

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum* ASSO- CIADOS A SEMENTES DE ALGODOEIRO, POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES E INOCULAÇÃO EM PLANTAS *

RENATA SILVA-MANN¹, KALINKA C.C. SALGADO¹, MARIA G.G.C. VIEIRA¹ & JOSÉ C. MACHADO²

¹Laboratório de Análise de Sementes-DAG/UFLA, e-mail: semente@ufla.br; ²Laboratório de Patologia de Sementes-DFS/
UFLA, Cx. Postal 37, CEP 372000-000, Lavras, MG.

(Aceito para publicação em 08/10/2001)

Autor para correspondência: Maria G.G.C. Vieira

SILVA-MANN, R., SALGADO, K.C.C., VIEIRA, M.G.G.C. & MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. Fitopatologia Brasileira 27:027-032. 2002.

RESUMO

A antracnose e a ramulose são doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) causadas, respectivamente, por *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sendo a ramulose a mais importante sob o ponto de vista de prejuízos causados. Por se tratarem de fungos transmitidos por sementes, de difícil diferenciação por métodos convencionais, o desenvolvimento de metodologia usando técnicas moleculares é uma opção que se dispõe na busca de maior precisão e rapidez. O presente trabalho objetivou associar informações do teste de patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando a identificação e

diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Na análise de RAPD, o valor de similaridade encontrado para os dois grupos foi de 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Palavras-chave adicionais: *Colletotrichum gossypii*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, RAPD, isoenzimas, similaridade.

ABSTRACT

Genetic variability of *Colletotrichum* complex associated with cotton seeds, by using molecular markers and plant inoculation

Anthraxosis and ramulosis are important diseases of cotton (*Gossypium hirsutum*), caused by *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, respectively; both fungi seed transmitted. Ramulosis, also known as witch's broom, is considered to be more devastating, causing severe losses in several regions of Brazil where cotton is cultivated in large scale. It is difficult to detect both fungi in seed samples by conventional methods since the morphological variability between isolates within the same species makes detec-

tion unreliable. The goal of the presente work was to investigate the variation of 10 isolates of both fungi using DNA/RAPD markers. Part of the isolates was classified as *C. gossypii* and part as *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, using the pathogenic test. The results showed that the biochemical markers used were not able to distinguish the isolates of anthracnosis from the isolates of ramulosis. On the other hand, the genetic similarity between the isolates demonstrated by RAPD analysis, was 51,78%, indicating the potential of this technique.

INTRODUÇÃO

O aspecto de sanidade de sementes, do ponto de vista de prognóstico e controle de doenças em plantas, tem assumido uma posição de destaque mundial, devido ao acentuado número de patógenos que podem ser transmitidos pelas sementes.

Para a cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), que representa uma grande parcela da economia agrícola do país, os atuais níveis de problemas de sanidade, acumulados ao longo de alguns anos, podem ser considerados intoleráveis, não somente pelos efeitos que têm causado em termos de redução da produtividade, mas sobretudo por colocar em risco a sobrevivência da atividade agrícola considerada de uma maneira integrada.

A tecnologia de produção empregada nesta cultura tem sido uma das mais deficitárias e o aspecto de sanidade de sementes surge como o principal entrave na busca de uma qualidade melhor da produção. Patógenos associados às sementes, tais como *Colletotrichum gossypii* South. e *C. gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa, que são de difícil identificação ou distinção em relação a outras espécies saprófitas, requerem métodos mais detalhados visando sua identificação de um modo rápido e seguro em testes de sanidade.

Apesar da existência de métodos recomendados para análise em laboratório, a detecção desses organismos é inviável do ponto de vista de rotina, considerando não somente as dificuldades operacionais como também os fatores de reprodutibilidade de resultados. A diagnose de tais patógenos em

lotos de sementes é portanto uma necessidade indispensável que, ao lado de outras medidas culturais, genéticas e de manejo, representa uma medida de proteção de todo o sistema evitando perdas para a cultura do algodoeiro.

O uso de técnicas moleculares e marcadores bioquímicos, de proteínas e isoenzimas tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de patógenos de plantas, propiciando aos agricultores e produtores de sementes a garantia de um insumo de alta qualidade, livre de agentes causadores de doenças de importância epidêmica.

Os métodos de estudos das seqüências de DNA possibilitam uma análise mais precisa da variação genética pois podem detectar alterações mutacionais, em regiões codificadoras, de um número limitado de genes que se expressam em enzimas. Neste sentido pode-se citar entre outros, os trabalhos de Sreenivasaprasad *et al.* (1992, 1993, 1994); Correl *et al.* (1993); Crous *et al.* (1993); Sherriff *et al.* (1994); Vasconcelos *et al.* (1994); Sherriff *et al.* (1995); Vilarinhos (1995) e Vieira (1996). Grajal-Martin *et al.* (1993) conseguiram sucesso na identificação da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* de outras três raças. Guthrie *et al.* (1993) também obtiveram sucesso trabalhando com *Colletotrichum graminicola*. Crowhurst *et al.* (1991), trabalhando com duas raças de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, também demonstraram a grande importância do uso de RAPD para fins de identificação.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de utilizar marcadores moleculares de isoenzimas e proteínas; e de DNA, do tipo RAPD, para verificar a variabilidade genética em alguns isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Sementes da UFLA. Nesta investigação foram empregados os isolados classificados por características morfológicas de colônia em: *C. gossypii* (P13, A26, Cg2) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (P15, Cgc1, Cgc3, Cgc4, Cgc5, Cgc6, A25). Parte dos isolados pertence a micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA e parte foi cedida pelo IAC.

Os isolados foram crescidos em meio BDA (batata-dextrose-ágar), posteriormente repicados para meio líquido (Mills *et al.*, 1994) e mantidos sob agitação no escuro, por sete dias. Após isto, o micélio de cada isolado foi filtrado à vácuo e recolhido em placa de Petri e liofilizado.

Teste de Patogenicidade

O inóculo foi obtido mediante o cultivo dos isolados em meio BDA por sete dias. A inoculação foi efetuada através da pulverização da suspensão de inóculo, na concentração de 10^6 conídios/ml, em plantas da cultivar IAC 20 com 30 dias de idade, que foram mantidas em câmara úmida por 72 h. Na testemunha foi empregada água deionizada esterilizada. As

plantas foram isoladas umas das outras, com uma proteção plástica, evitando desta forma, contato entre plantas inoculadas com isolados diferentes.

As avaliações foram realizadas aos dez e 40 dias após a inoculação, segundo Tabela 1 de avaliação de severidade sugerida por Cia (1977), com adaptações, conforme abaixo apresentado.

Extração e análise de proteínas totais dos isolados fúngicos

Foram utilizados 50 mg do micélio liofilizado aos quais foram adicionados 950 µl do tampão de extração (62,5 mM Tris pH6,8; 2,3% SDS; 5% β mercaptoetanol) acrescidos de 50 µl de β-mercaptoetanol em microtubo do tipo eppendorf. Em seguida, os tubos foram agitados de 10 em 10 min por 1 h à temperatura ambiente, centrifugados à 16.000 g por 10 min e o sobrenadante recolhido.

A avaliação da fração de proteína foi feita sob eletroforese SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Foram aplicados 30 µl de mistura tampão da amostra (5 ml de glicerol; 2,5 ml de Tris-HCl, 0,62M, pH 6,8; 2,5 mg de azul de bromofenol e completado o volume para 25 ml com água) e extrato da proteína, na proporção 3:1. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris- glicina + SDS pH= 8,9. As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador. Após a corrida, os géis foram corados em solução Coomassie Brilliant Blue a 0,05%, segundo Alfenas *et al.* (1991), durante 12 h, e descorados em solução aquosa contendo etanol 5% e ácido acético 10%.

Extração e análise de isoenzimas dos isolados fúngicos

Para a análise isoenzimática foram colocados 15 mg de micélio liofilizado em tubos eppendorf de 2ml e 200 µl de tampão de extração (Tris- HCl 0,2M, pH 8,0, β mercaptoetanol 0,1%, polivinilpirrolidone – PVP-40 0,4%, polietilenoglicol -PEG 0,4%, ácido etilenodiaminotetracético- EDTA 1mM) foram adicionados. A mistura foi mantida a 4 °C por 24 h, posteriormente centrifugada a 16.000 g por 30 min a 4 °C.

Foram aplicados 30 µl do extrato protéico de cada amostra, nas cavidades dos géis de poliácridamida a 4,5 e 7,5%, sistema descontínuo. As isoenzimas foram separadas por eletroforese por aproximadamente 3 h a 4 °C, a 150 V e foram reveladas para os sistemas esterase (EST), fosfatase ácida (ACP) e peroxidase (PO), segundo Alfenas *et al.* (1991). A avaliação foi feita com base na presença ou ausência de bandas.

Extração e análise de DNA dos isolados fúngicos

O DNA genômico foi extraído de 50 mg de micélio liofilizado, previamente macerado com nitrogênio líquido, utilizando o protocolo de extração de Doyle & Doyle (1987), modificado pela adição de 0,2% de β-mercaptoetanol.

As amostras tiveram a concentração de DNA determinada com o auxílio de um fluorímetro Hoefer Scientific Modelo TKO 100, onde foram empregadas alíquotas de 2 µl de amostra para cada ml de tampão TNE 10X (1,3% Tris-

base; 0,37% Na₂ EDTA.2 H₂O; 11,68 NaCl pH=7,4).

A amplificação foi baseada em método descrito por Williams *et al.* (1990), usando dez primers de dez bases cada, da marca Operon Technologies (OPA4; OPA7; OPA17; OPA19; OPB1; OPD7; OPD17; OPE3; OPE13; OPF15), em tubos de 0,2 ml. A escolha dos primers se baseou em trabalho de Vieira (1996) com isolados pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. A amplificação se deu em termociclador Perkin Elmer Modelo Gene Amp PCR System 2400. O programa de amplificação consistiu de temperatura inicial de 94 °C por 5 min, 45 ciclos de amplificação à 94 °C por 15 seg; 36 °C por 30 seg; 72 °C por 1 min. Os produtos de amplificação do DNA foram separados em gel de agarose 1%, submetidos a eletroforese em tampão TBE (90mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0), corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

A avaliação foi realizada através da similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard (Rohlf, 1951) usando o programa NTSYS- pc 1.7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados do teste de patogenicidade (Tabela 2), observa-se que os isolados Cgc1, Cgc3, Cgc4, Cgc5, P15, A25, A26 induziram sintomas típicos de ramulose, na forma de lesões foliares aos dez dias e superbrotamento aos 40 dias. Esses resultados não se apresentam totalmente similares aos da classificação inicial dos isolados, feita por características morfológicas de colônias. Assim é que o isolado A26, inicialmente classificado como *C. gossypii*, apresentou sintomas típicos de ramulose, ao passo que o isolado Cgc6 foi classificado como *C. gossypii var. cephalosporioides*, mas não apresentou sintomas típicos de ramulose por ocasião da inoculação. Essa classificação parcialmente diferenciada entre os métodos de características morfológicas das colônias e de patogenicidade em plantas pode ser devido a influência do tipo de resistência que envolve a relação patógeno-hospedeiro, uma vez que apenas a cultivar IAC-20 foi utilizada como hospedeiro. Este fato já foi comentado por Silva-Mann *et al.* (dados não publicados) em trabalho sobre identificação de resistência na interação patógeno-hospedeiro. Provavelmente

TABELA 1 - Escala de notas adaptada para avaliação dos sintomas em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) inoculadas com fungos do complexo *Colletotrichum*

SINTOMA	NOTA
Planta sem sintoma (ausência de lesões)	1
Plantas com manchas estreladas nas folhas do ponteiro	2
Planta com redução dos internódios no ponteiro e com manchas foliares	3
Planta com superbrotamento e pouca diminuição do seu crescimento	4
Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido	5

a utilização de outras cultivares no teste de patogenicidade, poderia propiciar resultados diferenciados em relação ao comportamento patogênico dos referidos patógenos.

Com relação à análise eletroforética de proteínas totais, os padrões de bandas relativos aos diferentes isolados, mostraram-se extremamente semelhantes. Tal fato já era esperado, uma vez que o padrão de proteínas é bastante semelhante em espécies próximas (Alfenas *et al.*, 1991).

Observa-se que a peroxidase (PO) diferenciou os fungos Cg2, Cgc4 e A25 dos demais e entre si. Os isolados Cgc4 e A25 (Figura 1), ambos agentes causais da ramulose, não apresentaram atividade para esta enzima. Vale ressaltar, no entanto, que essa enzima não foi eficiente, no presente estudo, em agrupar os isolados pertencentes ao complexo *Colletotrichum*.

Os isolados Cgc4, P15, A25 e A26 (*C. gossypii var. cephalosporioides*) apresentaram padrão de bandas para fosfatase ácida diferenciados em relação aos demais. Desta forma, apenas os isolados Cgc5 e Cgc3, dentre os que apresentaram sintoma de ramulose por ocasião do teste de inoculação em plantas, não foram diferenciados dos isolados de *C. gossypii* por essa enzima. Já pelos padrões eletroforéticos da esterase, observa-se que os isolados Cgc1 e P15, ambos nota máxima pelo teste de patogenicidade em plantas, apresentaram padrões de bandas iguais entre si e diferente dos demais. Estes resultados discordam parcialmente dos encontrados por Vieira (1996), que menciona ser estes sistemas promissores para diferenciar estes organismos. No entanto, apesar de alguns isolados de *C. gossypii var. cephalosporioides* não terem sido separados dos de *C. gossypii*, é preciso que fique claro, que os isolados classificados

TABELA 2 - Resultados da avaliação de sintomas em teste de patogenicidade em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) cultivar IAC- 20, UFLA, Lavras, MG. 1997

ISOLADO	SINTOMA	NOTA
Cgc1	Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido.	5
Cg2	Planta sem sintoma (ausência de lesões)	1
Cgc3	Planta com superbrotamento e pouca diminuição do seu crescimento.	4
Cgc4	Planta com redução dos internódios no ponteiro e com manchas foliares.	3
Cgc5	Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido.	5
Cgc6	Plantas com manchas estreladas nas folhas do ponteiro	2
A25	Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido.	5
A26	Planta com superbrotamento e pouca diminuição do seu crescimento.	4
P13	Planta sem sintoma (ausência de lesões)	1
P15	Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido.	5

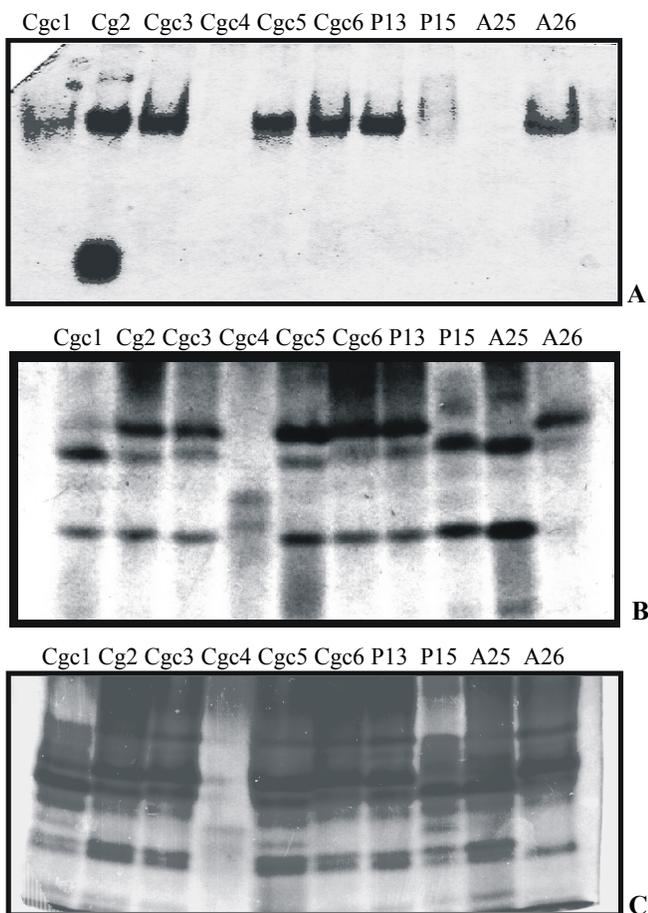


FIG. 1 - Padrões isoenzimáticos em géis de poliacrilamida, dos isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*: Peroxidase (A), Fosfatase ácida (B), Esterase (C). *C. gossypii*: Cg2, P13, A26; *C. gossypii* var. *cephalosporioides*: Cgc1, Cgc3, Cgc4, Cgc5, Cgc6, P15, A25.

como *C. gossypii*, sempre apresentaram o mesmo padrão de bandas por esses sistemas. Desta forma, fica evidente a necessidade de se usar um maior número de sistemas para possibilitar separar aqueles isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, não separados dos de *C. gossypii* pelos sistemas enzimáticos considerados neste estudo.

Na análise de RAPD, as reações de amplificação dos fragmentos de DNA geraram 41 bandas polimórficas e quatro monomórficas. A Figura 2 mostra um padrão de amplificação obtido com o primer OPF15. Os padrões de bandas de DNA, foram empregados para cálculo dos valores de similaridade genética, os quais mostraram similaridade mínima de 35% e máxima de 85%. De acordo com a similaridade genética entre os pares de genótipos analisados (Tabela 3), os isolados Cgc1 e Cgc6; Cgc4 e P15 todos *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, apresentaram maior similaridade (85%), seguidos também dos isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, Cgc1 e Cgc3; Cgc4 e Cgc5; Cgc1 e P15, com uma similaridade de

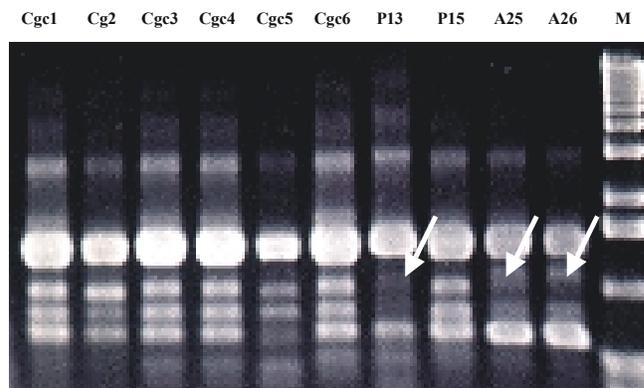


FIG. 2 - Análise eletroforética em gel de agarose mostrando produtos de amplificação do DNA de diferentes isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com o primer OPF15. Seta indica polimorfismo de bandas.

82,5%. Estes resultados, com exceção do isolado Cgc6, estão de acordo com os obtidos em teste de patogenicidade onde os isolados Cgc1, Cgc3, Cgc4, Cgc5, P15 e A25 mostraram sintomas de ramulose, doença caracterizada por lesões foliares e superbrotamento. Torna-se importante ressaltar que apesar do isolado Cgc6 não ter apresentado sintomas típicos de ramulose, pelo teste de patogenicidade em plantas, este isolado foi classificado como *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pelo teste de morfologia de colônia. O fato dele não ter apresentado sintomas típicos, pode ter sido, como já mencionado anteriormente, devido ao tipo de resistência que envolve a relação patógeno-hospedeiro. Desta forma, fica evidente a alta correlação entre os resultados de RAPD e os de caracterização morfológica de colônia. O isolado P13 (*C. gossypii*) se posicionou no dendrograma (Figura 3) em um grupo distante dos demais, apresentando uma similaridade de 60% com Cg2 (*C. gossypii*). No teste de patogenicidade ambos apresentaram sintomas de antracnose. Esta baixa similaridade entre os isolados de *C. gossypii* sugere que ocorre uma maior variação genética entre estes isolados do que entre os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O isolado A26, classificado como *C. gossypii* por características morfológicas de colônia pelos resultados RAPD, apresentou-se numa faixa intermediária de similaridade em relação aos demais isolados, exibindo maiores percentuais de similaridade com os isolados A25 e Cgc3, ambos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Provavelmente, isso ocorreu em função das regiões amplificadas pelos primers anteriormente mencionados. Pelo teste de patogenicidade em plantas, este isolado apresentou sintomas de ramulose e o mesmo padrão de bandas da enzima fosfatase ácida que de outros isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A divergência genética entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi de 48,3%. Desta forma, estes resultados mostram que o uso de marcadores moleculares de DNA, pode ser de grande utilidade para a

TABELA 3 - Estimativa de similaridades genéticas entre dez isolados de *Colletotrichum gossypii*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, baseadas em dados de RAPD, pelo coeficiente de Jaccard. UFLA, Lavras, MG. 1999

	Cgc1	Cg2	Cgc3	Cgc4	Cgc5	Cgc6	P13	P15	A25
Cg2	0,675								
Cgc3	0,825	0,600							
Cgc4	0,675	0,400	0,600						
Cgc5	0,650	0,475	0,625	0,825					
Cgc6	0,850	0,625	0,775	0,725	0,700				
P13	0,375	0,600	0,350	0,350	0,425	0,375			
P15	0,825	0,350	0,700	0,850	0,725	0,775	0,450		
A25	0,725	0,600	0,650	0,550	0,525	0,775	0,550	0,700	
A26	0,625	0,650	0,750	0,450	0,525	0,675	0,500	0,550	0,700

Isolados: Cgc1, Cgc3, Cgc4, Cgc5, Cgc6, P15, A25 (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) e Cg2, P13, A26 (*Colletotrichum gossypii*)

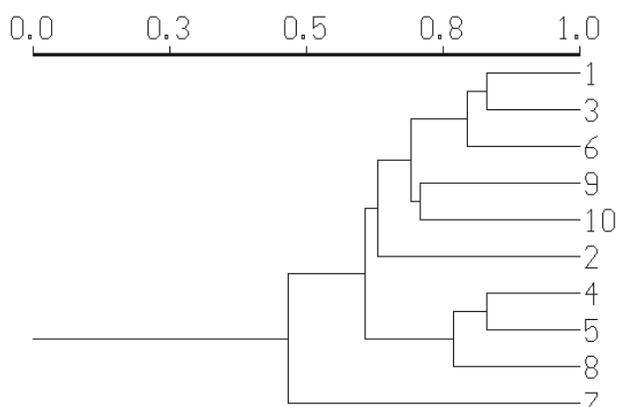


FIG. 3 - Dendrograma revelando a similaridade genética entre dez isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, baseado em coeficientes de similaridades Simple Matching, usando o método UPGMA.

Isolados: 1: Cgc1, 2: Cgc2, 3: Cgc3, 4: Cgc4, 5: Cgc5, 6: Cgc6 e 8: P15 - *C. gossypii* var. *cephalosporioides*; 7: P13, 9: A25 e 10: A26: *C. gossypii*.

identificação e diferenciação de importantes fungos fitopatogênicos, como já referido nos trabalhos de Sreenivasaprasad *et al.* (1992, 1993, 1994); Correl *et al.* (1993); Crous *et al.* (1993); Sherriff *et al.* (1994); Vasconcelos *et al.* (1994); Sherriff *et al.* (1995); Vilarinhos (1995); Vieira (1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos de essências florestais. Viçosa: UFV. 1991.
CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. Summa Phytopathologia

3:167-193. 1977.

- CORREL, J.C., RHOADS, D.D. & GUEBER, J.C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprints and Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. Phitopathology 83:1199-1204. 1993.
CROUS, P.W., ALFENAS, A.C. & WINGFIELD, M.J. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morginii* sp. nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium* anamorphs. Micology Research 6:701-708. 1993.
CROWHURST, R.N., HAWTHORNE, B. T., RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLENTON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *crucubita*. Current Genetics 20:391-396. 1991.
DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. 1987.
GRAJAL-MARTIN, M.J., SIMON, C.J. & MUEHLBAUER, F.J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Phytopathology 83:612-14. 1993.
GUTHRIE, P.A.I., MAGILL, W.W., REDERIKSEN, R.A. & ODVOY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 83:283-287. 1993.
MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S. & BROWN, A.E. Detection fo the antracnose pathogen *Colletotrichum*. In: Schots, A., Dewey, F.M. & Olver, R. (Eds.) Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection na Qualication. Wallingford: Redwood Pres. 1994. pp.183-189.
ROHLF, F.J. Numerical Taxonomy and multivariate Analysis System. New York version v. 43, p.282-287, 1951
SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. & MILLS, P.R. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. Micology Research 8:995-1000. 1993.
SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. & MILLS, P.R. DNA sequence variation and iterrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. Physiological and Molecular Plant Pathology 41:265-281. 1992.
SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. & MILLS, P.R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *c. acutatum*. Mycology Research 98:186-188. 1994.
SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M. & BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. Mycology Research 99:475-478. 1995.
SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M., LAFAY, J.F., BRYGOO, Y. & BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. Experimental mycology 18:121-138. 1994.
VASCONCELOS, M.J.V., MACHADO, M.A., ALMEIDA, A.M.R., HENNING, A.A., BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by Random Amplified Polymorphic DNA. Fitopatologia brasileira 19:520-523. 1994.
VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro. (Tese - Doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 1996.

VILARINHOS, A.D., PAULA JR, T.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. & Characterization of races of *Colletotrichum lindermuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. *Fitopatologia Brasileira* 20:194-198. 1995.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEX, S.V. DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18:6531-6535. 1990.

00048