botryosphaeriaceae com base nos padrões de bandas apresentados pelos isolados após a utilização de BOX, ERIC e REP-PCR. Espécies de Botryosphaeriaceae assim como *C. gloeosporioides sensu lato* apresentam morfologia semelhante o que gera um desafio quando se tenta identificar as espécies existentes através de características morfológicas. A técnica rep-PCR pode então ser útil para auxiliar na diferenciação de espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*.

Nesse trabalho ERIC-PCR foi capaz de gerar bandas suficientes para diferenciar linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo, enquanto que o BOX-PCR não foi capaz de produzir bandas suficientes para isso. Além disso, a repetição das reações mostrou haver similaridade entre os perfis de bandas apresentados em ambas, revelando haver reprodutibilidade da técnica. Rademaker et al. (2000), sugerem que resultados mais significantes e consistentes podem ser obtidos através da combinação de dados obtidos a partir de BOX, ERIC e REP-PCR, já que o número total de bandas é aumentado. As análises de agrupamento realizadas utilizando dados combinados de BOX e ERIC-PCR não apresentaram resultados melhores em discriminar linhagens filogenéticas, já que o BOX-PCR não foi capaz de produzir bandas suficientes e nem específicas. O ERIC-PCR apresentou os melhores resultados em comparação ao BOX-PCR, e resultados semelhantes aos dados combinados de BOX e ERIC-PCR. Podendo então ser utilizado de forma independente das outras técnicas.

Estudos realizados sobre uma variedade de gêneros bacterianos têm revelado que dendrogramas derivados de marcas genômicas como BOX, ERIC e REP-PCR nem sempre são idênticos. Isto é para ser esperado, uma vez que diferentes números de bandas podem ser gerados com cada conjunto de

iniciadores, assim como a distribuição dos elementos alvo repetitivos em questão podem variar (RADEMAKER et al., 2000).

Arshiya et al. (2014), observaram que o BOX-PCR apresentou um maior número de bandas polimórficas quando comparadas com REP e ERIC-PCR e que as regiões REP e ERIC, pelo menos em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, são mais conservadas por isso não apresentaram elevado polimorfismo. Para os fungos do Complexo *C. gloeosporioides* o ERIC-PCR foi mais eficiente que o BOX-PCR na diferenciação através das bandas apresentadas. Algumas dificuldades na metodologia, como problemas no anelamento, ajuste na concentração de primers, entre outros podem ter ocorrido, o que poderia talvez justificar o baixo número de bandas obtidos pelo BOX-PCR nos fungos estudados (RADEMAKER et al., 2000).

Assim, a técnica ERIC-PCR pode ser útil no auxílio de identificação de linhagens filogenéticas de *C. gloeosporioides*, pois permite uma maior separação dessas linhagens com base no perfil de bandas apresentado. Quando se considera um grande número de isolados, a técnica pode ajudar na seleção e triagem de isolados com base nos perfis de bandas apresentado, reduzindo custos e tempo.

## CONCLUSÃO

Foram identificadas diferentes espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose em mandioca.

Foi identificada uma espécie não pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose em mandioca, sendo esta *C. civiae*.

A técnica ERIC-PCR foi a que apresentou o melhor resultado para a discriminação de linhagens filogenéticas dentro do complexo *C. gloeosporioides*.

Os dados combinados de ERIC e BOX-PCR não apresentaram resultados melhores que somente ERIC-PCR.

A utilização de BOX-PCR não apresentou resultados satisfatórios na diferenciação de isolados de *C. gloeosporioides*.

## AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, mais especificamente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura pelo financiamento do projeto e ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; ZOLFAGHARI, S. Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. **FEMS Microbiology Letters**, v. 361, p. 144–157, 2014.
- ARSHIYA, M.; SURYAWANSHI, A.; MORE, D.; BAIG, M. M. V. Repetitive PCR based detection of Genetic Diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* Strains. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 017-022, 2014.
- BARDAS, G. A.; KOUTITA, O.; TZAVELLA-KLONARI, K. Molecular diversity and assessment of biological characteristics of Greek *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 311–318, 2009.
- BEHNIA, M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; AMINIAN, H.; RAZAVI, M.; ALIZADEH, A. Population structure and sexual fertility of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* from citrus in Northern Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 18, p. 561-573, 2016.
- BRAGANÇA, C. A. D. SILVA, L. L.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, S. A. S. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, 2016a.
- BRAGANÇA, C. A. D.; DAMM, U.; BARONCELLI, R.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; CROUS, P. W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal biology**, v. 120, p. 547-561, 2016b.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553–556, 1999.
- DAHAGHIN, L.; SHAMS-BAKHSI, M. Identification and genetic diversity of pectolytic phytopathogenic bacteria of mono- and dicotyledonous ornamental plants in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 2, p. 271-279, 2014.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012a.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012b.
- DRAY, S.; DUFOUR, A. B. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software**, v. 22, n. 4, p 1-20, 2007.
- FOX, J. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. **Journal of Statistical Software**, v. 14, n. 9, p. 1-42, 2005.



- FREEMAN, S., KATAN, T. & SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.
- GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, p. 872-895, 2003.
- HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**. v. 2, p. 60-61, 2011..
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.
- MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 253–263, 2004.
- MANTEL, N. Detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.
- NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECES, E.; WAGNER, H. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.3-4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2016.
- OLIVEIRA, S. A. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; SILVA L. L. 2016. First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on the wild cassava species *Manihot dichotoma* and *M. epruinosa*. **Plant disease**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1136-PDN>
- PINWEHAA, N.; ASVARAKA, T.; VIBOONJUNB, U.; NARANGAJAVANAA, J. Involvement of miR160/miR393 and their targets in cassava responses to anthracnose disease. **Journal of Plant Physiology**, v. 174, p. 26–35, 2015.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <http://www.R-project.org/>.
- RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665–677, 2000.

- RAMDIAL, H.; RAMPERSAD, S. N. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 37-49, 2015.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- SUZUKI, T.; TANAKA-MIWA, C.; EBIHARA, Y.; ITO, Y.; UEMATSU, S. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne). **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p. 247–253, 2010.
- TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2987–2998, 2005.
- TALHINHAS, P.; GONÇALVES, E.; SREENIVASAPRASAD, S.; OLIVEIRA, H. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 73- 83, 2015.
- TAMURA, K., STECHER, G. PETERSON, D. FILIPSKI, A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p. 2725-2729, 2013.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823–6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNIEDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VILA NOVA, M. X. et al. Pathogenicity for onion and genetic diversity of isolates of the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Phyllachoraceae) from the State of Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research** v. 10, p. 311–320. 2011.
- WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

---

## CAPÍTULO 3

**Diferenciação de linhagens filogenéticas do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* associadas a antracnose da mandioca com base no PCR-RFLP do gene da Calmodulina (CAL).**

---

**Diferenciação de linhagens filogenéticas do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* associados a antracnose da mandioca com base no PCR-RFLP do gene da Calmodulina (CAL).**

**L. L. Silva<sup>a</sup>, C. A. D. Bragança<sup>a</sup>, K. N. Pestana<sup>b</sup>, C. F. Ferreira<sup>b</sup>, S. A. S. Olveira<sup>b</sup>,**

<sup>a</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710 44380-00, Cruz das Almas, Brasil; <sup>b</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n 44380-000, Cruz das Almas, Brasil.

## **RESUMO**

A antracnose é uma doença que afeta várias culturas ao redor do mundo provocando perdas significativas. Dentre as culturas afetadas por essa doença está a mandioca. A identificação do agente causal dessa doença é fundamental para a tomada de decisões sobre as medidas de controle que podem ser utilizadas. Para tanto, análises *in silico* foram conduzidas utilizando-se sequências dos genes da actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS) e  $\beta$ -tubulina (TUB2) de espécimes-tipo pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* juntamente com 23 enzimas de restrição para identificar qual região e enzimas possibilitariam um polimorfismo suficiente para diferenciar as espécies do. A região e enzimas escolhidas foram testadas em 18 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de mandioca em diferentes regiões produtoras da Bahia. As regiões que possuíam sítios de clivagem para a maioria das enzimas foram CAL, ITS e TUB2. As enzimas de restrição AluI, BsuRI, HinfI, HhaI, MspI e TaqI foram as que apresentaram melhor resultado. As regiões CAL, TUB2 e GAPDH apresentaram maior grau de polimorfismo, e por consequência, uma maior capacidade de separação dos haplótipos em relação ao esperado (com base nas árvores filogenéticas para cada um dos genes), em comparação com as regiões CHS-1, ACT e ITS. Comparando os dendrogramas e as árvores filogenéticas obtidas para todas as regiões, o gene CAL apresentou um maior número de subdivisões sendo possível a separação de um maior número de linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo. Os padrões observados nas análises *in gel* foram os mesmos padrões esperados das análises *in silico*. A combinação dos dados das análises *in silico* e *in gel* para permitiu a diferenciação de linhas filogenéticas dentro do complexo *C. gloeosporioides*, mostrando-se portanto eficiente podendo ser utilizada como ferramenta de auxílio na identificação.

Palavras-chave: *Colletotrichum* spp.; Complexo de espécies; DNA polimórfico; DNA fingerprint.

## ABSTRACT

Anthrachnose is a disease that affects different cultures worldwide, causing significant losses, being cassava one of the most affected culture by this disease. The identification of the causal agent of the disease is critical for decision-making on control measures that can be used. Therefore, *in silico* analyzes were conducted with sequences of the ex-Types belonging to the complex *C. gloeosporioides*, using the actin (ACT), calmodulin (CAL) synthase chitin (CHS-1), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) internal transcribed spacer (ITS) and  $\beta$ -tubulin (TUB2) regions, with 23 restriction enzymes to identify which region and enzymes would allow a sufficient polymorphism to distinguish between species. The region chosen and enzymes were tested at 18 *Colletotrichum* spp. obtained from cassava in different producing regions of Bahia state, Brazil. The regions possessing restriction sites for most of the enzymes were CAL, STI and TUB2. The Enzymes AluI; BsuRI; HinfI; MspI; TaqI and HhaI showed the best result for the restriction of the different regions. CAL, TUB2 and GAPDH genes showed a higher degree of polymorphism, and therefore, a greater separation capacity of haplotypes, when compared to what was expected (based on phylogenetic trees for each gene), in comparison to the CHS-1 ; ACT and ITS regions . Comparing dendrograms and phylogenetic trees obtained for all regions, CAL gene presented a higher number of subdivisions is possible to separate a larger number of strains belonging to the phylogenetic complex. The patterns observed in the *in gel* analysis were the same expected of *in silico* analysis. The combination of data from analysis *in silico* and *in gel* allowed the differentiation of phylogenetic lineages within the complex *C. gloeosporioides*, being an efficient tool that can be used for identification purposes.

Keywords: *Colletotrichum* spp.; Species complex; Polymorphic DNA; DNA fingerprint.

## INTRODUÇÃO

A antracnose da mandioca é considerada uma das principais doenças dessa cultura, sendo causada por *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* (PINWEHA et al., 2015). Assim como em outras culturas a sua identificação baseava-se no isolamento do patógeno e comparação de características morfológicas (CAI et al., 2011). Diversas culturas já foram identificadas com antracnose causada por *C. gloeosporioides*, assim como uma mesma cultura sendo afetada por mais de uma espécie desse gênero (FREEMAN et al., 1998).

A similaridade fenotípica existente entre espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* e até mesmo entre outras espécies, dificulta a identificação precisa do agente causal da doença (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Além disso, as características morfológicas utilizadas na identificação podem ser perdidas ou mudadas devido a fatores ambientais ou manipulação excessiva em laboratório (SCHENA et al., 2013). No intuito de um melhor esclarecimento sobre o patógeno,

ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas dando suporte na identificação de fungos.

Técnicas baseadas na análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) foram bastante utilizadas para estudar a diversidade e auxiliar na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (KELEMU et al., 1999; VILA NOVA et al., 2011). Com os avanços na área de taxonomia, o sequenciamento de regiões do genoma de diversos micro-organismos vem sendo uma ferramenta útil e constantemente utilizada para esclarecer relações entre espécies. O uso de mais de uma região tem sido indicado para uma maior confiabilidade na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo comumente utilizadas as regiões actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS) e  $\beta$ -tubulina (TUB2) (CANNON et al., 2012). No entanto, devido aos custos elevados do sequenciamento, outras técnicas baseadas no polimorfismo existente em regiões do genoma podem ser um auxílio na pré-seleção para o sequenciamento.

Entre as análises que podem ser utilizadas, o PCR-RFLP tem se mostrado útil na diferenciação de algumas espécies de *Colletotrichum* baseando-se no polimorfismo existente em regiões do DNA amplificado após a clivagem com enzimas de restrição (MAHARAJ; RAMPERSAD, 2012; TAPIA-TUSSELL et al., 2008). Até mesmo para o complexo *C. gloeosporioides*, testes *in silico* tem mostrado que é possível distinguir espécies baseando-se nos perfis de banda apresentados (RAMDEEN; RAMPERSAD, 2013).

Embora o fungo *C. gloeosporioides* f. sp. *manihot* vem sendo relatado como responsável pela antracnose da mandioca, ainda são escassos estudos que caracterizem patógenos relacionados a essa doença (WILLIAM et al., 2012). No entanto, até o momento foram descritas duas espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* causando a mesma doença em espécies do gênero *Manihot* no Brasil, sendo *C. fructicola* em espécie cultivada (*Manihot esculenta* Crantz) e *C. tropicale* em espécies silvestres (*Manihot* spp.) (BRAGANÇA et al., 2016; OLIVEIRA; BRAGANÇA; SILVA, 2016).

O manejo da antracnose pode ser um problema sério, devido tanto a ampla gama de hospedeiro susceptíveis quanto a variação na resistência do patógeno a determinados fungicidas (LIMA et al., 2015). A identificação de espécies é importante tanto para auxiliar os programas de melhoramento genético vegetal,

quanto para possibilitar o desenvolvimento de medidas de controle adequadas para a doença (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica PCR-RFLP como ferramenta que possa ser utilizada para diferenciar espécies do complexo *C. gloeosporioides* e auxiliar na identificação, com base na seleção de uma região do genoma e de enzimas de restrição que apresentem um maior poder discriminatório. Além disso, avaliar e validar uma nova metodologia de identificação de linhagens filogenéticas do complexo, com base na comparação entre os padrões de banda esperados na análise *in silico* e dos observados (*in gel*).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos isolados**

Foram coletados folhas, caules e frutos de mandioca com sintomas de antracnose em áreas de produção localizadas na região do Recôncavo da Bahia e no banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O material vegetal coletado foi fragmentado entre área do tecido necrosado e assintomático e desinfestado superficialmente por meio de imersão em álcool etílico 70% por 1 min e em seguida imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 min, em seguida lavadas com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e mantidas em estufas incubadoras B.O.D. (Biochemical oxygen demand) a  $25\pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 h, por um período de quatro a cinco dias. Após o aparecimento das colônias, estas foram transferidas para novas placas. Culturas monospóricas obtidas de todos os isolados foram testadas quanto a patogenicidade e preservadas pelo método Castellani em microtubos e em DMSO 15% ultra-freezer (-80 °C) (TABELA 1).

### **Extração de DNA**

As culturas monospóricas foram crescidas em meio líquido sacarose-extrato de levedura (10 g sacarose, 2 g extrato de levedura, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,44 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1000 mL de água destilada) por 10-15 dias. Após esse período, o micélio foi filtrado, seco, macerado com nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistílo. O produto macerado foi transferido para microtubos

plásticos de 2,0 mL e adicionou-se 700 µL do tampão de extração (1 % CTAB, 20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, 0,7 M NaCl e 10 µL β-mercaptoetanol), seguido de incubação das amostras em banho maria a 65 °C por 45 min, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (v:v), e centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O Sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 500 µL de isopropanol e 100 µL de acetato de sódio, e centrifugado a 10.000 rpm por 12 min. Por fim, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, secado em temperatura ambiente, resuspendido com TE (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA) e 2 µL de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>) e incubado a 37 °C por uma hora.

Após a extração, a solução contendo DNA genômico foi armazenada a -20 °C. A qualidade e quantidade de DNA foram mensuradas por comparação visual com o DNA do fago lambda na concentração de 50 e 100 ng, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% adicionado brometo de etídio (1,5 µL.100ml<sup>-1</sup>).

### **Análise RFLP *in silico***

Análises de RFLP foram simuladas em computador utilizando sequências das regiões: actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), gliceraldeído-3-fostafo desidrogenase (GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS) e β-tubulina (TUB2) de espécimes-tipo pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) disponíveis no GenBank (TABELA 2). As sequências foram alinhadas com auxílio do programa MUSCLE implementado no MEGA6 (TAMURA et al., 2013), e editadas manualmente quando necessário. Em seguida, foi realizada análise *in silico* das sequências obtidas utilizando-se a ferramenta “*In silico* Simulation of Molecular Biology Experiments” para obter os padrões de clivagem para as enzimas de restrição testadas (SAN MILLÁN et al., 2013). Foram avaliadas as enzimas AluI, BamHI, Bgl II, BsuRI, EcoRI, HhaI, HindIII, HinfI, HpaI, KpnI, MseI, MspI, NcoI, NotI, PstI, PvuII, RsaI, SacI, Sall, SmaI, TaqI XbaI, XhoI. Após a clivagem *in silico*, o produto foi observado em gel virtual de agarose 2,0 % com as imagens produzidas pelo programa pDRAW32 v. 1.1.130.



**Tabela 1.** Origem e identificação dos isolados utilizados.

Espécie	Isolado	Local de origem	Hospedeiro	Orgão	Nº genbank		
					CAL	CHS-1	GAPDH
-	2F2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	3F3.2	Castro Alves/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	18F3	Cabaceiras do Paraguaçu/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	24F4	Conceição de Feira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	28F5	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	28F6	Dom Macedo Costa/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	33F10	Conceição do Almeida/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	39FR1	São Félix/Ba	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Fruto	-	-	-
-	40C4	Muniz Ferreira/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Caule	-	-	-
-	48F4	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
-	PPAM09	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	-	-	-
<i>C. tropicale</i>	PPAM 02	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot epruinosa</i>	Folha	KP763671	KP763678	KP763684
<i>C. tropicale</i>	PPAM 05	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot dichotoma</i> Ule	Folha	KP763672	KP763679	KP763686
<i>C. gloeosporioides</i>	PPAM 06	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot sp.</i>	Folha	KP763673	KP763680	KP763687
<i>C. siamense</i>	PPAM 08	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot carthaginensis</i> (Jacq.) Mull. Arg.	Folha	KP763674	KP763681	KP763688
<i>C. fructicola</i>	PPAM 10	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	KP763675	KP763682	KP763689
<i>C. fructicola</i>	PPAM 13	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Folha	KP763676	*	KP763690
<i>C. siamense</i>	PPAM 15	Cruz das Almas/BA	<i>Manihot tomentosa</i> Pohl	Folha	KP763677	KP763683	KP763691

(-) Não identificados. (\*) Sequência não depositada.

**Tabela 2.** Espécimes-tipo e sequências utilizadas.

Espécie	Clado	Nomeclatura adotada	Isolado	ITS	Número de acesso Genbank				
					GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB2
<i>C. aenigma</i>	m	<i>C.aenigma</i>	ICMP 18608	JX010244	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010389
<i>C. aeschynomenes</i>	m	<i>C.aeschynomenes</i>	ICMP 17673	JX010176	JX009930	JX009721	JX009483	X009799	JX010392
<i>C. alatae</i>	-	<i>C.alatae</i>	CBS 304.67	JX010190	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010383
<i>C. alienum</i>	m	<i>C.alienum</i>	ICMP 12071	JX010251	JX010028	JX009654	JX009572	JX009882	JX010411
<i>C. aotearoa</i>	k	<i>C.aotearoa</i>	ICMP 18537	JX010205	JX010005	JX009611	JX009564	JX009853	JX010420
<i>C. asianum</i>	-	<i>C.asianum</i>	ICMP 18580	FJ972612	JX010053	FJ917506	JX009584	JX009867	JX010406
<i>C. clidemiae</i>	k	<i>C.clidemiae</i>	ICMP 18658	JX010265	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010438
<i>C. cordylinicola</i>	k	<i>C.cordylinicola</i>	MFLUCC 090551	JX010226	JX009975	HM470238	HM470235	JX009864	JX010440
<i>C. fructicola</i>	m	<i>C.fructicola.C1</i>	ICMP 18581	JX010165	JX010033	FJ917508	FJ907426	JX009866	JX010405
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>C. ignotum</i> )	m	<i>C.fructicola.C2</i>	CBS 125397	JX010173	JX010032	JX009674	JX009581	JX009874	JX010409
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>minor</i> )	m	<i>C.fructicola.C3</i>	CBS 238.49	JX010181	JX009923	JX009671	JX009495	JX009839	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	-	<i>C.gloeosporioides.C1</i>	IMI 356878	JX010152	JX010056	JX009731	JX009531	JX009818	JX010445
<i>C. gloeosporioides</i> (syn. <i>Gloeosporium pedemontanum</i> )	-	<i>C.gloeosporioides.C2</i>	CBS 273.51	JX010148	JX010054	JX009745	JX009558	JX009903	
<i>C. horii</i>	-	<i>C.horii</i>	NBRC 7478	GQ329690	GQ329681	JX009604	JX009438	JX009752	JX010450
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	k	<i>C.kahawaesubsp.C1</i>	ICMP 18539	JX010230	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010434
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i> )	k	<i>C.kahawaesubsp.C2</i>	CBS 237.49	JX010238	JX010042	JX009636	JX009450	JX009840	JX010432
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella rufomaculans</i> var. <i>vaccinii</i> )	k	<i>C.kahawaesubsp.C3</i>	CBS 124.22	JX010228	JX009950	JX009744	JX009536	JX009902	JX010433
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	k	<i>C.kahawaesubsp.C4</i>	IMI 31941	JX010231	JX010012	JX009642	JX009452	JX009813	JX010444

**Tabela 2.** continuação.

Espécie	Clad o	Nomeclatura adotada	Isolado	ITS	GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB2
<i>C. musae</i>	m	<i>C.musae</i>	CBS 116870	JX010146	JX010050	JX009742	JX009433	JX009896	HQ59628 0
<i>C. nupharicola</i>	m	<i>C.nupharicola</i>	CBS 470.96	JX010187	JX009972	JX009663	JX009437	JX009835	JX010398
<i>C. psidii</i>	k	<i>C.psidii</i>	CBS 145.29	JX010219	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010443
<i>C. queenslandicum</i>	m	<i>C.queenslandicum</i>	ICMP 1778	JX010276	JX009934	JX009691	JX009447	JX009899	JX010414
<i>C. salsolae</i>	m	<i>C.salsolae</i>	ICMP 19051	JX010242	JX009916	JX009696	JX009562	JX009863	JX010403
<i>C. siamense</i>	m	<i>C.siamense.C1</i>	ICMP 18578	JX010171	JX009924	FJ917505	FJ907423	JX009865	JX010404
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i> )	m	<i>C.siamense.C2</i>	CBS 125378	JX010278	JX010019	JX009709	GQ856775	GQ856730	JX010410
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. jasmini-sambac</i> )	m	<i>C.siamense.C3</i>	CBS 130420	HM131511	HM13149 7	JX009713	HM131507	JX009895	JX010415
<i>C. theobromicola</i>	-	<i>C.theobromicola.C1</i>	CBS 124945	JX010294	JX010006	JX009591	JX009444	JX009869	JX010447
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i> )	-	<i>C.theobromicola.C2</i>	CBS 142.31	JX010286	JX010024	JX009592	JX009516	JX009830	JX010373
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>stylosanthis</i> )	-	<i>C.theobromicola.C3</i>	MUCL 42294	JX010289	JX009962	JX009597	JX009575	JX009821	JX010380
<i>C. ti</i>	k	<i>C.ti</i>	ICMP 4832	JX010269	JX009952	JX009649	JX009520	JX009898	JX010442
<i>C. tropicale</i>	m	<i>C.tropicale</i>	CBS 124949	JX010264	JX010007	JX009719	JX009489	JX009870	JX010407
<i>C. xanthorrhoeae</i>	-	<i>C.xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094	JX010261	JX009927	JX009653	JX009478	JX009823	JX010448
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i> *	k	<i>G.cingulata</i>	ICMP 10643	JX010224	JX009908	JX009630	JX009540	JX009891	JX010436

(\*) Não possui espécime-tipo; (-) Não pertence a nenhum clado; (m) Pertence ao clado musae; (k) Pertence ao clado kahawae de acordo com Weir, Johnston e Damm (2012).

## PCR-RFLP

A amplificação parcial da calmodulina foi obtida a partir da técnica de PCR com a utilização dos *primers* CL1C (5'-GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC-3') e CL2C (5'-CTT CTG CAT CAT GAG CTG GAC-3') (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). As reações de PCR possuíam um volume de 80  $\mu$ L contendo 1X do tampão, 2 mM  $MgCl_2$ , 20  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2 mM de cada *primer*, 3 U Taq DNA polimerase, 150 ng de DNA e água mili-Q (q.s.p. 80  $\mu$ L). Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi usado marcador TIAGEN plus 1 Kb DNA Ladder.

Os produtos de amplificação foram submetidos à clivagem separadamente com as enzimas de restrição AluI, BsuRI, TaqI, MspII, HhaI e HinfI. Cada reação de clivagem continha 10  $\mu$ L do produto de amplificação, 1x do tampão, 5 U da enzima e água mili-Q (q.s.p. 20  $\mu$ L). A clivagem foi realizada por 4 h a 37 °C para as enzimas AluI, BsuRI, Hha II, Hinf I e MspII, e a 65 °C para a enzima TaqI. Os produtos de clivagem foram verificados em gel de agarose 2% sob 80 V por 4 h contendo tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio (2,4  $\mu$ L .100ml<sup>-1</sup>) e fotografado sob incidência de luz ultravioleta. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA foi utilizado o marcador molecular Biolabs 50 bp DNA Ladder.

## Análise dos dados

Os padrões de bandas esperados (*in silico*) pela restrição das regiões de interesse utilizando diferentes enzimas foram utilizadas para a construção de matrizes binárias, sendo '0' = ausência de bandas e "1" = presença de banda. As matrizes binárias foram convertidas em matrizes de distância genética de Nei (NEI, 1972) com auxílio do programa GenAlex versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) implementados em planilha Excel. Dendrogramas foram gerados para as combinações entre regiões e enzimas selecionadas. O agrupamento dos indivíduos foi baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com bootstrap de 1.000 repetições, com auxílio do pacote POPPR (KAMVAR et al., 2014) implementado no software R (R CORE TEAM, 2015).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbor Joining, utilizando-se o modelo Kimura dois parâmetros e bootstrap de 10.000 gerações, utilizado do software MEGA6.

Para as análises de polimorfismo presente nas sequências, foi utilizado o programa DNA Sequence Polymorphism 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

### **Validação de árvore “híbrida”**

Para a confirmação dos testes *in silico*, os padrões de bandas esperados (análise *in silico*) da região CAL para quatro indivíduos de espécies diferentes, identificados via análise multilocus, foram comparados com os padrões observados em gel de agarose após a eletroforese (análise *in gel*). Um novo dendrograma foi construído utilizando os padrões de bandas observados (*in gel*) de todos os isolados juntamente com os padrões de banda esperados (*in silico*) dos espécimes-tipo. A possibilidade de identificação de linhagens filogenéticas por análise “híbrida” foi testada, quando os padrões esperados na análise *in silico* para os espécimes-tipo foram utilizados em conjunto com os padrões observados para as análises *in gel*, a fim de possibilitar uma nova estratégia de identificação prévia da linhagem filogenética com base no padrão esperado para cada espécie.

## **RESULTADOS**

Após a edição, as sequências continham tamanhos entre 730-740 pb para CAL, 590-600 pb para ITS, 280-290 pb para ACT, 299 pb para CHS-1, 270-295 pb para GAPDH e 685-710 pb para TUB2. As extremidades de cada sequência foram editadas para que fossem semelhantes em tamanho para todos os isolados. Ao longo das sequências, as inserções e deleções foram mantidas. Do total de 23 enzimas de restrição testadas, sete (AluI, BsuRI, HinfI, MseI, MspI, RsaI e TaqI) foram capazes de clivar todas as regiões gênicas utilizadas, apenas a enzima HhaI foi capaz de clivar cinco das seis regiões gênicas (TABELA 3).

As regiões que mais apresentaram sítios de clivagem foram CAL, TUB2 e ITS em que respectivamente 73%, 69% e 65% das 23 enzimas testadas reconheceram sítios de clivagem nos fragmentos analisados. Dentre todas as enzimas testadas, AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI foram escolhidas para as demais análises.

As enzimas apresentaram números distintos haplótipos máximos para as diferentes regiões analisadas (TABELA 4). Para a região ITS o maior número de haplótipos foi obtido por AluI com três haplótipos, enquanto que para as demais

enzimas foi obtido o máximo de dois haplótipos. Para a região GAPDH a enzima BsuRI possibilitou nove haplótipos distintos e as demais enzimas geraram no mínimo três haplótipos. Para a CAL nove haplótipos foram obtidos pela enzima HinfI, e as demais enzimas apresentaram no mínimo quatro haplótipo. Tanto para a ACT quanto para o CHS-1 quatro das seis enzimas testadas apresentaram somente dois haplótipos. Para a TUB2 a enzima TaqI apresentou 8 haplótipos, e o mínimo de haplótipos foi obtido com a enzima Alu, gerando dois.

**Tabela 3.** Reconhecimento de sítios de clivagem pelas enzimas de restrição nas regiões gênicas utilizadas.

Enzimas de restrição	Regiões					
	ITS	GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB2
AluI	+	+	+	+	+	+
BamHI	+	-	+	-	-	-
Bgl II	-	-	-	+	-	-
BsuRI	+	+	+	+	+	+
EcoRI	+	-	+	-	-	-
HhaI	+	-	+	+	+	+
HindIII	-	+	+	-	-	-
HinfI	+	+	+	+	+	+
HpaI	+	-	-	+	+	-
KpnI	-	-	-	-	-	+
MseI	+	+	+	+	+	+
MspI	+	+	+	+	+	+
NcoI	-	+	+	+	-	+
NotI	-	-	-	-	-	-
PstI	-	-	+	+	-	+
PvuII	+	-	+	-	-	+
RsaI	+	+	+	+	+	+
SacI	+	-	+	-	-	+
SalI	+	-	+	-	-	+
SmaI	+	-	-	-	-	-
TaqI	+	+	+	+	+	+
XbaI	-	-	-	-	-	-
XhoI	+	+	+	-	-	+

(+) Presença de clivagem; (-) ausência de clivagem.

**Tabela 4.** Número de haplótipos máximos produzidos pelas diferentes enzimas de restrição em cada região gênica.

Enzimas de restrição	Região					
	ITS	GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB2
AluI	3	4	6	1	2	2
BsuRI	2	9	6	2	1	6
HhaI	2	-	4	2	2	3
HinfI	1	3	9	2	2	3
MspI	2	4	4	4	2	6
TaqI	1	3	6	2	1	8

(-) ausência de clivagem.

As regiões analisadas apresentaram variações com relação ao polimorfismo existente e ao número de haplótipos observados (TABELA 5). Considerando todas as sequências utilizadas, as regiões GAPDH, TUB2 e CAL apresentaram um maior polimorfismo e um maior número de haplótipos observados em relação as regiões ITS, ACT e CHS-1.

Considerando o número de locus polimórficos produzidos pelo uso das enzimas de restrição, as regiões GAPDH, TUB2 e CAL apresentaram um maior número de locus polimórficos do que as regiões ITS, ACT e CHS-1. A região CAL foi a que apresentou o maior número de locus polimórficos, 32 locus, sendo possível a obtenção de 19 haplótipos diferentes. Para a região TUB2 houve a presença de 20 locus polimórficos e a diferenciação de 18 haplótipos. A região GAPDH apresentou uma maior razão entre o número de locus polimórficos e número total de locus, contudo, houve a diferenciação de apenas 14 dos 33 haplótipos esperados.

Árvores filogenéticas foram construídas para cada região utilizando as sequências obtidas dos espécimes-tipo. Dendrogramas foram construídos com as mesmas regiões, sendo estas clivadas com as enzimas selecionadas (FIGURAS 1 e 2). Os dendrogramas construídos a partir das regiões ITS, CHS-1 e ACT apresentaram baixo número de subdivisões intraespecíficas, quando comparados entre si, com as demais regiões e com as árvores filogenéticas das suas respectivas regiões. Espécies distantes dentro do complexo foram reunidas em um mesmo clado tanto nas árvores quanto nos dendrogramas, além disso os demais clados formados não refletem a proximidade entre indivíduos e nem permite a diferenciação dos mesmos.

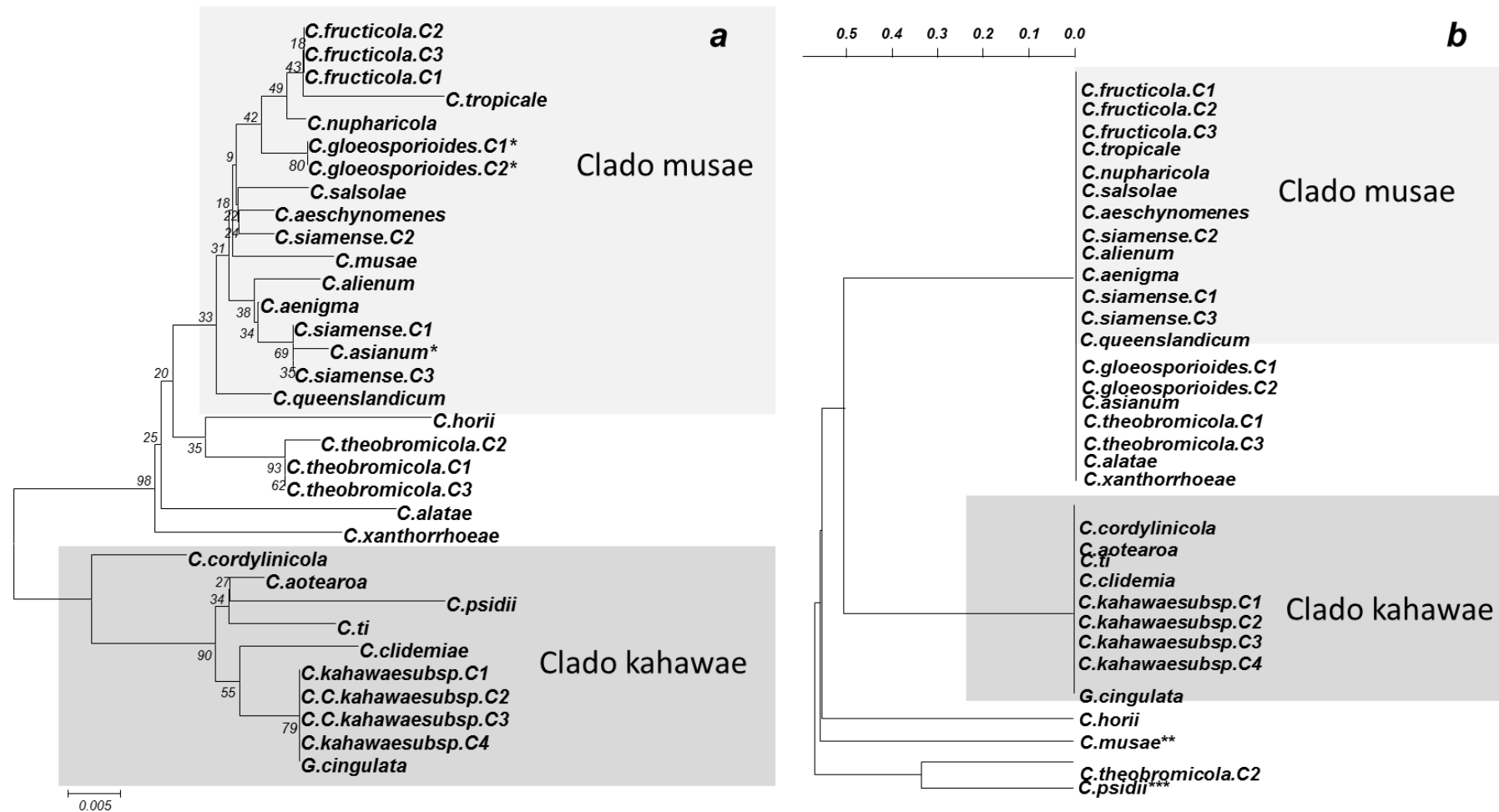
As regiões que apresentaram um maior número de subdivisões foram CAL, GAPDH e TUB2. Para todas as regiões houve a formação de dois grandes clados existentes no complexo *C. gloeosporioides* (Clado musae e Clado kahawae). As análises de PCR-RFLP *in silico* das regiões GAPDH e TUB2 mostraram agrupamento de alguns indivíduos que não possuem proximidade. A região CAL foi a que apresentou melhor distinção entre os indivíduos do complexo, e uma maior similaridade com a árvore filogenética construída utilizando a mesma região. Ocorreu o agrupamento de espécies em um mesmo clado, no entanto filogeneticamente esses indivíduos são mais relacionados, diferenciando desta forma, as principais linhagens filogenéticas existentes dentro do complexo *C. gloeosporioides*.



**Tabela 5.** Polimorfismo e número de haplótipos esperados e observados para cada uma das seis regiões gênicas de todos os isolados espécimes-tipo, com base na análise do padrão de restrição e das sequências de nucleotídeos de cada região gênica.

Região	Isolados	Espécies	Nº de Enzimas	Total de locus	Locus polimórficos	Razão Lp/TI	Haplótipos esperados	Haplótipos observados
ITS	33	23	6	34 (614*)	5 (34*)	0,1471 (0,0554*)	33	6 (21*)
GAPDH	33	23	5	26 (310*)	21 (103*)	0,8077 (0,3323*)	33	14 (27*)
CAL	33	23	6	50 (760*)	32 (227*)	0,6400 (0,2987*)	33	19 (27*)
ACT	33	23	6	17 (314*)	7 (55*)	0,4118 (0,1752*)	33	6 (25*)
CHS-1	33	23	6	10 (299*)	4 (51*)	0,4000 (0,1706*)	33	6 (24*)
TUB2	32	23	6	32 (732*)	20 (231*)	0,6250 (0,3156*)	32	18 (28*)

(TI) total de locus; (Lp) Locus polimórficos; (\*) Valores entre parêntese e com asterisco referentes às sequências de nucleotídeos.



**Figura 1.** Comparação entre a distribuição esperada das linhagens filogenéticas para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, com base na análise filogenética dos genes CHS-1 (a), ITS (c) e ACT (e) e agrupamento com base no padrão de restrição dos mesmos genes CHS-1 (b), ITS (d) e ACT (f) com as enzimas AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI de espécimes-tipo. Árvores filogenéticas construídas pelo método Neighbor Joining, utilizando o modelo Kimura dois parâmetros e bootstrap de 10.000 gerações. Dendrogramas gerados a partir dos dados de distância genética de Nei baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com bootstrap de 1.000 repetições. (\*) Não pertence a nenhum clado; (\*\*) Pertence ao clado musae; (\*\*\*) Pertence ao clado kahawae.

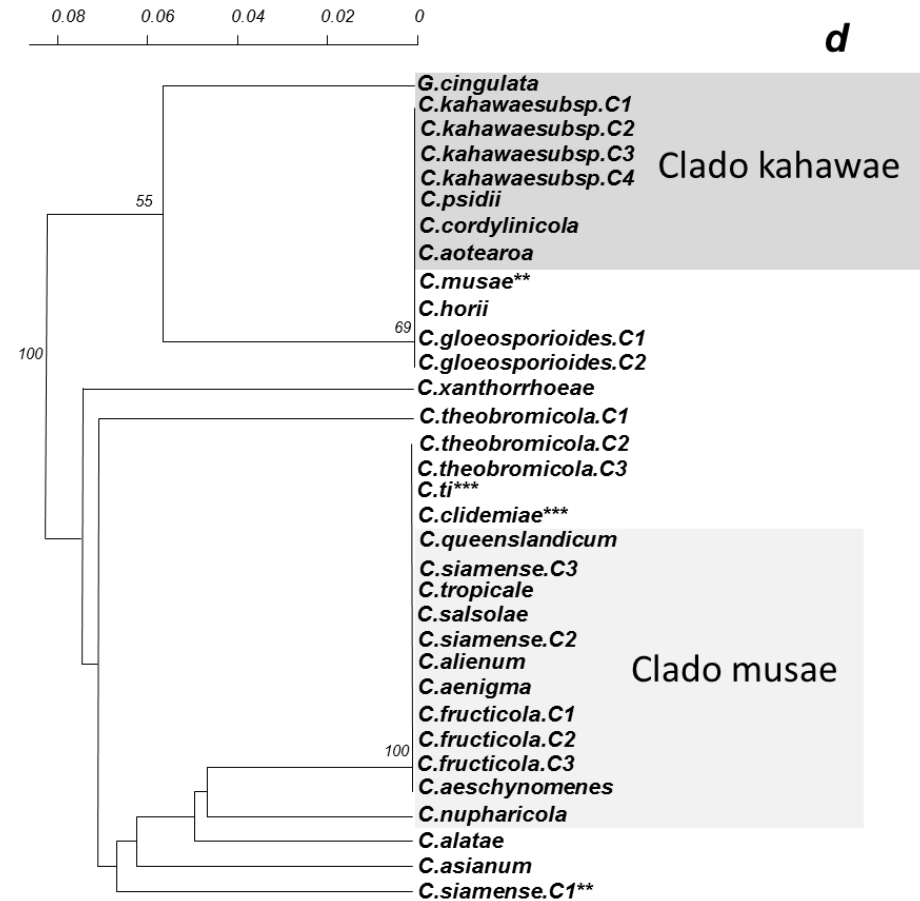
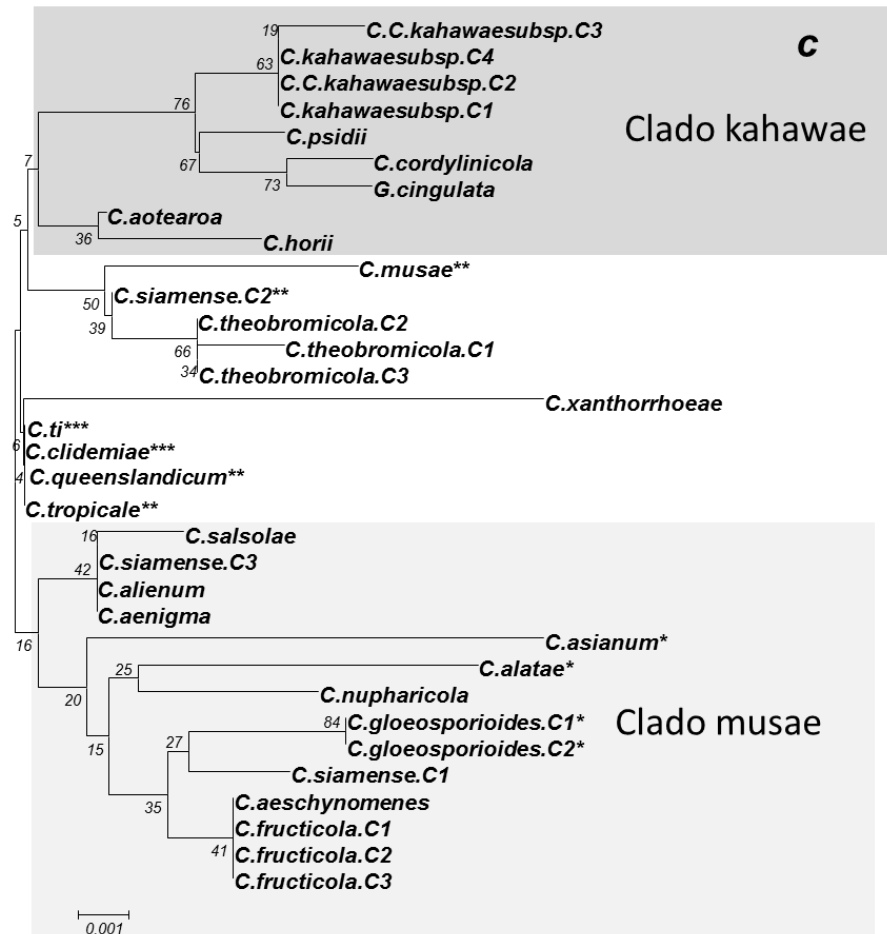


Figura 1. Continuação.

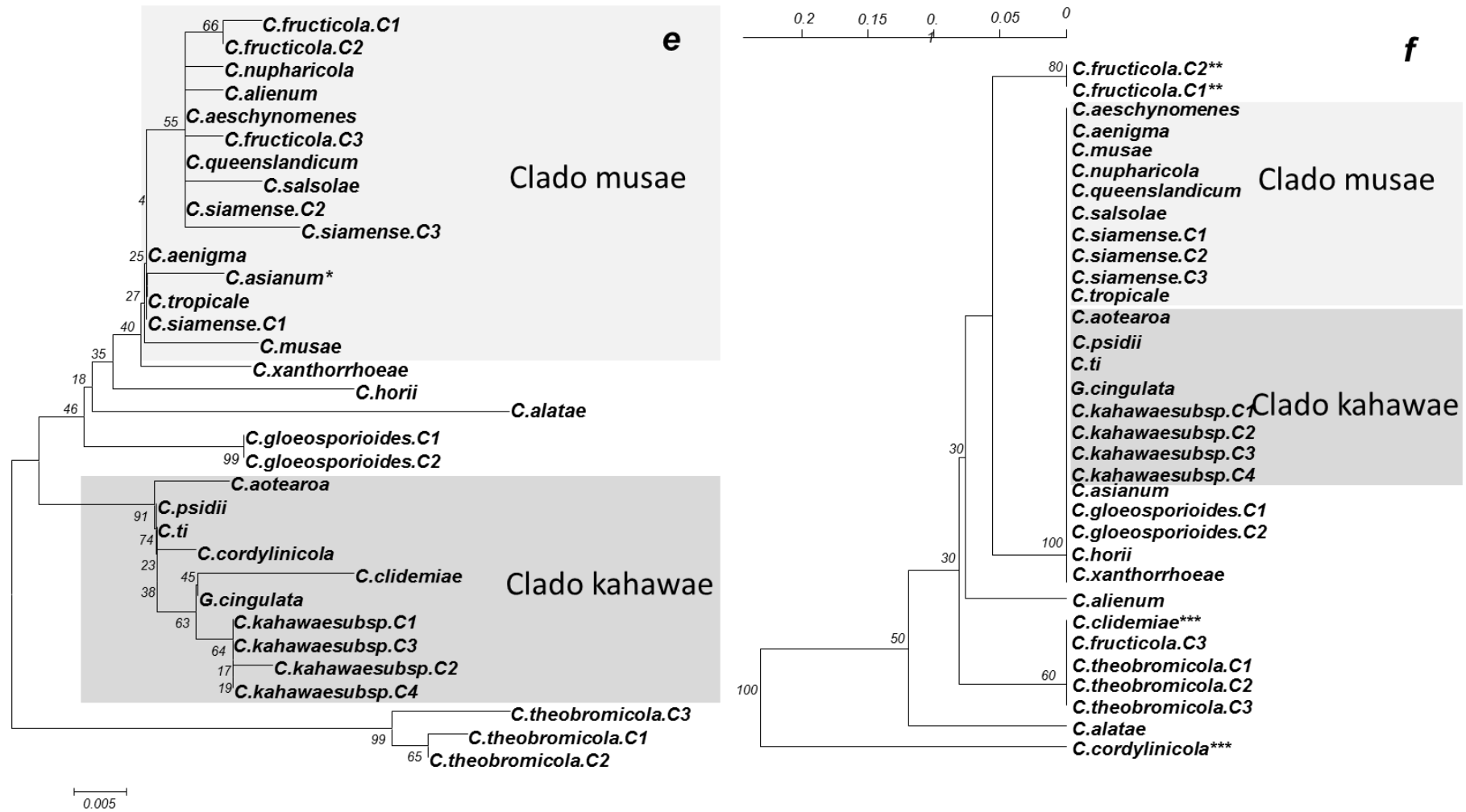
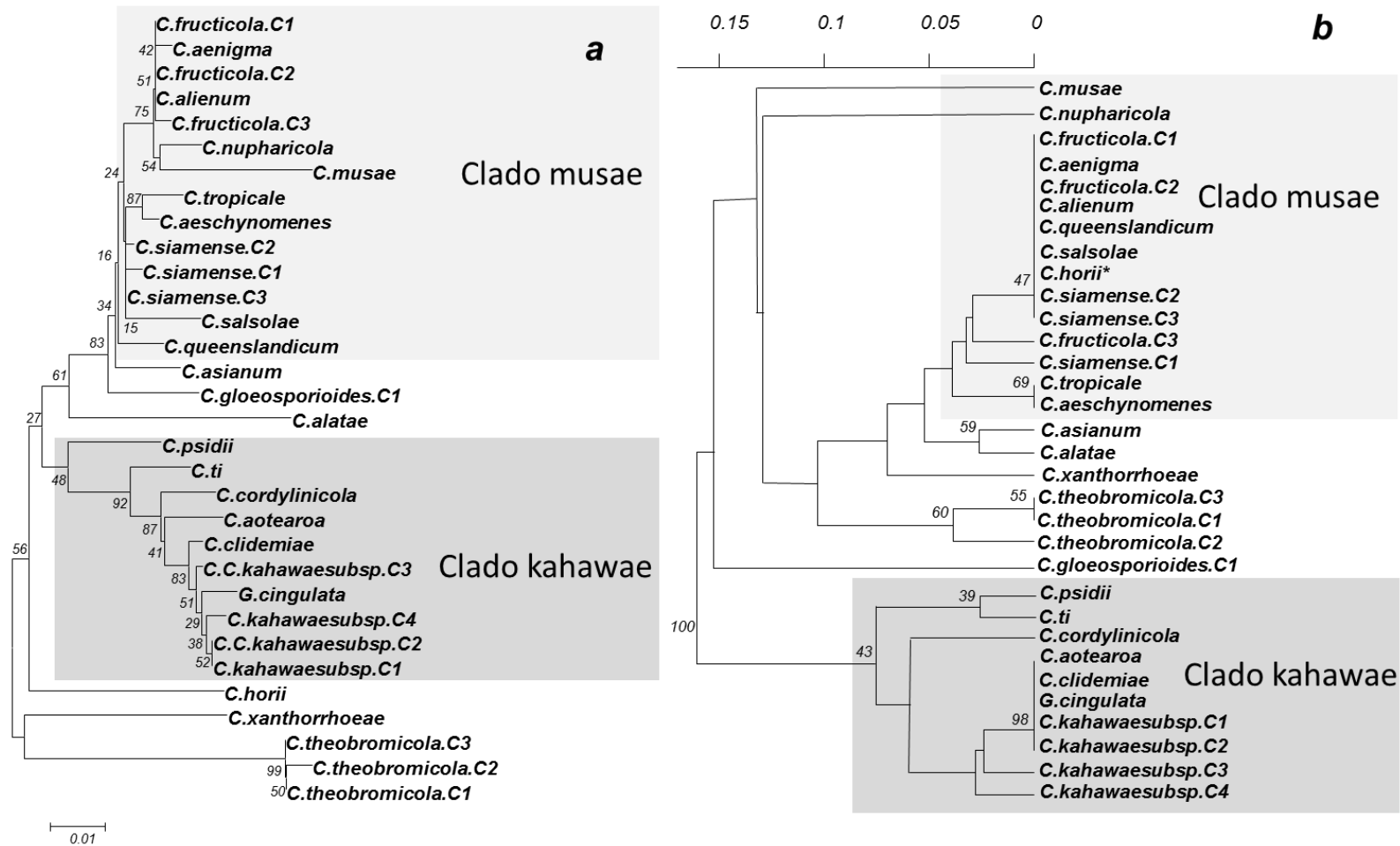


Figura 1. Continuação.



**Figura 2.** Comparação entre a distribuição esperada das linhagens filogenéticas para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, com base na análise filogenética dos genes TUB2 (a), GAPDH (c) e CAL (e) e agrupamento com base no padrão de restrição dos mesmos genes TUB2 (b), GAPDH (d) e CAL (f) com as enzimas AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI de espécimes-tipo. Árvores filogenéticas construídas pelo método Neighbor Joining, utilizando o modelo Kimura dois parâmetros e bootstrap de 10.000 gerações. Dendrogramas gerados a partir dos dados de distância genética de Nei baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com bootstrap de 1.000 repetições (\*) Não pertence a nenhum clado.

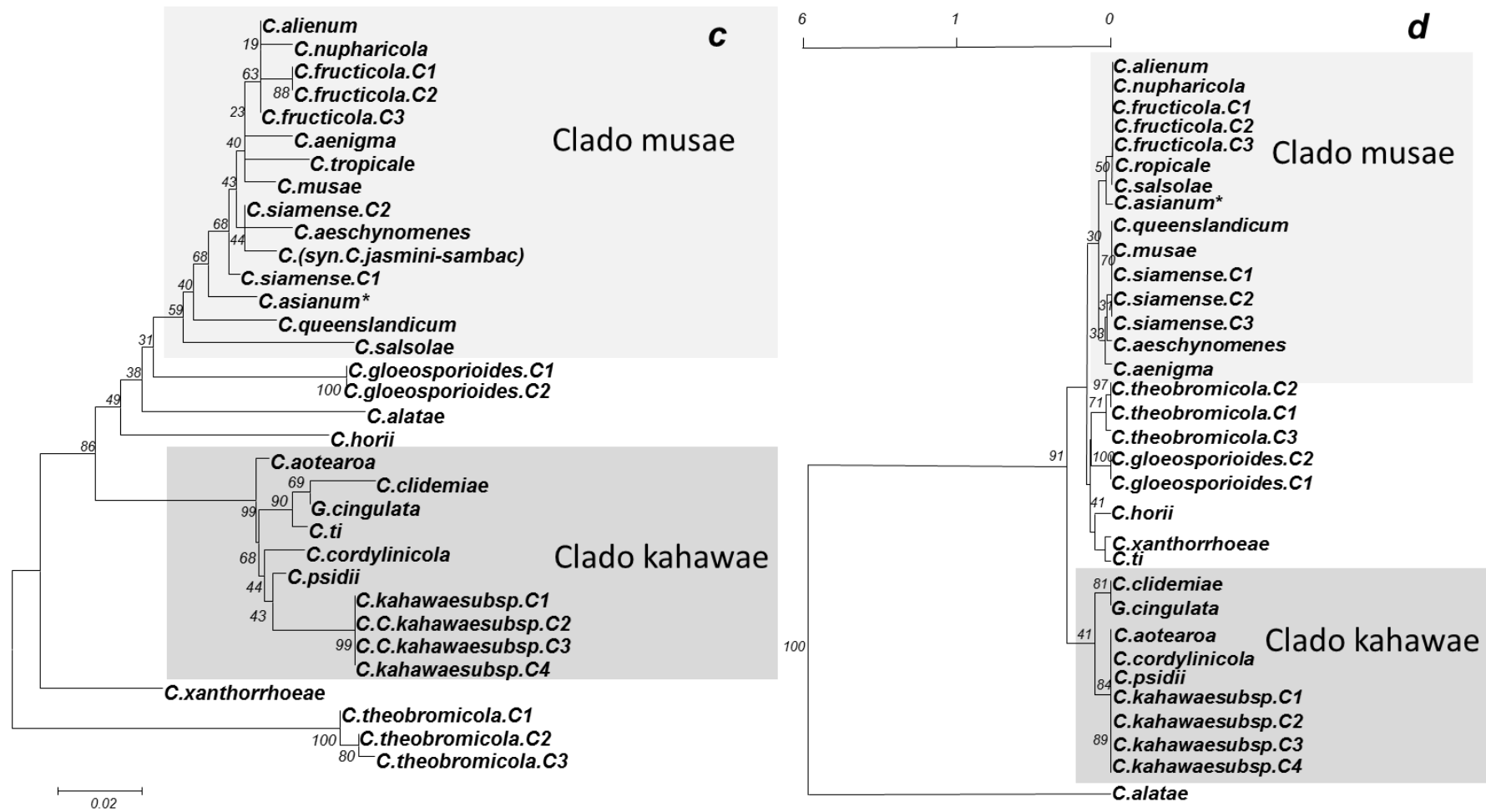


Figura 2. Continuação.

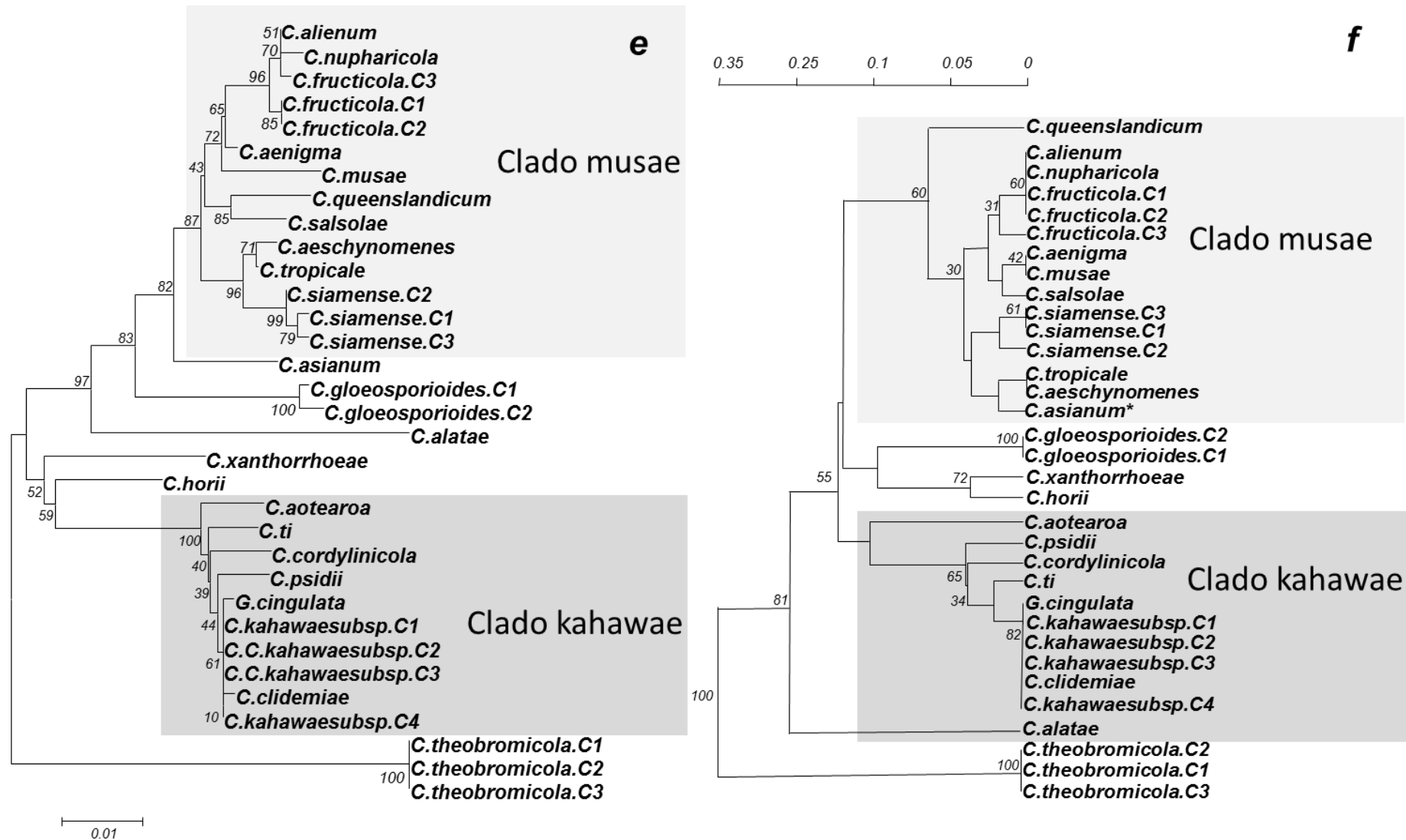


Figura 2. Continuação

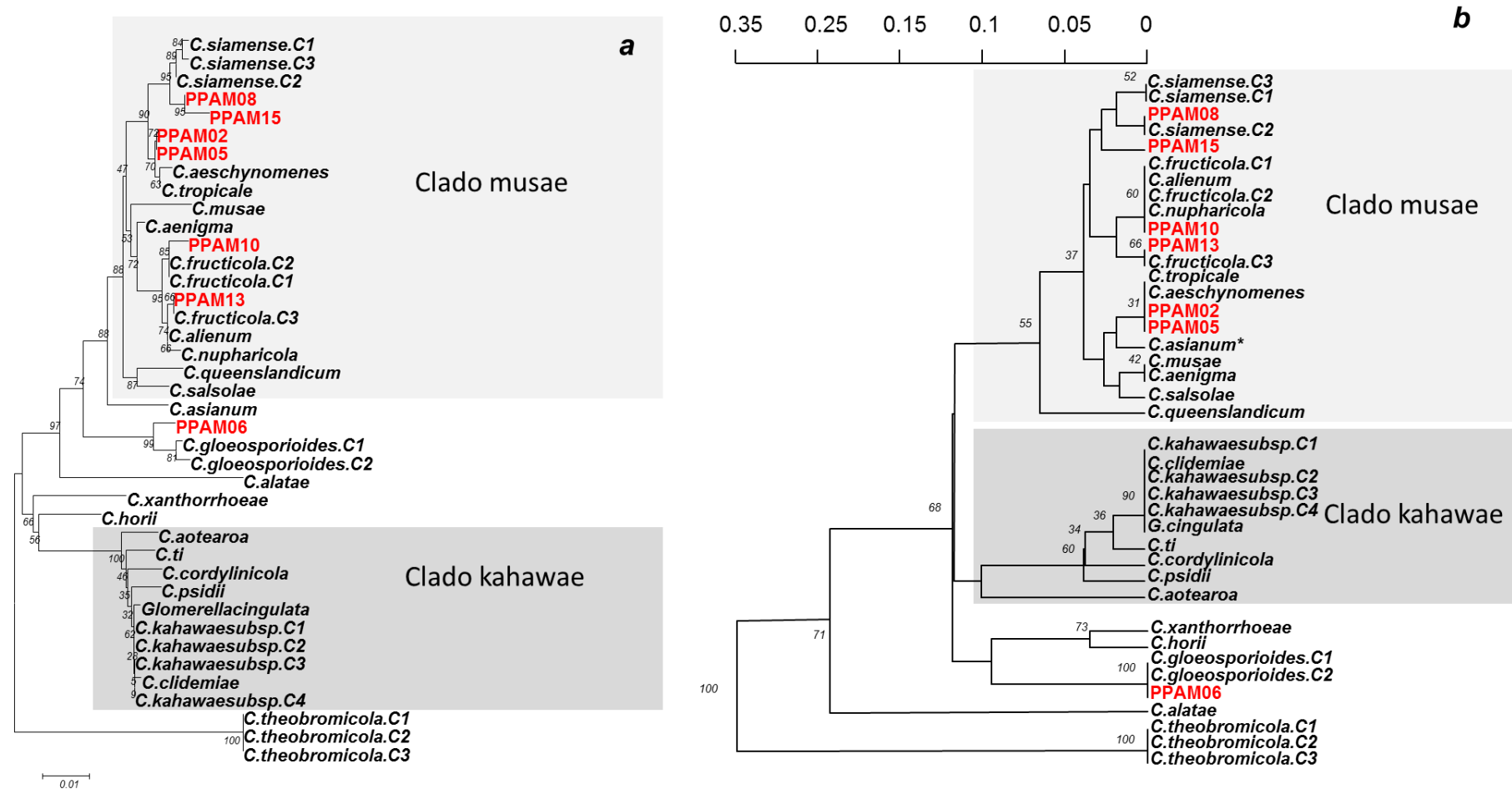
Dos 18 isolados utilizados para a validação da técnica, sete foram identificados via análise multilocus por sequenciamento de diferentes regiões. A análise *in silico* das sequências dos isolados apresentou padrões de clivagens semelhantes ao dos espécimes-tipo utilizadas em testes anteriores. Para a observação do agrupamento dos indivíduos, uma nova árvore filogenética foi construída utilizando as sequências de CAL dos espécimes-tipo e isolados identificados e um novo dendrograma construído com a mesma região, sendo esta clivada com as enzimas selecionadas (FIGURA 3).

O uso dos primers CL1C e CL2C possibilitou a amplificação parcial do gene calmodulina a partir do DNA total para todos os isolados, contendo um único fragmento de aproximadamente 750 pb (FIGURA 4). A presença de sítios de clivagem em todas as amostras de indivíduos pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* foi observada com todas as enzimas testadas (FIGURAS 5 a 7). As bandas obtidas apresentaram variação de tamanhos (pb) entre os isolados.

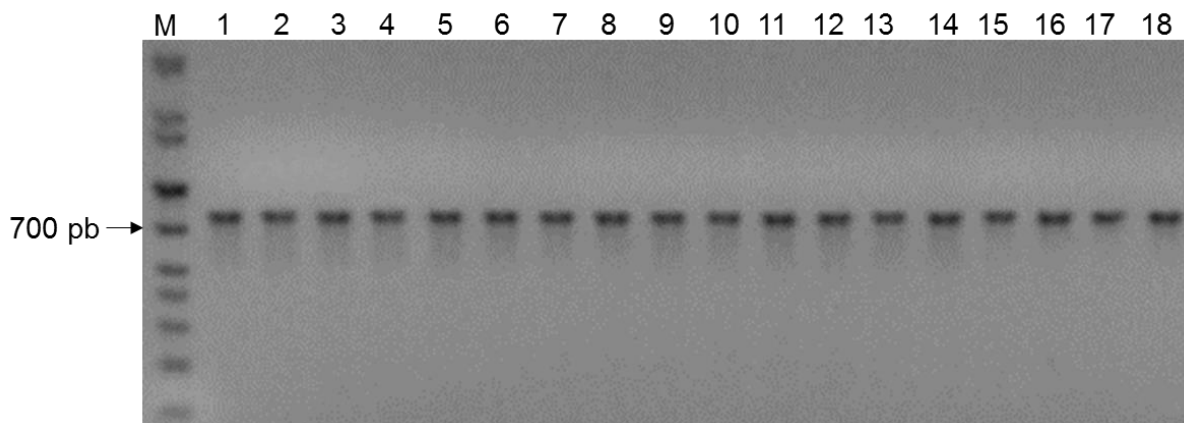
A comparação dos padrões de banda esperados na análise *in silico* com os padrões obtidos em gel de agarose após a eletroforese (FIGURA 8), evidenciou a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica, uma vez que o padrão esperado (*in silico*) foi exatamente o mesmo do observado (*in gel*). Um novo dendrograma foi construído utilizando os padrões de bandas obtidos de todos os isolados juntamente com os padrões de banda esperados dos isolados espécimes-tipo (FIGURA 9), desta forma, uma nova possibilidade de análise foi realizada. Para a construção do dendrograma foram consideradas bandas maiores que 80 pb, devido a melhor observação no gel de agarose.

Dos 18 isolados utilizados, dois (PPAM02 e PPAM05) agruparam-se no subclado *tropicale*, oito (2F2, 33F10, 28F6, 40C4, 48F4, 28F5, PPAM10, 3F3.2) agruparam-se no subclado *fructicola* 1 e um (PPAM13) no subclado *fructicola* 3. Um isolado (PPAM08) agrupou-se no subclado *siamense* 1 e outro isolado (PPAM15) identificado como *C. siamense* não formou subclado. Todos pertencentes ao clado *musae*. Um isolado (PPAM06) agrupou-se no subclado *gloeosporioides* (*sensu stricto*). Um isolado (39FR1) agrupou-se no subclado *theobromicola*. Três isolados (PPAM09, 18F3, 24F4) formaram um grupo fora do complexo *C. gloeosporioides*.

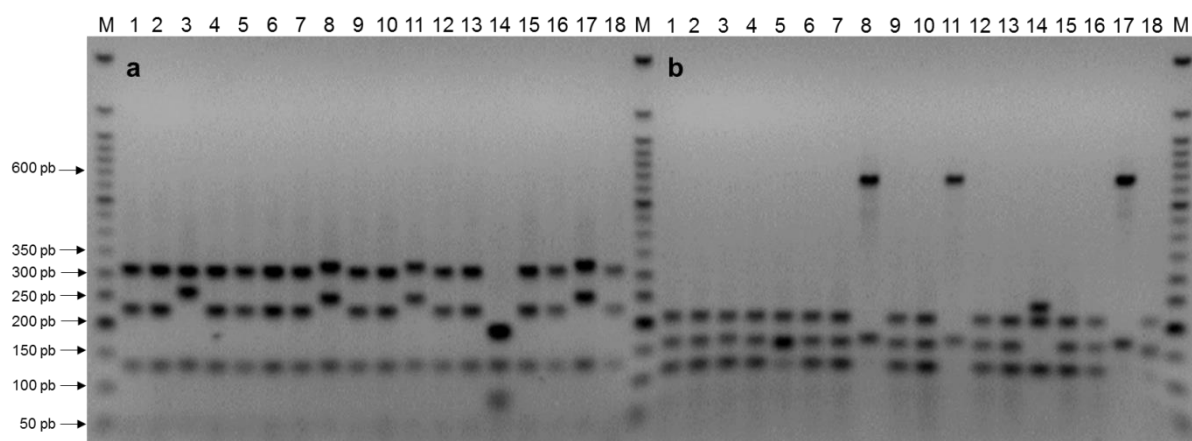




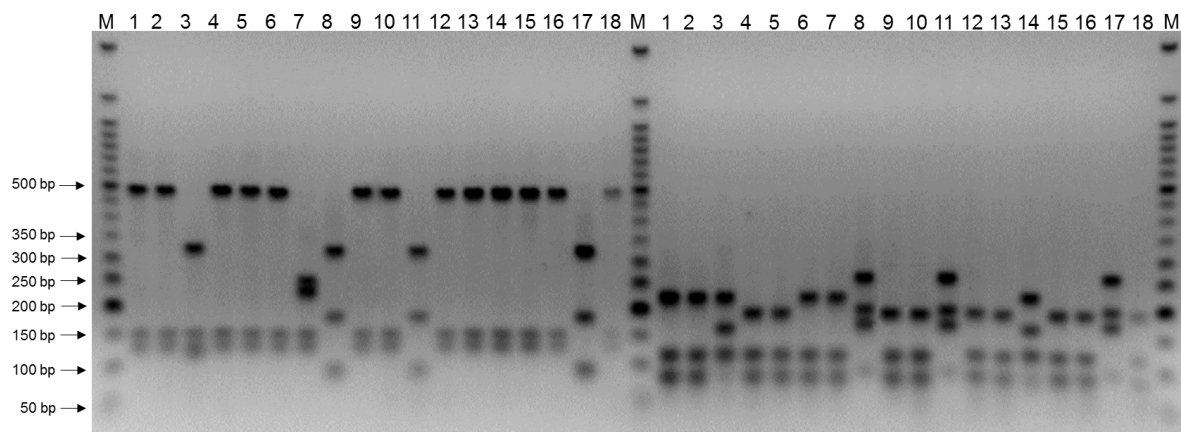
**Figura 3.** Comparação entre a distribuição esperada das linhagens filogenéticas para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, com base na análise filogenética do gene CAL (a) e agrupamento com base no padrão de restrição do mesmo gene (b) com as enzimas AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI de espécimes-tipo e isolados sequenciados (em vermelho). Árvore filogenética construída pelo método Neighbor Joining, utilizando o modelo Kimura dois parâmetros e bootstrap de 10.000 gerações. Dendrogramas gerados a partir dos dados de distância genética de Nei baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com botstrap de 1.000 repetições.



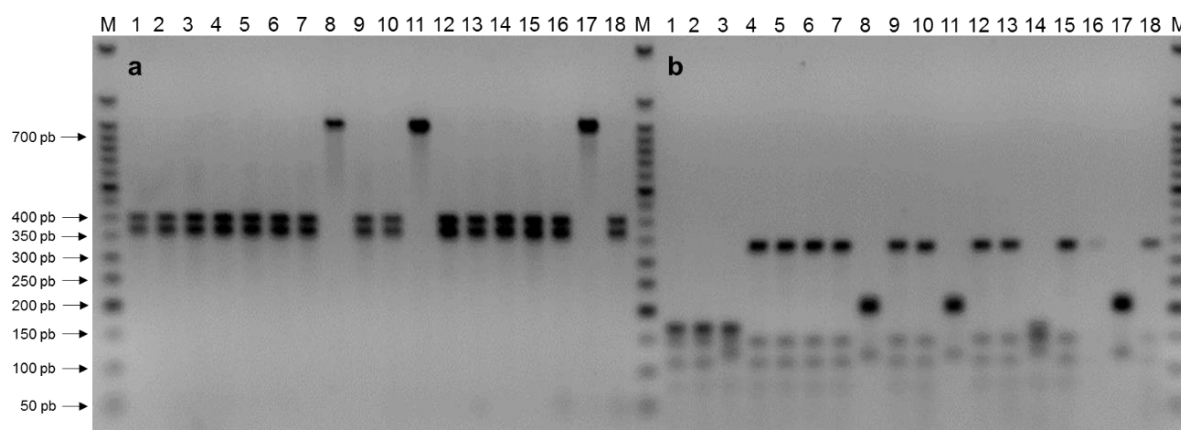
**Figura 4.** Amplificação da calmodulina a partir do DNA genômico dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* em gel de agarose 1,5%. M – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; 1 – PPAM02; 2 – PPAM05; 3 – PPAM06; 4 – PPAM10; 5 – PPAM13; 6 – PPAM08; 7 – PPAM15; 8 – PPAM09; 9 – 2F2; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 28F6; 13 – 33F10; 14 – 39FR1; 15 – 40C4; 16 – 48F4; 17 – 24F4; 18 – 28F5.



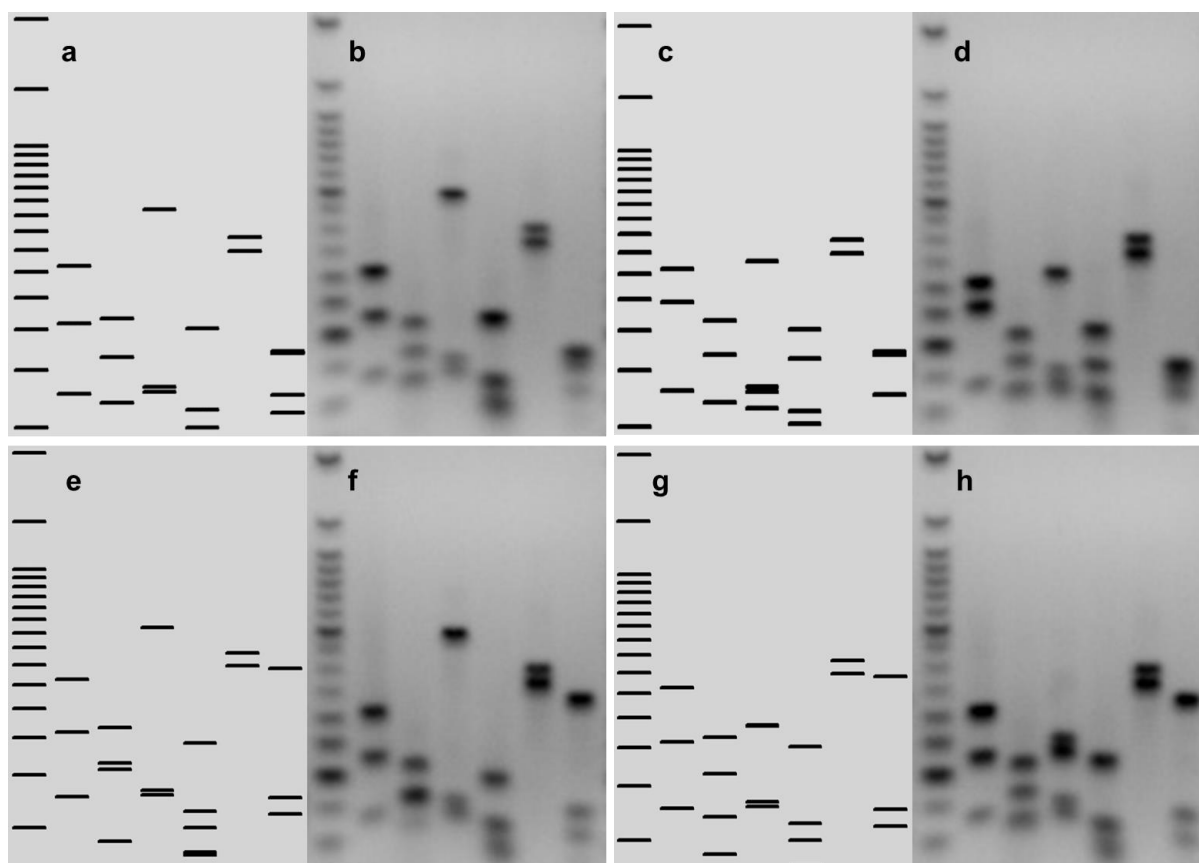
**Figura 5.** Padrões de bandas obtidos pelas enzimas de restrição AluI (a) e BsuRI (b) em gel de agarose 2%. M – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; 1 – PPAM02; 2 – PPAM05; 3 – PPAM06; 4 – PPAM10; 5 – PPAM13; 6 – PPAM08; 7 – PPAM15; 8 – PPAM09; 9 – 2F2; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 28F6; 13 – 33F10; 14 – 39FR1; 15 – 40C4; 16 – 48F4; 17 – 24F4; 18 – 28F5.



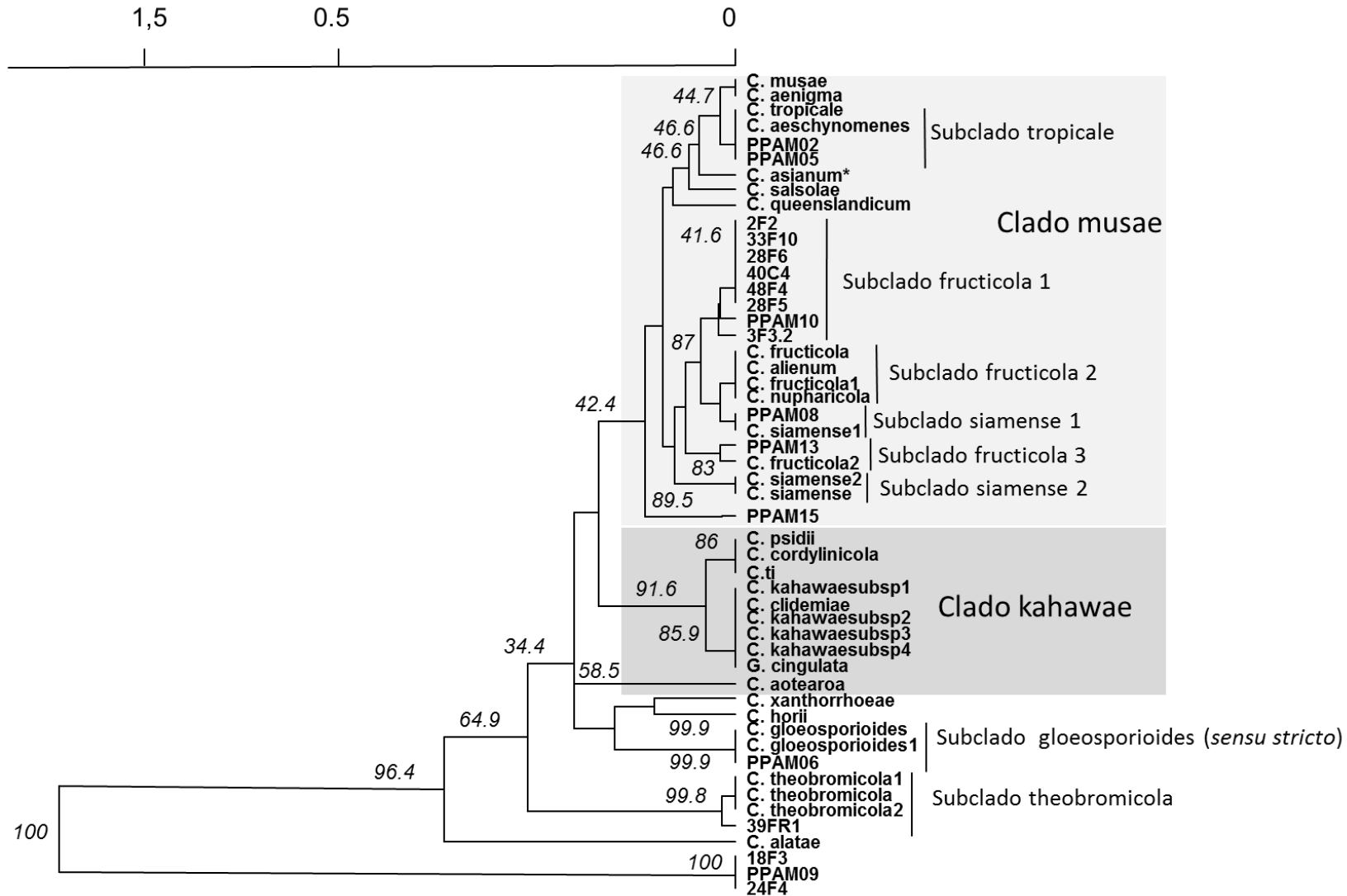
**Figura 6.** Padrões de bandas obtidos pelas enzimas de restrição HhaI (a) e HinfI (b) em gel de agarose 2%. M – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; 1 – PPAM02; 2 – PPAM05; 3 – PPAM06; 4 – PPAM10; 5 – PPAM13; 6 – PPAM08; 7 – PPAM15; 8 – PPAM09; 9 – 2F2; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 28F6; 13 – 33F10; 14 – 39FR1; 15 – 40C4; 16 – 48F4; 17 – 24F4; 18 – 28F5.



**Figura 7.** Padrões de bandas obtidos pelas enzimas de restrição MspI (a) e TaqI (b) em gel de agarose 2%. M – Marcador TIANGEN 1kb plus DNA ladder; 1 – PPAM02; 2 – PPAM05; 3 – PPAM06; 4 – PPAM10; 5 – PPAM13; 6 – PPAM08; 7 – PPAM15; 8 – PPAM09; 9 – 2F2; 10 – 3F3.2; 11 – 18F3; 12 – 28F6; 13 – 33F10; 14 – 39FR1; 15 – 40C4; 16 – 48F4; 17 – 24F4; 18 – 28F5.



**Figura 8.** Padrões de bandas esperados e obtidos para os isolados PPAM02 (a/b), PPAM06 (c/d), PPAM13 (e/f) e PPAM15 (g/h). Coluna 1 – Marcador 50 pb Biolabs; Coluna 2 – AluI; Coluna 3 – BsuRI; Coluna 4 – HhaI; Coluna 5 – HinfI; Coluna 6 – MspI; Coluna 7 – TaqI.



**Figura 9.** Distribuição esperada das linhagens filogenéticas para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, com base no padrão de restrição da região gênica CAL com as enzimas AluI, BsuRI, HhaI, HinfI, MspI e TaqI de espécimes-tipo e dos isolados utilizados. Dendrogramas gerados a partir dos dados de distância genética de Nei baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com bootstrap de 1.000 repetições. (\*) Não pertence a nenhum clado.

## DISCUSSÃO

Estudos baseados em PCR-RFLP são comumente utilizados para micro-organismos, seja ele com intuito de analisar a diversidade existente entre indivíduos de uma mesma espécie (VILA NOVA et al., 2011), ou para separar diferentes espécies com base no perfil de bandas apresentado pelos indivíduos (DUTTWEILER et al., 2008; TAPIA-TUSSELL et al., 2008).

No estudo de diversidade e diferenciação de espécies de fungos a região comumente amplificada para a posterior clivagem é o espaçador interno transcrito (ITS), podendo ser utilizadas diversas enzimas de restrição para fornecer diferentes padrões de banda (FREEMAN et al., 1996; MAHARAJ; RAMPERSAD, 2012). Essa região é considerada *barcode* universal na identificação de fungos devido a facilidade de amplificação e sequenciamento, sendo comumente utilizada para diversos gêneros (SCHOCH et al., 2012). Entretanto, as análises realizadas para essa região mostraram não haver polimorfismo suficiente entre os sítios de clivagem necessários para a diferenciação dos isolados.

A região ITS é considerada muito conservada, o que não permite a diferenciação significativa quando as espécies são muito relacionadas, como ocorre em *Colletotrichum* (CAI et al., 2009). Mesmo a região ITS apresentando elevado número de nucleotídeos, assim como a CAL e TUB2, o polimorfismo existente na região é muito baixo.

Diferentes autores, como Maharaj e Rampersad (2012), obtiveram resultados significativos utilizando a região ITS, conseguindo diferenciar isolados de espécies diferentes causadores de antracnose em mamão e pimentão, por meio da escolha de enzimas de restrição *in silico* para a região e posterior clivagem. Foi possível diferenciar isolados de *C. gloeosporioides* e *C. truncatum* de mamão utilizando três enzimas de restrição (PvuII, RsaI e Sau3A) e de pimentão usando cinco enzimas (AluI, HaeIII, PvuII, RsaI e Sau3A). Entretanto, outros autores obtiveram resultados diferentes, como exemplo Freeman et al. (1996) que utilizou sete enzimas de restrição (BamHI, EcoRI, HaeIII(BSuRI), HindIII, PstI, Sau3A e StuI) para clivagem de rDNA na tentativa de diferenciar isolados de *Colletotrichum*. Sendo eles *C. gloeosporioides* isolados de morango, amêndoa, maçã e abacate; e *C. fragariae* e *C. acutatum*

isolados de morango. Apenas duas enzimas (EcoRI e Sau3A) utilizadas foram capazes de produzir padrões de bandas diferentes, e apenas para o isolado de *C. acutatum*. Os demais isolados de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* apresentaram o mesmo padrão de bandas.

Embora a grande maioria dos trabalhos envolvendo técnicas PCR-RFLP utilizadas para a diferenciação de espécies de fungos utilizem a região ITS, outras regiões devem ser testadas. Uma das regiões utilizadas para a identificação de espécies com base em sequenciamento, que apresenta elevado polimorfismo e que pode também ser utilizada para PCR-RFLP é a  $\beta$ -tubulina. Nasri et al. (2015) conseguiu diferenciar mais de 150 isolados de *Aspergillus* presentes em seis espécies baseado em seleção de enzimas para a região *in silico* e posterior análise de polimorfismo após restrição da região  $\beta$ -tubulina. Embora o autor tenha obtido sucesso em discriminar isolados de *Aspergillus* com base no perfil de bandas, as espécies por eles estudadas não pertenciam a um mesmo complexo. Isso mostra a importância da realização de análise *in silico* para a determinação de quais enzimas serão utilizadas nos testes, já que muitas delas podem não clivar a região amplificada, ou mesmo fornecer padrões de bandas similares para a maioria dos indivíduos testados.

Ao ser utilizados isolados sequenciados pode-se observar e validar a técnica de escolha *in silico*, já que os perfis de bandas obtidos pelos isolados foram similares aos perfis esperados para cada indivíduo. Ainda que algumas bandas esperadas apresentem curto comprimento e não possam ser observadas em gel, ou mesmo se sobreponham devido ao tamanho semelhante, é possível diferenciar espécies com base no perfil de bandas.

Os locus ideais para utilização em *barcode* devem apresentar baixa variação intra-específica e ainda uma variação que seja suficiente para permitir a separação de espécies diferentes. Para as espécies existentes em *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* as regiões consideradas como boas candidatas a *barcode* são GPDH, CAL, e ACT apresentam elevado polimorfismo, enquanto que as regiões ITS, CHS-1, e EF1 $\alpha$  são consideradas pobres candidatas (CAI et al., 2009). No presente estudo, pode-se observar que as regiões CAL, GAPDH e TUB2 apresentaram elevado polimorfismo tanto na sequência de nucleotídeos quanto nos fragmentos clivados quando comparados com as regiões ACT, CHS-1 e ITS. No entanto a CAL apresentou

uma melhor resolução na diferenciação das espécies do que GAPDH e TUB2. As regiões testadas são comumente utilizadas para identificação de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Análises PCR-RFLP *in silico* realizadas com as regiões ITS, ACT, TUB2 e GAPDH forneceram padrões de bandas que permitiram a diferenciação de espécies do complexo *C. gloeosporioides*, demonstrando que essa técnica poderia ser utilizada. Nesse mesmo estudo, as regiões mais indicadas seriam ACT e ITS por apresentarem maior polimorfismo em comparação com as regiões GAPDH e TUB2 (RAMDEEN; RAMPERSAD, 2013). Os dados obtidos pelas análises *in silico* neste estudo, mostram que as regiões GAPDH, CAL e TUB2 apresentaram alto polimorfismo e as regiões ITS, ACT e CHS-1 um menor polimorfismo utilizando as enzimas de restrição selecionadas.

Dentre as regiões utilizadas para a identificação de *C. gloeosporioides sensu lato* está a calmodulina, que apresenta baixa variação intraespecífica, possibilitando a sua utilização em estudos de identificação de espécies (CAI et al., 2009). A calmodulina é um dos maiores receptores intracelulares de cálcio responsável por regular diversos processos e proteínas necessárias no metabolismo celular, entre elas proteínas quinases, fosfatases, fatores de transcrição, proteínas motoras e componentes do citoesqueleto. (HOEFLICH; IKURA, 2002; LEJOHN, 1989).

A calmodulina é altamente conservada em todos os eucariotos e apresenta uma única cópia em *C. gloeosporioides* (KIM et al., 1998). Devido a isso, essa região é um interessante marcador molecular para ser utilizado, e com base no polimorfismo encontrado nessa região, que se identificou a possibilidade de utilizar enzimas de restrição que forneçam perfis de bandas que possibilitem a diferenciação de indivíduos pertencentes ao complexo.

A clivagem da região CAL e o perfil de bandas apresentado mostrou-se bastante eficiente quando utilizada para diferenciar espécies de fungos de interesse médico de espécies ambientais pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*. A clivagem com a enzima HhaI, possibilitou o aparecimento de seis padrões de bandas distintas (RODRIGUES et al., 2014). Nesse trabalho, o número quatro haplótipos foi observado com a enzima HhaI, no entanto a



enzima de restrição HinfI possibilitou um número maior de haplótipos, podendo ainda ser mais discriminante.

Todos os isolados testados apresentaram um único fragmento amplificado para CAL com tamanhos entre 750 pb, tamanho normalmente produzido para as espécies do complexo *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Após a clivagem pode-se gerar um grande número de locus polimórficos, e elevado número de haplótipos. Os dendrogramas gerados com dados da clivagem da CAL e das bandas obtidas mostram que os agrupamentos ocorrem somente entre os indivíduos que são mais próximos filogeneticamente.

O complexo *C. gloeosporioides* é formado por 22 espécies, antes agrupadas devido a sua similaridade fenotípica. O descobrimento dessas espécies crípticas só foi possível graças a análises filogenéticas baseadas em sequências concatenadas de oito regiões gênicas (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). A técnica de PCR-RFLP da CAL possui elevado poder discriminatório já que várias linhagens genéticas pertencentes ao complexo podem ser diferenciadas. A alta similaridade observada entre o padrão de banda esperado e o observado possibilita o uso em conjunto desses dados, para a formação de uma árvore “híbrida” que possibilita a diferenciação dessas linhagens filogenéticas, com base apenas nos perfis de banda.

A técnica de PCR-RFLP da região CAL permite uma diferenciação de linhagens filogenéticas do complexo *C. gloeosporioides*. Além disso, a técnica possui um custo menor do que o sequenciamento, é rápida e de fácil interpretação principalmente quando se utilizam vários indivíduos e alguns destes caracterizados como controle positivo. Logo, análise PCR-RFLP utilizada nesse trabalho sugere que essa técnica pode ser utilizada como uma ferramenta de diferenciação de linhagens, auxiliando no direcionamento do sequenciamento.

Estudos sobre o gênero *Colletotrichum* têm mostrado a existência de espécies agrupadas em complexos que variam desde a gama de hospedeiros, distribuição geográfica, virulência, agressividade, até a resistência a determinados fungicidas (LIMA et al., 2015; TALHINHAS et al., 2015). Dado que essas espécies distintas podem responder de forma diferente a resistência do hospedeiro ou ao emprego de defensivos, os programas de melhoramento

genético de plantas devem considerar a diversidade de patógenos existentes na utilização de isolados em busca de variedades vegetais com níveis elevados de resistência a essa doença (RAMDIALL; RAMPERSAD, 2015). O desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo que possam diferenciar fitopatógenos é importante para estudos epidemiológicos. Sendo assim, a técnica de PCR-RFLP da região CAL pode ser uma ferramenta útil para a seleção de isolados que possam ser utilizados para a triagem de resistência em programas de melhoramento de plantas.

## **CONCLUSÃO**

A técnica de PCR-RFLP da região CAL mostrou-se uma ferramenta útil e que pode ser utilizada para diferenciar linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*.

A árvore “híbrida” possibilita a diferenciação de linhagens filogenéticas com base apenas nos perfis de banda.

O uso combinado de dados pode auxiliar no direcionamento de isolados para o sequenciamento.

## **AGRADECIMENTOS**

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, mais especificamente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura pelo financiamento do projeto e ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida.

## REFERÊNCIAS

- BRAGANÇA, C. A. D. SILVA, L. L.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, S. A. S. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, 2016.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity** v. 39, p. 183-204, 2009.
- CAI, L.; GIRAUD, T; ZHANG, N.; BEGEROW, D.; CAI, G.; SHIVAS, R. G. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v.50, n. 2011. p. 121–133, 2011.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p.181-213, 2012.
- DUTTWEILER, K. B.; SUN, G. Y.; BATZER, J. C.; HARRINGTON, T. C.; GLEASON, M. L. An RFLP–based technique for identifying fungi in the sooty blotch and flyspeck complex on apple. **Plant Disease**, v. 92, p. 794–799, 2008.
- FREEMAN, S.; KATAN, T; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, p. 1014–1020, 1996.
- FREEMAN, S., KATAN, T. & SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.
- HOEFLICH K. P; IKURA, M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. **Cell**, v. 108, p. 739–742, 2002.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **Peer J**, 2:e281, 2014.
- KELEMU, S.; SKINNER, D. Z.; BADEL, J. L.; MORENO, C. X.; RODRÍGUEZ, M. X.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J.; CHAKRABORTY, S. Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 261–272, 1999.
- KIM, Y; LI, D; KOLATTUKUDY P. E. Induction of Ca<sup>2+</sup>–Calmodulin signaling by hard–surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5144–5150, 1998.

- LEJOHN, H. B. Structure and expression of fungal calmodulin gene. **The journal of biological chemistry**, v. 264, p. 19366–19372, 1989.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LIMA, N. B.; LIMA, W. G.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 679-688, 2015.
- MAHARAJ, A.; RAMPERSAD, S.N. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsicum annuum* L.) based on ITS PCR–RFLP Fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, v. 50, p. 237–249, 2012.
- NASRI, T.; HEDAYATI, M. T.; ABASTABAR, M.; PASQUALOTTO, A. C.; ARMAKI, M. T.; HOSEINNEJAD, A.; NABILI, M. PCR-RFLP on  $\beta$ -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 117, p. 144–147, 2015.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.
- OLIVEIRA, S. A. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; SILVA L. L. First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on the wild cassava species *Manihot dichotoma* and *M. epruinosa*. **Plant disease**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1136-PDN>
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.
- PINWEHAA, N.; ASVARAKA, T.; VIBOONJUNB, U.; NARANGAJAVANAA, J. Involvement of miR160/miR393 and their targets in cassava responses to anthracnose disease. **Journal of Plant Physiology**, v. 174, p. 26–35, 2015.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <http://www.R-project.org/>.
- RAMDEEN, S; RAMPERSAD, S. N. Intraspecific differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* based on *in silico* multilocus PCR–RFLP Fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 170–181, 2013.
- RAMDIAL, H.; RAMPERSAD, S. N. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 37-49, 2015.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR–RFLP of calmodulina. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 383–387, 2014.

SAN MILLÁN, R. M.; MARTÍNEZ-BALLESTEROS, I.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J.; BIKANDI, J. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 513, p. 1-4, 2013.

SCHENA, L.; MOSCA, S.; CACCIOLA, S. O.; FAEDDA, R.; SANZANI, S. M.; AGOSTEO, G. E.; SERGEEVA, V.; SAN LIO, G. M. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 437–446, 2013.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDRORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; C. LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**. v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

TALHINHAS, P.; GONÇALVES, E.; SREENIVASAPRASAD, S.; OLIVEIRA, H. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 73- 83, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAPIA-TUSSELL, R.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; LAPPE, P.; LARQUE-SAAVEDRA, A.; PEREZ-BRITO, D. PCR–based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. **Molecular Biotechnology**, v. 40, p. 293–298, 2008.

VILA NOVA, M. X.; BORGES, L. R.; SOUSA, A. C. B.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; LIMA, E. A. L. A.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, N. T. Pathogenicity for onion and genetic diversity of isolates of the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Phyllachoraceae) from the State of Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 311–320, 2011.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WILLIAM, M. N. M.; MBEGA, E. R.; MABAGALA, R. B. An outbreak of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *Manihotis* in cassava in North Western Tanzania. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 596-598, 2012.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificadas diferentes espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose em mandioca, sendo elas *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. fructicola*.

Foi identificado uma espécie não pertencente ao complexo *C. gloeosporioides* causando antracnose em mandioca, sendo ela *C. cliviae*.

A técnica ERIC-PCR foi a que apresentou o melhor resultado para a discriminação de linhagens filogenéticas dentro do complexo *C. gloeosporioides* em comparação com a técnica BOX-PCR e ao uso combinado dos dados de ERIC e BOX-PCR.

A técnica de PCR-RFLP da região CAL mostrou-se uma ferramenta útil e que pode ser utilizada para diferenciar linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*.

O uso combinado de dados obtidos dos perfis de banda possibilitou a construção de uma árvore “híbrida” que permitiu a diferenciação de linhagens filogenéticas dentro do complexo *C. gloeosporioides*.

A utilização de CAL PCR-RFLP e ERIC-PCR mostrou-se eficiente em diferenciar linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, podendo ser utilizada como ferramentas de auxílio na identificação e direcionamento do sequenciamento.