

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 113

ISSN 1679-0154
Dezembro, 2014

Diversidade Genética Estimada através de Marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2014

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 113

Diversidade Genética Estimada através de Marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil

Rodrigo Vêras da Costa
Dagma Dionísia da Silva
Luciano Viana Cota
Douglas Ferreira Parreira
Laércio Zambolim
Eliane Aparecida Gomes
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Wania dos Santos Neves
José Edson Fontes Figueiredo

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Rodrigo V. Costa

1ª edição

1ª impressão (2014): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Diversidade genética estimada através de marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil / Rodrigo Vêras da Costa ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 23 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 113).

1. Antracnose. 2. Milho. 3. Doença de planta. 4. Variabilidade genética. Costa, Rodrigo Vêras da. II. Série.

CDD 633.15 (21.ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusões	18
Referências	19

Diversidade Genética Estimada através de Marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil

*Rodrigo Veras Costa*¹
*Dagma Dionísia Silva*¹
*Luciano Viana Cota*¹
*Douglas Ferreira Parreira*²
*Laércio Zambolim*²
*Eliane Aparecida Gomes*¹
*Ubiraci Gomes de Paula Lana*¹
*Wania dos Santos Neves*³
*José Edson Fontes Figueiredo*¹

Resumo

A antracnose do milho causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* é uma das principais doenças da cultura no Brasil e no mundo, atacando praticamente todas as partes da planta. Neste trabalho foi avaliada a variabilidade genética de 95 isolados monospóricos de *C. graminicola*, provenientes dos estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. O DNA de cada isolado foi amplificado via PCR, utilizando-se 15 primers ISSR (do inglês, inter-simplified sequence repeat) como marcadores moleculares. Os fragmentos de DNA gerados pelo PCR-ISSR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose com a visualização da posição das bandas formadas nos géis. Do

¹Embrapa Milho e Sorgo, C.P.151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG.
E-mail: eliane.a.gomes@embrapa.br, rodrigo.veras@embrapa.br,
dagma.silva@embrapa.br, luciano.cota@embrapa.br, ubiraci.lana@embrapa.br,
jose.edson@embrapa.br

²Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG.
E-mail: douglas2002ufv@yahoo.com.br, zambolim@ufv.br

³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional EPAMIG Centro-Oeste. Prudente de Moraes, MG. E-mail: wanianeves@epamig.br

total de 15, nove primers foram selecionados em função do maior grau de polimorfismo gerado. Bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1) no gel, gerando-se uma matriz de dados analisada em um dendrograma pelo método UPGMA. Ao analisar o dendrograma foi traçada uma linha divisória no valor da distância de dissimilaridade de 0,3 dividindo os isolados em 7 grupos. Baseado nos resultados foi possível concluir que a variabilidade genética entre os isolados de *C. graminicola* é alta, sendo os marcadores ISSR eficazes na determinação de sua variabilidade. Os isolados utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação geográfica em relação ao local de coleta e parte da planta.

Palavras-chave: antracnose, milho, UPGMA.

Genetic Diversity Estimated Through ISSR Markers of *Colletotrichum graminicola* in Brazil

*Rodrigo Veras Costa*¹
*Dagma Dionísia Silva*¹
*Luciano Viana Cota*¹
*Douglas Ferreira Parreira*²
*Laércio Zambolim*²
*Eliane Aparecida Gomes*¹
*Ubiraci Gomes de Paula Lana*¹
*Wania dos Santos Neves*³
*José Edson Fontes Figueiredo*¹

Abstract

The anthracnose of corn caused by *Colletotrichum graminicola* is one of main diseases in the world, including Brazil, infecting any part of the plant. This study evaluated the genetic's variability of 95 monosporic isolates of *C. graminicola* from Brazilian states: Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul. The DNA of each isolate was amplified by PCR, using 15 ISSR primers (inter-simplified sequence repeat) as molecular markers. The DNA fragments generated by PCR-ISSR were evaluated by agarose gel electrophoresis with visualization of the position of bands on the gel. Among 15 primers, nine primers were selected based in highest degree of polymorphism obtained. Bands of the same molecular weight, in different individuals, were considered identical and designated according to the absence (0) and presence (1) in agarose gel, generating a data matrix analyzed to develop a dendrogram by UPGMA method. Analyzing the dendrogram was drawn a line in the amount of dissimilarity distance 0.3, dividing isolates in 7 groups. Based on the results

it was concluded that the genetic variability among isolates of *C. graminicola* is high and ISSR markers was being effective in determining that. Isolates used in this study do not show geographic structure in relation to the collection site and part of the plant.

Key words: anthracnose, corn, UPGMA.

Introdução

O gênero *Colletotrichum* agrupa alguns dos fungos fitopatogênicos mais importantes na agricultura, em virtude das perdas potenciais que podem causar, sendo primordial a capacidade de diagnóstico desta doença. Em milho, a antracnose causada por *C. graminicola*, destaca-se como uma das principais doenças da cultura (BERGSTRON; NICHOLSON, 1999), uma vez que o patógeno é capaz de infectar praticamente toda a planta. Na fase foliar, a doença caracteriza-se pela presença de lesões de formas variadas e necróticas, podendo ocorrer extensa queima das folhas. Nas nervuras, é comum a presença de lesões elípticas com acérvulos do patógeno. A fase de podridão de colmo é caracterizada pela formação, na casca, de lesões estreitas e elípticas, as quais tornam-se, posteriormente, marrom-escuras a negras pela formação de acérvulos do patógeno. Estimativas dos efeitos da antracnose foliar e podridão de colmo sobre a perda na produção de grãos de milho variam de 0 a 40%, dependendo da cultivar, das condições ambientais, da época de ocorrência das epidemias e da ocorrência de outras pragas (COTA et al., 2012; PERKINS; HOOKER, 1979).

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

O uso de marcadores moleculares se encontra bem difundido, existindo uma grande demanda quanto aos marcadores baseados nas reações de PCR em razão da simplicidade e da necessidade de pequenas quantidades de DNA da amostra. Os marcadores ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat) são

amplificados via PCR e não necessitam do sequenciamento da região, resultando ainda na obtenção de padrões altamente polimórficos com resultados que possuem repetibilidade (BORNET; BRANCHARD, 2001; NAGAOKA; OGIHARA, 1997). Além disso, são dominantes, podendo gerar um grande número de alelos reproduzíveis e altamente polimórficos utilizando um primer complementar a um microsatélite alvo. No trabalho realizado por Nghiaet al. (2008), além de marcadores ISSR, foram utilizados outros caracteres como morfologia de colônia e dos conídios nos estudos de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Malásia. Neste trabalho, os autores concluíram que apenas os caracteres morfológicos não seriam suficientes para diferenciar os isolados de *C. cassiicola*. Esses e outros trabalhos têm demonstrado o crescente uso destes marcadores sozinhos ou em conjunto com outras ferramentas no estudo da variabilidade dos fungos.

Considerando a inexistência de informações na literatura sobre o uso de marcadores ISSR para o fungo *C. graminicola* e o potencial do marcador molecular para estudo da diversidade do patógeno, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de populações de *C. graminicola* por meio de marcadores moleculares ISSR. Além disso, verificar o nível de variação de ISSRs entre isolados de *C. graminicola* provenientes de diferentes regiões e em função da parte da planta utilizada para o isolamento, quando possível (colmo, folha e nervura).

Material e Métodos

Obtenção dos Isolados Monospóricos de *C. graminicola*

Para obtenção dos isolados monospóricos de *C. graminicola*, fragmentos de colmo, folhas e nervura com sintomas típicos de antracnose, provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul foram esterilizados durante dois minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e transferidos para placas de Petri contendo meio de farinha de aveia-ágar-tetraciclina (FAAT) (aveia: 60 g/L, ágar: 20 g/L, tetraciclina: 300 mg.100 mL⁻¹). As placas foram incubadas em condição de luz fluorescente intermitente a ± 25 °C, durante sete a oito dias, para induzir a esporulação. Após a esporulação, os conídios foram colhidos, adicionando-se, aproximadamente, 10 mL de água estéril em cada placa, seguindo-se uma raspagem superficial para sua liberação.

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

de ensaio, foram adicionados 10 mL de óleo mineral estéril para preservação das culturas até a necessidade de utilização.

Obtenção de Massa Micelial de *C. graminicola*

Para a obtenção de massa micelial de *C. graminicola*, foram utilizados 95 isolados monospóricos provenientes dos estados de Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP). Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio FAAT e mantidos a 25 °C por 7 dias. Fragmentos de micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido YES (10 g/L de sacarose, 6g/L de extrato de levedura e 6g/L de caseína) previamente esterilizado, adicionado de 1 mL dos antibióticos estreptomicina e tetraciclina (0,300 mg/mL). Os frascos foram mantidos em agitador a 90 rpm a 28 °C por 72 horas. A massa micelial foi filtrada em duas camadas de gaze esterilizada, e em seguida em papel de filtro esterilizado. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, envoltas por papel alumínio até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA Genômico

Utilizou-se a metodologia de extração de DNA descrita por Sanghai-Marooft al. (1984), modificada. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e adicionados 350 µL de tampão CTAB [2 % (m/v) CTAB; 0,2 M Tris- HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol]. A mistura foi mantida em banho-maria a 65 °C durante uma hora. Após resfriamento por 5 minutos em condição ambiente, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com

homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 300 μL de isopropanol mantido a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por, no mínimo, uma hora. Os microtubos foram levados à centrífuga e o material contido neles foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 140 μL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente levados centrífuga por 10 minutos a uma rotação de 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual seco em estufa a $65\text{ }^\circ\text{C}$ por cinco minutos. Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 50 μL de tampão TE contendo de RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A). A concentração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop e ajustada para 10 ng/ μL , diluindo-se o DNA estoque em água ultrapura. O DNA foi armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da amplificação.

Amplificação do DNA

Foi realizada uma pré-seleção dos primers, utilizando-se inicialmente 16 primers ISSR: AAC, GACA, CGA, ACA, CCA, GT, CAC, ACTG, GTG, GCGT, CTCGC, AGTC, GAGG, GAAT, AAG e TGGT, sendo posteriormente selecionados nove primers que resultaram em um maior polimorfismo do DNA no gel de agarose, AAC, GACA, ACA, GT, ACTG, CTCGC, GAGG, GAAT e AAG. As reações de amplificação por PCR foram iguais para os nove primers selecionados, sendo preparado um volume final de 20 μL , consistindo-se de 3 μL de DNA (10ng/ μL); 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125 mM dNTPs e 0,5 μM de cada primer. Os ciclos de amplificação foram: $94\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, 94

°C por 1 minuto, 45 °C por um minuto, 72 °C por dois minutos. Sendo este último ciclo repetido 35 vezes, seguido por um ciclo de 72 °C por 10 minutos, mantendo as reações a 10 °C até a retirada da amostra. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems - PCR System 9700. Às reações foram adicionados 4µL de corante, sendo essas submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) a 100 V durante uma hora e trinta minutos em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 20 minutos, descorado em água por 5 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Kodak - Gel logic 200.

Análise dos Dados

Os fragmentos de DNA gerados pelo PCR- ISSR foram avaliados mediante inspeção visual dos géis. Bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1) no gel. Os dados foram analisados empregando o método UPGMA utilizando-se 3 coeficientes de dissimilaridade: Dice, Jaccard e Pearson, a matriz de dissimilaridade e o coeficiente de correlação cofenética foram processados através do site <http://genomes.urv.es/UPGMA/> (GARCIA-VALLVE et al., 1999) e a matriz foi utilizada para a confecção do dendrograma no programa Statistica 7.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi obtida uma coleção de 95 isolados monospóricos de *C. graminicola*, devidamente identificados

na Tabela 1. Os nove primers ISSR amplificaram de forma consistente o DNA dos 144 isolados, produzindo um total de 66 bandas polimórficas, com média de 49 bandas amplificadas por isolado. O primer que obteve o maior número de bandas amplificadas foi o primer GT com 15 bandas e o primer com menor número foi GACA com três bandas, sendo a média de 7,33 bandas por primer.

As matrizes geradas obtiveram os seguintes coeficientes de correlação cofenética: Dicer 0.18, Jaccard 0.80 e Pearson 0.08. O coeficiente de correlação cofenética estima o quanto o dendrograma esta adequado às interações entre os acessos, o valor 1 significa que a relação entre os dados e o dendrograma é perfeita (MAY, 1999). Romesburg (1984) considerou em seu trabalho que valores maiores ou iguais a 0,8 são satisfatórios, Vaz Patto et al. (2004) abordam que valores acima de 0,56 representam um bom alinhamento entre as matrizes de dissimilaridade e agrupamento. Desta forma, selecionou-se o coeficiente de Jaccard para a análise de agrupamento.

Ao analisar o dendrograma, foi considerada a linha divisória no valor da distância genética de 0,3 dividindo os isolados em 7 grupos. Dentre os 95 isolados, 6 não se agruparam (Figura 1). Baseado na análise dos grupos formados, não foi encontrada estruturação geográfica entre os isolados, o mesmo ocorreu em relação a parte da planta utilizada no isolamento de *C. graminicola*: colmo (C), folha (F) e nervura (N), alguns isolados mais antigos não possuíam esta informação sendo denominados indeterminados (?) (Tabela 1). O primeiro grupo agregou 75 isolados pertencentes aos estados de GO, MG, PR, RS, SC e SP; o segundo grupo, quatro isolados do PR; o terceiro grupo, dois isolados de SC e PR; o quarto grupo, dois isolados

um de MG outro do PR; os demais grupos (5,6 e 7), dois isolados do PR. Os isolados com maior similaridade foram os isolados 44-07 e 46-07 com distância genética de 0,019, sendo os dois isolados da cidade de Passo Fundo (RS).

Um dos primeiros trabalhos avaliando a diversidade de *C. graminicola* foi realizado por Forgey et al. (1978), utilizando dez isolados e dez progênies de milho, que, baseados nos resultados do teste de inoculação cruzada em que cada um dos isolados foi inoculado nas dez progênies de milho, propuseram a ocorrência de 8 raças fisiológicas. Posteriormente, Nicholson e Warren (1981), utilizando sete dos dez isolados empregados no trabalho de Forgey et al. (1978), contestaram a presença de raças, atribuindo a diferença quanto a sintomatologia ao fato dos autores não terem padronizado os inóculos no experimento. Segundo Bergstrom e Nicholsonsom (1999), existe uma grande variabilidade quanto à agressividade da antracnose em folhas e colmo de milho, a existência de 5 raças de *C. graminicola* foi comprovada por Costa et al. (2014), que utilizaram 190 isolados inoculados em 15 genótipos de milho. Atualmente, outra maneira de verificar a variabilidade de um organismo pode ser obtida com o uso de marcadores moleculares, diferenciando os indivíduos baseado no seu material genético. Ratanacherdchaie et al. (2010) trabalharam com variabilidade de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* com três genótipos de pimenta utilizando marcadores ISSR, o dendrograma obtido agrupou os isolados quanto a sua origem geográfica, propondo assim o uso de marcadores ISSR no estudo da diversidade genética em *Colletotrichum* spp, afirmando ainda que tais técnicas auxiliam no estudo da dinâmica populacional do patógeno permitindo estratégias de controle com uma melhor eficiência.

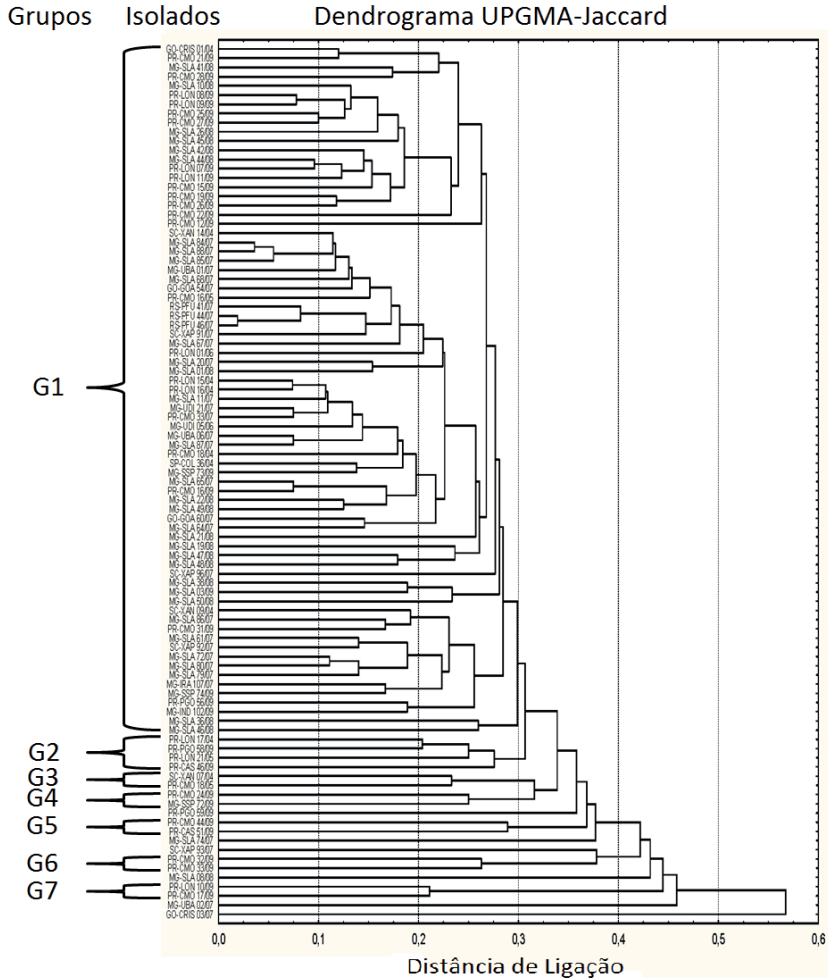


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGA (coeficiente de Jaccard), utilizando 66 bandas amplificadas pelos nove primers ISSR, detectadas em 95 isolados monospóricos de *C. graminicola*. Vide Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos isolados utilizados no trabalho seguindo a ordem presente no dendrograma pelo método UPGA (eixo y) de cima para baixo, com descrição do número do isolado, parte da planta utilizada para o isolamento (folha-F, colmo-C, nervura-N e indeterminado-?), local de coleta (estado e cidade) e a qual grupo o isolado foi classificado (baseado no agrupamento UPGA utilizando o coeficiente de Jaccard).

UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo	UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo	UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo
1	GO	Cristalina	1	4	?	1	33	MG	Sete Lagoas	67	7	C	1	65	MG	Sete Lagoas	61	7	C	1
2	PR	Campo Mourão	21	9	F	1	34	PR	Londrina	1	6	?	1	66	SC	Xapacó	92	7	C	1
3	MG	Sete Lagoas	41	8	F	1	35	MG	Sete Lagoas	20	7	?	1	67	MG	Sete Lagoas	72	7	C	1
4	PR	Campo Mourão	28	9	F	1	36	MG	Sete Lagoas	1	8	C	1	68	MG	Sete Lagoas	80	7	C	1
5	MG	Sete Lagoas	10	8	F	1	37	PR	Londrina	15	4	?	1	69	MG	Sete Lagoas	79	7	C	1
6	PR	Londrina	8	9	F	1	38	PR	Londrina	16	4	?	1	70	MG	Iraí	107	7	C	1
7	PR	Londrina	9	9	F	1	39	MG	Sete Lagoas	11	7	C	1	71	MG	São Sebastião do Paraíso	74	9	N	1
8	PR	Campo Mourão	25	9	F	1	40	MG	Uberlândia	21	7	N	1	72	PR	Ponta Grossa	56	9	F	1
9	PR	Campo Mourão	27	9	F	1	41	PR	Campo Mourão	33	7	?	1	73	MG	Indiápolis	102	9	N	1
10	MG	Sete Lagoas	26	8	F	1	42	MG	Uberlândia	5	6	?	1	74	MG	Sete Lagoas	36	8	F	1
11	MG	Sete Lagoas	45	8	F	1	43	MG	Uba	6	7	F	1	75	MG	Sete Lagoas	46	8	F	1
12	MG	Sete Lagoas	42	8	F	1	44	MG	Sete Lagoas	87	7	C	1	76	PR	Londrina	17	4	?	2
13	MG	Sete Lagoas	44	8	F	1	45	PR	Campo Mourão	18	4	?	1	77	PR	Ponta Grossa	58	9	F	2
14	PR	Londrina	7	9	F	1	46	SP	Colombia	36	4	?	1	78	PR	Londrina	21	5	?	2
15	PR	Londrina	11	9	F	1	47	MG	São Sebastião do Paraíso	73	9	N	1	79	PR	Cascavel	46	9	F	2
16	PR	Campo Mourão	15	9	F	1	48	MG	Sete Lagoas	65	7	C	1	80	SC	Xaxerê	7	4	?	3
17	PR	Campo Mourão	19	9	F	1	49	PR	Campo Mourão	16	9	F	1	81	PR	Campo Mourão	18	5	?	3
18	PR	Campo Mourão	26	9	F	1	50	MG	Sete Lagoas	22	8	F	1	82	PR	Campo Mourão	24	9	F	4
19	PR	Campo Mourão	22	9	F	1	51	MG	Sete Lagoas	49	8	F	1	83	MG	São Sebastião do Paraíso	72	9	N	4
20	PR	Campo Mourão	12	9	F	1	52	GO	Goiânia	60	7	?	1	84	PR	Ponta Grossa	59	9	F	?
21	SC	Xaxerê	14	4	?	1	53	MG	Sete Lagoas	64	7	C	1	85	PR	Campo Mourão	44	9	F	5
22	MG	Sete Lagoas	84	7	C	1	54	MG	Sete Lagoas	21	8	F	1	86	PR	Cascavel	51	9	C	5
23	MG	Sete Lagoas	88	7	C	1	55	MG	Sete Lagoas	19	8	F	1	87	MG	Sete Lagoas	74	7	C	?
24	MG	Sete Lagoas	85	7	C	1	56	MG	Sete Lagoas	47	8	F	1	88	SC	Xapacó	93	7	C	?
25	MG	Uba	1	7	N	1	57	MG	Sete Lagoas	48	8	F	1	89	PR	Campo Mourão	32	9	F	6
26	MG	Sete Lagoas	68	7	C	1	58	SC	Xapacó	96	7	F	1	90	PR	Campo Mourão	33	9	F	6
27	GO	Goiânia	54	7	?	1	59	MG	Sete Lagoas	38	8	F	1	91	MG	Sete Lagoas	8	8	F	?
28	PR	Campo Mourão	16	5	?	1	60	MG	Sete Lagoas	3	9	F	1	92	PR	Londrina	10	9	F	7
29	RS	Passo Fundo	41	7	?	1	61	MG	Sete Lagoas	50	8	F	1	93	PR	Campo Mourão	17	9	F	7
30	RS	Passo Fundo	44	7	?	1	62	SC	Xaxerê	9	4	?	1	94	MG	Uba	2	7	F	?
31	RS	Passo Fundo	46	7	?	1	63	MG	Sete Lagoas	86	7	C	1	95	GO	Cristalina	3	7	F	1
32	SC	Xapacó	91	7	C	1	64	PR	Campo Mourão	31	9	F	1							?

Conclusões

Neste trabalho foi encontrada uma grande variabilidade entre os isolados corroborando as inferências sobre a grande variabilidade de *C. graminicola* proposta por Bergstrom e Nicholson (1999). A variabilidade genética é uma condição presente em patossistemas silvestres; em condições naturais, a pressão de seleção entre fitopatógenos e plantas hospedeiras é recíproca, e junto com os fatores ambientais atuam na flutuação dos genes de resistência e virulência do patossistema (ANIKSTER; WHAL, 1979). No sistema de produção atual, a alteração dos cultivos por meio do melhoramento, a ampliação de fronteiras agrícolas e o uso desmedido de defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos. Todos estes fatores favorecem novos genes de virulência e o polimorfismo na estrutura dessas populações (ARAYA, 2003). Em 2008, um gene que codifica para uma proteína de resistência à antracnose do colmo foi clonado (BROGLIE et al., 2006), o simples uso desse gene nos futuros híbridos pode exercer uma pressão direcional sobre a população do patógeno, rumo ao surgimento de novos patótipos (CASELA; GUIMARÃES, 2005; VAN DER PLANK, 1968). O estudo da variabilidade do patógeno permite a previsão do tempo em que novos genótipos tidos como resistentes permanecerão efetivos no mercado. Segundo Costa et al. (2014), o mapeamento das raças de *C. graminicola* predominantes no Brasil na fase foliar da doença auxilia os produtores na escolha do genótipo a ser plantado. Este tipo de estudo também serve de base para programas de melhoramento vegetal visando a busca de genótipos resistentes a doenças e ao maior número de raças do patógeno. **Conclusões**

A variabilidade genética entre os isolados de *C. graminicola* coletados nos estados de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul é alta.

Marcadores ISSR são eficientes na determinação da variabilidade de *C. graminicola*.

Os isolados de *C. graminicola* utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação geográfica no Brasil.

Os isolados de *C. graminicola* utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação em relação a parte da planta utilizada na obtenção do isolado.

Referências

ANIKSTER, Y.; WHAL, I. Coevolution of the rust fungi on gramineae and liliaceae and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 367-403, 1979.

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

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

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

Broglie, K. E.; Butler, K. H.; Butruille, M. G.; Silva, A. C. da; Frey, T. J.; Hawk, J. A.; Jaqueth, J. S.; Jones, E. S.; Multani, D. S.; Wolters, P. J. C. C. Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. **United States Patent Application** US n. 2006/02233102, 05 out. 2006. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/20060223102.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2014.

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

Cai, L.; Hyde, K. D.; Taylor, P. W. J.; Weir, B. S.; Waller, J.; Abang, M. M.; Zhang, J. Z.; Yang, Y. L.; Phoulivong, S.; Liu, Z. Y.; Prihastuti, H.; Shivas, R. G.; McKenzie, E. H. C.; Johnston, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

CASELA, C. R.; GUIMARÃES, F. B. Rotação de genes no manejo da resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 321-349, 2005.

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

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

Crouch, J. A.; Clarke, B. B.; Hillman, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored, graminicolous

Colletotrichum group. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 648-656, 2009a.

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

Costa, R. V. da; Cota, L. V.; Silva, D. D. da; Parreira, D. F.; Casela, C. R.; Landau, E. C.; Figueiredo, J. E. F. Races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to maize in Brazil. **Crop Protection**, Surrey, v. 56, p. 44-49, 2014.

Cota, L. V.; Costa, R. V.; SILVA, D. D.; Parreira, D. F.; Casela, C. R.; Lanza, F. E. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, p. 680-684, 2012.

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

GARCIA-VALLVE, S.; PALAU, J.; ROMEU, A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from códon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 1125-1134, 1999.

Hyde, K. D.; Cai, L.; Cannon, P. F.; Crouch, J. A.; Crous, P. W.; Damm, U.; Goodwin, P. H.; Chen, H.; Johnston, P. R.; Jones, E. B. G.; Liu, Z. Y.; McKenzie, E. H. C.; Moriwaki, J.; Noireung, P.; Pennycook, S. R.; Pfenning, L. H.; Prihastuti, H.; Sato, T.; Shivas,

R. G.; Tan, Y. P.; Taylor, P. W. J.; Weir, B. S.; Yang, Y. L.; Zhang, J. Z. *Colletotrichum*: names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-182, 2009a.

Hyde, K. D.; Cai, L.; McKenzie, E. H. C.; Yang, Y. L.; Zhang, J. Z.; Prihastuti, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009b.

MAY, A. C. W. Towards more meaningful hierarchical classification of amino acid scoring matrices. **Protein Engineering**, Washington, v. 12, p. 707-712, 1999.

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

Nghia, N. A.; Kadir, J.; Sunderasan, E.; Abdullah, M. P.; Malik, A.; Napis, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, The Hague, v. 166, p. 189-201, 2008.

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

Perkins, J. M.; Hooker, A. L. The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Diseases Reporter**, Beltsville, v. 63, p. 26-30, 1979.

Ratanacherdchai, K.; Wang, H.-K.; Lin, f.-c.; Kasem Soyong, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 76-83, 2010.

Romesburg, H. C. **Cluster analysis for researchers**. Belmont, CA: Lifetime Learning Publishers, 1984.

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

VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plant**. New York: Academic Press, 1968. 206 p.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, p. 63-72, 2004.

