

MÍRIAM GOLDFARB

**CARACTERIZAÇÃO DE RETROTRANSPÓSONS LTR E
VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Sclerotinia
sclerotiorum* DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G618c
2014 Goldfarb, Miriam, 1981-
Caracterização de retrotransposons LTR e variabilidade genética
em populações de *Sclerotinia sclerotiorum* do Estado de Minas Gerais /
Miriam Goldfarb. - Viçosa, MG, 2014.
xiv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Mofo-branco. 3. Genoma. 4.
Diversidade genética. 5. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 632.478151

MÍRIAM GOLDFARB

**CARACTERIZAÇÃO DE RETROTRANSPOSONS LTR E
VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Sclerotinia
sclerotiorum* DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de junho de 2014.

Everaldo Gonçalves de Barros

Mateus Ferreira Santana

Marisa Vieira de Queiroz

Denilce Meneses Lopes

Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

***“(...) Criamos a época da velocidade, mas nos sentimos enclausurados dentro dela.
A máquina, que produz abundância tem-nos deixado em penúria.
Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos; nossa inteligência, empedernidos e cruéis.
Pensamos em demasia e sentimos muito pouco.
Mais do que máquinas, precisamos de humanidade.
Mais do que inteligência, precisamos de afeição e doçura.
Sem essas virtudes a vida será de violência, e tudo será perdido (...)”***

***O Grande Ditador
Charles Chaplin***

A DEUS,

Ao meu pai Júlio Goldfarb (*in memoriam*) que esteve sempre presente contribuindo na minha formação educacional, apoiando-me e respeitando as minhas escolhas.

A minha mãe, Walberlena Goldfarb, minha grande amiga, sempre me ajudando em tudo.

Ao meu irmão Moisés Goldfarb, pelos conselhos e ajuda.

Ao meu noivo Wendelin Kaiser, pelo seu apoio e carinho.

Serei sempre agradecida a minha família por ter me ensinado a viver com dignidade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter nos dado uma natureza, com tantas possibilidades de pesquisas que só venham ajudar a humanidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realização deste trabalho e por ter me proporcionado mais conhecimentos científicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Tânia Maria Fernandes Salomão pela orientação e dedicação a esta pesquisa.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela orientação, os importantes ensinamentos, paciência, apoio nesta pesquisa e amizade.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Ao coordenador José Eduardo Serrão do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela atenção e apoio.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Elizabeth Alves Pena pelo apoio, atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao professor Mateus Ferreira Santana pelos ensinamentos, atenção, apoio e importantes contribuições que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos, obrigada por tudo.

Ao pesquisador Trazilbo José de Paula Júnior e o doutorando Miller da Silva Lehner do departamento de Fitopatologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-EPAMIG, pela contribuição nas etapas iniciais desta pesquisa, em especial por ceder matéria-prima e no auxílio durante a realização deste trabalho no laboratório de Fitopatologia.

Aos professores Maurílio Alves Moreira (*in memoriam*) e Cleberson Ribeiro pela atenção e em fornecer estrutura e equipamentos para o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas I (Biomol), tornando possível a realização deste trabalho.

Às funcionárias Marlene e Gláucia pela ajuda.

Ao pesquisador Newton Deniz Piovesan, pelo auxílio na casa-de-vegetação e em fornecer matéria-prima.

À técnica Renata Barbosa do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, pela ajuda e em fornecer materiais.

Aos amigos Pedro Scarpelli e Josiane Rodrigues pela ajuda, ensinamentos, e apoio durante as etapas de biologia molecular deste trabalho e amizade.

Aos colegas Luiz Cláudio, Roxane, Isadora, Leonardo e Alexandre, do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas I (Biomol), pela ajuda nesta pesquisa, agradável convivência no laboratório e amizade. A estes colegas, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores José Lino Neto, Juliana Silva Rocha e Mariana Machado Neves pela amizade, momentos agradáveis, confraternizações, etc. Agradecimento especial a José Lino pelo apoio e os momentos alegres em Viçosa, os quais foram muito importantes.

Aos queridos amigos Leila Martins e José Helvécio Martins, pelo grande apoio, por te me ajudado no início em Viçosa e durante todo o período de doutorado, sempre com disponibilidade e atenção comigo. E a querida D. Teresinha (*in memoriam*). Obrigada por tudo.

À Cláudia Vânia Miranda de Oliveira, pelo incentivo, apoio, conselhos, nossas longas conversas e em ajudar a superar as dificuldades durante esses quatro anos. Agradecimentos imensos, obrigada pela amizade e por tudo.

Aos queridos amigos, Edson, Myrian, Luiz Fernando, Flaviana, Fernanda Godoy, Eliziária e Livia, pelos bons momentos em Viçosa e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

BIOAGRAFIA

Míriam Goldfarb, filha de Júlio Goldfarb (*in memoriam*) e Walberlena Goldfarb, nasceu em Campina Grande, Estado da Paraíba, em 04 de junho de 1981.

Em março do ano de 2004, formou-se em Licenciatura Plena e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, em Campina Grande, Paraíba.

Em março de 2006, ingressou no Curso de Mestrado em Engenharia Agrícola com ênfase em armazenamento e fitossanidade de sementes oleaginosas, da Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, em Campina Grande, Paraíba, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2008.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, com ênfase em genética e biologia molecular de fungos fitopatogênicos, da Universidade Federal de Viçosa, UFV, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2014.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específico.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Aspectos gerais sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
3.1.2 Características reprodutivas.....	6
3.2 Mofo-branco.....	8
3.3 Principais culturas com incidência do mofo-branco.....	10
3.4 Elementos transponíveis	12
3.5 Transposons em eucariotos e importância nos fungos fitopatogênicos.....	13
3.5.1 Generalidades sobre os transposons em fungos e no genoma de <i>S. sclerotiorum</i>	13
3.6 Classificação geral dos elementos transponíveis	14
3.6.1 Mecanismos de transposição.....	17
3.7. Regulação.....	19
3.8 Aspectos evolutivos dos transposons.....	20
3.9 Marcadores Moleculares	24
3.9.1 Técnicas IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) e REMAP(Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).....	24
3.10 Importância dos transposons como marcadores moleculares para fungos fitopatogênicos.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

CAPÍTULO I-Copia-LTR_SS e Gypsy-LTR_SS: RETROTRANSPOSONS NO GENOMA DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> AGENTE CAUSAL DO MOFO-BRANCO.....	33
RESUMO.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Identificação e classificação dos elementos transponíveis.....	37
2.2 Evidências de RIP (Repeat-Induced Point Mutation).....	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1 Dois novos retrotransposons que pertencem à superfamília <i>Copia</i> e <i>Gypsy</i> foram encontrados no genoma de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	39
3.2 RIP (Repeat-Induced Point Mutation) em sequências de LTR <i>Copia-LTR_SS</i> e <i>Gypsy-LTR_SS</i> presentes em <i>S. sclerotiorum</i>	42
4. DISCUSSÃO.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO II- VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> DO ESTADO DE MINAS GERAIS POR MEIO DA TÉCNICA MOLECULAR IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism).....	49
RESUMO.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Material biológico.....	53
2.2 Purificação e cultivo dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
2.3 Extração de DNA total de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	57
2.4 Obtenção de primers com base em sequências de nucleotídeos de transposons de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e reação de cadeia da polimerase (PCR).....	58
2.5 Diversidade genética de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	59
3. RESULTADOS.....	61
4. DISCUSSÃO.....	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

CONCLUSÕES GERAIS	76
ANEXOS.....	78

RESUMO

GOLDFARB, Míriam, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2014. **Caracterização de retrotransposons LTR e variabilidade genética em populações de *Sclerotinia sclerotiorum* do Estado de Minas Gerais**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Sclerotinia sclerotiorum é o agente causal do mofo-branco e pode causar doenças em mais de 200 gêneros de plantas, abrangendo 408 espécies hospedeiras. Os elementos transponíveis encontrados no genoma de diversos fungos, podem ser utilizados como marcadores para traçar o perfil genético de populações de fungos fitopatogênicos. Os objetivos deste trabalho foram: i) identificar e classificar retrotransposons no genoma de *S. sclerotiorum* e utilizá-los como marcadores moleculares por meio da técnica IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) e ii) estimar a variabilidade genética de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Foram identificados no banco genômico de *Sclerotinia sclerotiorum* dois retrotransposons denominados de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*. Esses elementos pertencem às superfamílias *Copia* e *Gypsy*, respectivamente. O retroelemento *Copia-LTR_SS* possui sequências de 5.344 pb, uma ORF (sequência de leitura aberta) que codifica as proteínas *gag* e a presença de todas as proteínas da região *pol*, incluindo as enzimas que integram o transposon no genoma. O retroelemento *Gypsy-LTR_SS* possui sequências de 6.469 pb, sequências que codificam a proteína *gag* e a região *pol* com apenas sequências que codificam as enzimas transcriptase reversa e RNase H. Os dois elementos possuem regiões PPT (Polypurine Tract) e PBS (Primer Binding Site). Um grande número de LTRs-Solo e elementos TRIMs foram identificados como também a presença de mecanismo de silenciamento do tipo RIP (Repeat-Induced Point Mutation) capaz de inativar os transposons por meio mutações pontuais. A presença de LTR-Solo e TRIM (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*) em *S. sclerotiorum* evidencia a ocorrência de recombinações no genoma desta espécie de fungo e sugere uma reestruturação do mesmo mediado por

elementos transponíveis. O marcador molecular IRAP foi eficiente para identificar marcas polimórficas no genoma de *S. sclerotiorum*, permitindo assim o estudo de variabilidade genética neste fungo. Foi estimada a variabilidade genética em populações de *S. sclerotiorum* do estado de Minas Gerais, compreendendo 98 isolados procedentes de quatro regiões geográficas (Zona da Mata, Noroeste, Sul e Triângulo Mineiro). Alta diversidade genética foi observada em todas as populações avaliadas, sendo os valores de diversidade gênica de Nei e dos índices de Shannon estimados em 0,17 a 0,35 (diversidade gênica de Nei) e 0,27 a 0,52 (Índice de Shannon). A análise da AMOVA resultou em altos valores de variação gênica dentro das subpopulações analisadas sendo de 99,74% para as subpopulações da Zona da Mata e de 100% para as do Noroeste. Os baixos valores de *Fst* para Zona da Mata (0,00262) e Noroeste (-0,02150) indicam que nestas duas populações suas respectivas subpopulações não estão geneticamente estruturadas quanto à região geográfica. O marcador molecular IRAP foi eficiente para identificar marcas polimórficas no genoma de *S. sclerotiorum*. O presente trabalho é o primeiro estudo relatado sobre análise de diversidade *S. sclerotiorum* com base em transposons. Os dados obtidos poderão contribuir para a implementação de estratégias de controle e manejo do mofo-branco bem como para elaboração de programas de melhoramento genético do feijoeiro.

ABSTRACT

GOLDFARB, Míriam, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2014.
Characterization of LTR retrotransposons and genetic variability in populations of *Sclerotinia sclerotiorum* of the state of Minas Gerais.
Advisor: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Sclerotinia sclerotiorum is the causal pathogenic agent of the white mold and it is able to cause diseases in more than 200 different species of plants, including 408 host species. The transposable elements were detected in the genome of various species of fungus. These elements can also be used as markers for the characterisation of the genetic profile and the populations of the phytopathogenic fungi. The topic and aim of this research is: (i) to identify and classify the retrotransposons in the genome of *S. sclerotiorum* and the application of the same to serve as a molecular marker using the IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) technique and ii) to estimate the genetic variability of *S. sclerotiorum* in different regions in the State of Minas Gerais. In the genomic bank of *Sclerotinia sclerotiorum* two different kind of retrotransposons called *Copy LTR _ SS* and *Gypsy-LTR_SS* were identified. Each of these elements belongs in the superfamilies named of the *Copy* and *Gypsy*. The *Copy-LTR _ SS* retroelement has the sequences with the value of 5.344 pb and an ORF (Open Reading Frame), that encodes the *Gag* proteins and the presence of all the proteins from the *pol* region, also including the enzymes which contain the transposon inside the genome. The *Gypsy-LTR_ SS* retroelement has the sequences with the value of 6.469 pb. These sequences encode the *gag* protein and the *pol* region, which exclusively consist of sequences that encode the reverse transcriptase and RNase H enzymes. The two elements, which were identified, consist of the PPT region (Polypurine Tract) and the PBS region (Primer Binding Site). Furthermore a large number of Solo LTRs and TRIMs elements were identified and the presence of the mechanism of inactivation of the transposon RIP (Repeat-Induced Point Mutation) were proved. This mechanism is able to inactivate the transposons by selective mutations.

LTR-solo and TRIM (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*) were found in *S. sclerotiorum*, which indicate the presence of recombinations in the genome of this specie. This is a sign of a restructuration of the genome that are mediated through the transposable elements. The molecular marker IRAP was efficiently used to identify the polymorphic marks in the genome of *S. sclerotiorum*. Thus it will be possible to enable the study of the genetic variability in this sort of fungus. An estimation was performed to confirm the genetic variability of the populations of *S. sclerotiorum* in the State of Minas Gerais. Therefore 98 isolates from four different regions in the State of Minas Gerais were needed for the experiment (Zona da Mata, Northwest, South and Triângulo Mineiro). A high genetic diversity was observed in all the evaluated populations, also confirmed by the high values for the genetic diversity, which were found by Nei and Shannon. The estimated values were between 0,17 up to 0,35 (genetic diversity) and between 0,27 up to 0,52 (Index of Shannon). Moreover the analysis of the AMOVA-research provided and cofirmed the high values for the genetic variation, 99,74% of variation within the subpopulations in the Zona da Mata, and 100% of variation within the subpopulations in the Northwest. Considering the geographic region, the low values of *Fst* for the Zona da Mata (0,00262) and Northwest (-0,02150) suggest that these two populations and their respective subpopulations were not genetically structured. The molecular marker IRAP was efficiently used to identify the polymorphic marks in the genome of *S. sclerotiorum*. The present work is the first reported study, which is concerned with the analysis of the diversity in *S. sclerotiorum* based on transposons. The obtained data could be used to contribute the implementation of strategies to control and handle the white mold, as well as it could be useful for the preparation of programs for the genetic improvement of beans.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Helotiales, da classe Ascomycotina, é composta por três gêneros de fungos patogênicos (*Sclerotinia*, *Monolinia* e *Botryotinia*). Estes fungos, que ocorrem principalmente na fase anamórfica, causam diferentes tipos de doenças. Membros do gênero *Sclerotinia* afetam diversos órgãos suculentos das plantas, principalmente de hortaliças e de culturas anuais (KRUGNER e BACCHI, 1995). A espécie *S. sclerotiorum*, amplamente distribuída nos solos do mundo todo, em ambiente favorável, é muito agressiva e capaz de infectar raízes, flores, vagens, sementes, caules e frutos (PURDY, 1979). Além disso, *S. sclerotiorum* possui um conjunto de hospedeiros que abrange pelo menos 408 espécies e 278 gêneros de plantas e é comumente associada a perdas significativas de rendimento, principalmente em lavouras comerciais de feijão, soja, algodão e tomate (CHARCHAR et al., 1999).

Sclerotinia sclerotiorum é o agente causal do mofo-branco e os principais sintomas desta doença são manchas de aspecto encharcado, podendo afetar toda a parte aérea da planta. Sob alta umidade, forma-se o micélio branco sobre o tecido afetado, e as lesões aumentam, podendo evoluir até a causar morte da espécie hospedeira (ITO e PARISI, 2009).

Em geral, as formas de prevenção do mofo-branco são a utilização de sementes saudáveis, uso de micro organismos antagônicos no solo, práticas culturais como rotação de culturas, eliminação de resíduos culturais, manejo de água de irrigação e uso de fungicidas específicos (OLIVEIRA, 2009). No entanto, o uso de cultivares resistentes no controle de doenças vegetais representa, hoje, um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. Este é um método de controle preferido por ser de baixo custo e de fácil utilização. Doenças como ferrugens e

carvões dos cereais e da cana-de-açúcar, as murchas vasculares em hortaliças e as viroses na maioria das culturas são exemplos de doenças cujo controle se dá, quase que exclusivamente, por meio da resistência das cultivares ao patógeno (CAMARGO e BERGAMIN FILHO, 1995). A obtenção e uso de cultivares resistentes é, também, importante no melhoramento de espécies vegetais visando resistência e/ou tolerância a *S. sclerotiorum*, considerando às características deste patógeno (KULL et al., 2003). A resistência genética do hospedeiro é uma forma viável de evitar o desenvolvimento do patógeno, no entanto, deve ser considerada a relação planta-patógeno e a existência de diversidade genotípica intrínseca na população do patógeno.

A capacidade dos agentes fitopatogênicos de causar doença está sob controle genético. O estudo da genética da patogenicidade, no entanto, apresenta limitações pois, cruzamentos controlados são possíveis apenas em um número limitado de espécies fitopatogênicas devido à ausência do ciclo sexuado em diversas espécies além da dificuldade ou impossibilidade de cultivar certos patógenos em meio artificial. Devido a estas limitações, o estudo do controle genético da patogenicidade, utilizando métodos clássicos, tem sido restrito a apenas algumas espécies fúngicas. Por outro lado, o advento das técnicas moleculares de manipulação do DNA tem possibilitado a análise genética da patogenicidade permitindo, até mesmo, a identificação e a clonagem de genes envolvidos na patogênese (CAMARGO, 1995).

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados com eficiência no estudo de diversidade genética em diferentes grupos taxonômicos, incluindo fungos. Este tipo de estudo é importante, pois gera subsídios para implementação de estratégias de controle e manejo de doenças fitopagênicas bem como para implementação de programas de melhoramento genético de plantas. Dentre os marcadores atualmente utilizados destacam-se os baseados em elementos transponíveis.

Os transposons, em geral, correspondem de 2 a 20% do genoma da maioria das espécies, podendo em alguns casos chegar a mais de 50%.

Estima-se que 80% das mutações espontâneas em *Drosophila* são geradas pela ação dos transposons. Assim, os transposons, constituem uma importante fonte de variabilidade genética (REGNER e LORETO, 2003). Desta forma, os elementos transponíveis constituem ferramentas úteis para traçar o perfil de populações bem como para identificar raças específicas de patógenos em estudos evolutivos e de transferência genética.

MURATA et al. (2008) mencionam que a atividade de elementos transponíveis pode gerar alta variabilidade em fungos fitopatogênicos e que os retrotransposons por suas características e padrão polimórfico gerado, podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos marcadores moleculares.

Diversos estudos de diversidade com fungos utilizando análise de transposons foram relatados por SANTANA et al. (2012), SANTOS et al. (2011) e IGNACCHITI et al. (2011). No entanto, até o momento, nenhum estudo com *S. sclerotiorum* foi encontrado na literatura. Considerando a importância deste fungo por, dentre outros fatores, causarem perdas significativas de diversas culturas economicamente importantes, a aquisição de novos conhecimentos a respeito deste patógeno se faz necessário, o que justifica o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Caracterizar retrotransposons no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum* e utilizá-los como marcador molecular via técnica IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism).

2.2. Objetivos específicos:

- Identificar e classificar retrotransposons no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da enzima transcriptase reversa *in silico*;
- Estimar a variabilidade genética entre isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da técnica IRAP.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum, agente etiológico do mofo-branco, é uma espécie altamente polífaga por ter mais de 400 espécies hospedeiras (BOLAND e HALL, 1994). No Brasil, a lista de hospedeiros é extensa, incluindo um grande número de hortaliças (Mendes et al., 1998). A maior incidência de mofo-branco no Brasil está nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, em regiões que apresentam condições climáticas favoráveis ao patógeno, ou seja, temperatura amena e alta umidade relativa do ar e do solo (ITO e PARISI, 2009).

O fungo *S. sclerotiorum* pode causar doenças em mais de 200 gêneros de plantas, abrangendo 408 espécies, compreendendo desde culturas de elevado potencial econômico a plantas daninhas. Hortaliças, feijão, girassol, soja, algodão, entre outros, são exemplos de plantas que podem ser afetadas pelo mofo-branco, além de plantas daninhas como picão, carrapicho, menstrasto, entre outras. As plantas daninhas atuam como hospedeiros que permitem a multiplicação do fungo, aumentando, assim, o potencial do seu inóculo no solo (ITO e PARISI, 2009).

A espécie *S. sclerotiorum* pode ser introduzida em uma determinada área por meio de sementes contaminadas com escleródios (estruturas de resistência do fungo). Implementos agrícolas podem transportar os escleródios; ascósporos, que são esporos do fungo que podem ser disseminados pelo vento e outros meios e, assim, alcançar uma determinada cultura e iniciar o desenvolvimento da doença (ITO e PARISI, 2009). O vento pode, também, transportar solo e restos culturais com escleródios e contaminar áreas vizinhas. Além disso, a água de irrigação ou de chuva pode transportar escleródios e introduzir o fungo em uma área não contaminada. Quando introduzido e estabelecido em uma determinada área, o patógeno é de difícil controle, devido a

características, como ser polífago e possuir estruturas de resistência que permanecem viáveis por muitos anos no solo (ITO e PARISI, 2009).

Sclerotinia sclerotiorum desenvolve-se bem na faixa de temperatura de 11 °C a 25 °C, podendo-se desenvolver numa ampla faixa, de 5 °C a 30 °C, sob alta umidade relativa do ar e do solo. Os escleródios podem germinar, formar estruturas de reprodução (apotécios) e lançar os ascósporos, que irão alcançar os tecidos das plantas e iniciar o processo infeccioso. Ao encontrar as pétalas das flores, os esporos do fungo irão encontrar nutrientes que favorecem a sua germinação e posteriormente irão colonizar outras partes da planta, já que, os ascósporos podem iniciar o processo infeccioso em outros tecidos além das pétalas. A espécie *S. sclerotiorum* pode também ser introduzida através de sementes, em forma de micélio dormente (ITO e PARISI, 2009).

A forma e o tamanho dos escleródios dependem do hospedeiro e da localização onde são formados, interna ou externamente à planta. Cada escleródio pode produzir um ou mais de vinte apotécios, cada um destes podem liberar mais de vinte mil ascósporos, durante o período de cinco a dez dias. Essas características demonstram o grande poder reprodutivo de *S. sclerotiorum*, e o perigo do aumento do potencial de inóculo, que pode infestar grandes áreas de produção agrícola. O tempo de sobrevivência dos escleródios pode variar de acordo com o pH, com a cultura que foi estabelecida anteriormente na mesma área, com as condições ambientais e a presença de micro organismos antagonistas (KRUGNER e BACCHI, 1995).

3.1.2. Características reprodutivas

A reprodução de *S. sclerotiorum*, como anteriormente mencionado, ocorre por meio dos escleródios que são agregados compactos de hifas somáticas formando massas, em geral, arredondadas (AMORIM, 1995) (Figura 1b). Estas estruturas estão presentes em diferentes gêneros de

fungos fitopatogênicos, sendo que muitos deles apresentam tamanho diminuto denominados de microescleródios. Os escleródios de *S. sclerotiorum* podem apresentar até 5 cm de diâmetro (AMORIM,1995). Ainda de acordo com AMORIM (1995), a longevidade dos escleródios no solo varia em função do patógeno e do ambiente ao qual ele está exposto sendo que, em geral, condições de elevada umidade reduz a longevidade dos escleródios de vários meses para algumas semanas. Em *S. sclerotiorum*, os escleródios podem sobreviver por no mínimo dois anos. Segundo KRUGNER e BACCHI (1995), o gênero *Sclerotinia* apresenta ciclo de reprodução por meio da germinação do tipo carpogênica dos escleródios, ou seja, com formação de corpos de frutificação. Ao germinar, os escleródios, formam apotécios pedicelados, típicos da ordem, que produzem ascos inoperculados, onde estão contidos os ascósporos (esporos sexuais), que são projetados e disseminados pelo vento, constituindo-se no inóculo primário da doença mofo-branco (Krugner e Bacchi, 1995) (Figura 2b). KOHN (1995) relata que a reprodução assexual de *S. sclerotiorum* ocorre por meio dos escleródios (Figura 2a) e a fase sexual ocorre através da auto-fertilização das hifas, sendo as hifas desta espécie homotáticas (auto-compatíveis). AMSELEM et al. (2011) mencionam que não existe a produção de esporos assexuais, os conídios, em *S. sclerotiorum*. Os escleródios de *S. sclerotiorum* podem germinar de maneira sucessiva, o que representa um aumento de sua capacidade de sobrevivência (AMORIM, 1995).

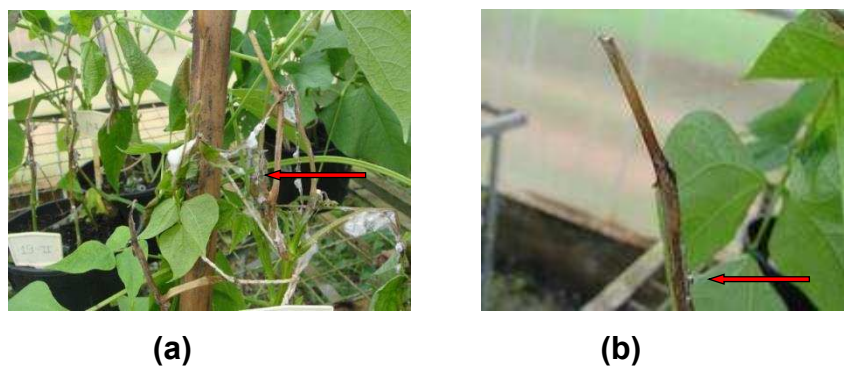


Figura 1. Mofa-branco em feijoeiros. Presença do micélio branco e “cotonoso” nas hastes e no caule (a) e escleródios (b).

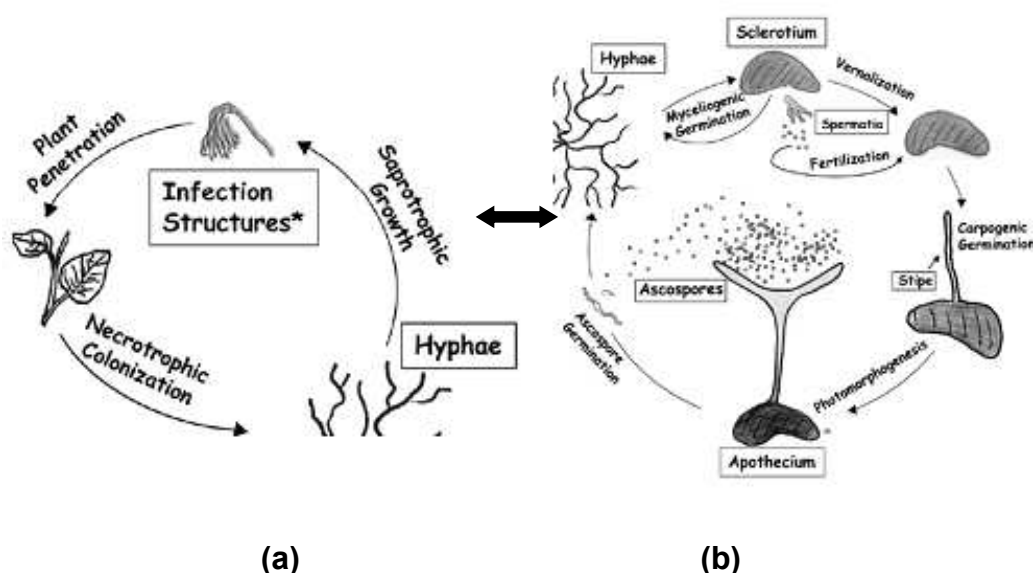


Figura 2. Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* com diferentes estágios de desenvolvimento assexual (a) e sexual (b) (AMSELEM et al., 2011)

3.2. Mofa-branco

Mofa-branco geralmente inicia-se em reboleiras na lavoura, principalmente nos locais com alta densidade de plantas e em plantios de cultivares de hábito de crescimento indeterminado. Geralmente, o sintoma inicial é a murcha da planta, resultante do apodrecimento do caule. Em seguida, são observadas manchas encharcadas nas folhas, hastes e

vagens, seguidas por crescimento de micélio branco e “cotonoso” (Figura 1a), o que originou a denominação “mofo-branco”. Com o progresso da doença, os escleródios passam a ser facilmente visíveis a olho nu, sendo formados dentro e sobre o tecido infectado (Figura 1b) (HALL e STEADMAN, 2005). Os tecidos doentes tornam-se secos, leves e quebradiços. As sementes infectadas são pequenas, sem brilho, descoloridas, enrugadas e mais leves, ou podem não apresentar qualquer alteração visível. Conforme STEADMAN (1975), o fungo pode ser isolado em menos de 0,5% de sementes assintomáticas e de cerca de 12% de sementes com algum sintoma da doença.

Os prejuízos diretos da doença decorrem da queda no rendimento das plantas. Entre as perdas indiretas incluem-se a condenação de áreas para a produção de sementes, o aumento do custo de produção e os custos ambientais decorrentes do controle químico (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006).

De acordo com PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM (2006) é muito importante que a entrada de *S. sclerotiorum* em áreas não contaminadas seja evitada pois, uma vez introduzido, será praticamente impossível erradicá-lo. Em áreas já afetadas pelo mofo-branco, estratégias de controle cultural como a rotação com gramíneas por pelo menos um ano, a diminuição da população de plantas, o plantio de cultivares precoces, o uso de regas menos frequentes, o plantio direto, a eliminação de plantas afetadas (*roguing*) e o controle de plantas daninhas hospedeiras (STEADMAN et al., 1976; WEISS et al., 1980; CANTERI et al., 1999; KOLKMAN e KELLY, 2002; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006) permitiriam reduzir o inóculo do patógeno a níveis aceitáveis e o convívio com a doença no campo (HALL e NASSER, 1996; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006).

Quanto ao controle químico do mofo-branco, estão disponíveis e registrados alguns fungicidas capazes de diminuir o progresso da doença (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006), porém, dependendo da densidade de inóculo podem apresentar resultados insatisfatórios (COSTA, 1997;

WANDER et al., 2005). Além disso, são insumos com custo médio elevado e inacessíveis para uma boa parcela dos agricultores.

Deve-se destacar que na maioria das regiões produtoras do país há condições climáticas adequadas à doença. Além disso, *S. sclerotiorum* é um patógeno cosmopolita, plenamente adaptado ao solo e capaz de infectar inúmeras espécies vegetais. Portanto, o controle desse patógeno só é possível por meio de manejo integrado de doenças (ZIMMERMANN et al., 1996; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006; RAMALHO e ABREU, 2006).

Em resumo, as formas de prevenção do mofo-branco são a utilização de sementes saudáveis, uso de micro organismos antagônicos no solo, práticas culturais como rotação de culturas, eliminação de resíduos culturais, manejo de água de irrigação e fungicidas específicos (OLIVEIRA, 2009). A resistência genética do hospedeiro é uma forma viável de evitar o desenvolvimento do patógeno, no entanto, devem ser consideradas a relação planta-patógeno e a existência de diversidade genotípica intrínseca na população do patógeno. No entanto, o desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes e/ou tolerantes a *S. sclerotiorum* é dificultado pela estrutura da população do patógeno e pela variabilidade na agressividade dos isolados (KULL et al., 2003).

3.3. Principais culturas com incidência do mofo-branco

O mofo-branco é tido como uma das doenças mais destrutivas do feijoeiro no mundo todo. Na região Centro-Sul do país, na safra de outono-inverno, a baixa evapo-transpiração e a alta umidade do solo propiciada pela irrigação são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Esta doença, entretanto, é geralmente pouco prejudicial nas épocas tradicionais de cultivo, ou seja, na safra das “águas” (outubro/novembro) e na safra da “seca” (fevereiro/março). A doença é mais prejudicial onde ocorrem crescimento vegetativo abundante da cultura, pouco arejamento e penetração da luz solar, drenagem inadequada do solo e rotação

inadequada de culturas (SCHWARTZ e STEADMAN, 1994; PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006). OLIVEIRA (2009) relata que o mofo-branco torna-se severo na cultura do feijão por causa da forma de irrigação, por pivô central. Devido às condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, elevada umidade, a lavoura do feijão pode sofrer, em média, perdas de 30% ou mais, podendo alcançar 100% em períodos chuvosos.

Entre as doenças que incidem sobre a soja, o mofo-branco tem se destacado como uma das mais graves. Não existem cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*, e o controle químico nessa cultura é inviável, em razão dos custos e das dificuldades em se obter uma cobertura total da planta durante a pulverização (GÖRGEN et al., 2009). A transmissão do fungo nessa cultura ocorre por meio das sementes. É possível durante o beneficiamento das sementes, utilizar o método do separador espiral seguido da mesa de gravidade para minimizar a contaminação das sementes (FURTADO e TRINDADE, 2005).

O mofo-branco constitui-se em um problema sério em plantios de hortaliças, principalmente de tomate, batata, brássicas e alface. Com relação ao tomate, torna-se um problema sério durante a fase de processamento. No caso da batata, os maiores problemas ocorrem quando esta é irrigada via pivô-central e nas épocas de umidade elevada. Nas hortaliças o controle químico é dificultado pelo fato dos sítios de infecção, próximos ao solo, ficarem encobertos pelo dossel da cultura. A ampla gama de hospedeiros de *S. sclerotiorum* restringe as opções de rotação de culturas em áreas que foram infestadas. As opções de culturas não hospedeiras ficam praticamente restritas às gramíneas, que podem não ser economicamente interessantes para os produtores (LOBO JÚNIOR, 1999). REIS et al. (2007) mencionam que não se conhecem variedades de hortaliças resistentes ao mofo-branco. Neste caso, a forma de controle desta doença está limitada ao uso de fungicidas em épocas adequadas, ou seja, de acordo com as condições climáticas que não propiciem ao desenvolvimento do fungo.

3.4. Elementos transponíveis

Os elementos transponíveis (ET) podem ser definidos como seqüências de DNA moderadamente repetitivas que podem mover-se de um local a outro do genoma e, desta maneira, ter um grande impacto na estrutura e função dos genes, bem como na organização dos cromossomos da espécie (ZANOTTI et al., 2005). O deslocamento dessas seqüências móveis de DNA pode afetar células e organismos, alterando a organização estrutural do genoma e codificando produtos gênicos que afetam vários com processos celulares (REGNER e LORETO, 2003).

Os ET foram descobertos no fim de 1940, por Bárbara McClintock quando ela identificou, pela primeira vez, no milho, elementos genéticos que mudavam de posição dentro do genoma dessa planta. Por afetarem o funcionamento dos genes onde se inseriam, receberam o nome de “elementos controladores” (REGNER e LORETO, 2003; DEPRÁ, 2005). Atualmente, sabe-se que estes elementos são amplamente distribuídos no genoma de bactérias, fungos, plantas e animais. Há uma grande variação de uma espécie para outra no número de cópias, distribuição e nos tipos de TE existentes (DEPRÁ, 2005). Estima-se que os elementos transponíveis fazem parte de mais de 50% do genoma do milho, 15% do genoma de *Drosophila*, cerca de 3,1% do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, 2% *Arabidopsis thaliana* e 45% do genoma de *Homo sapiens* (REGNER e LORETO, 2003; DEPRÁ, 2005).

De acordo com os autores REGNER e LORETO (2003) a inserção desses elementos móveis em um gene pode resultar em uma mutação que pode modificar a sua estrutura e expressão, anulando sua função. Por outro lado, se esse elemento for removido de forma correta do gene hospedeiro a mutação pode ser anulada e o fenótipo selvagem pode ser restabelecido. Estes autores mencionam que os processos de excisão e inserção podem gerar rearranjos estruturais como deleções, duplicações, inversões e fusões cromossômicas, além de ativar genes previamente inativos ou alterar seu padrão de expressão.

3.5. Transposons em eucariotos e importância nos fungos fitopatogênicos

O grau de complexidade do genoma dos eucariotos é refletido nos transposons, que por sua vez constituem um grupo muito mais amplo e heterogêneo do que os transposons procarióticos. Hoje se sabe que grande parte dos componentes de DNA eucariótico é constituída por inúmeras famílias de elementos de transposição (ALBERTS et al., 2006). Com relação aos fungos, a descoberta que os transposons são componentes comuns no genoma destes organismos, os tornaram alvos de estudo em função dos efeitos que exercem no genoma de seus hospedeiros (DABOUSSI, 1997; ZANOTTI et al., 2005;). Como mencionado anteriormente, os elementos transponíveis atuam como mutagênicos insercionais, e como os genes mutados podem ser clonados com facilidade, esses mutantes apresentam grande potencial para descobertas de genes que codificam determinantes de patogenicidade (MIGHELI et al., 2000; ZANOTTI et al., 2005;).

3.5.1. Generalidades sobre os transposons em fungos e no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum*

A classe I dos elementos transponíveis (ET), os retrotransposons, estão presentes com mais frequência no genoma de leveduras e foi descrita a décadas atrás (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011). A classe II dos transposons é encontrada em número limitado de espécies e foi identificada mais recentemente (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011). A maioria das espécies fúngicas das classes Basidiomycota e Ascomycota apresenta genoma pequeno e compacto (aproximadamente 10 e 20 Mb) com baixa frequência de ET (aproximadamente 5%). Alguns fungos filamentosos apresentam alta proporção de ETs, aproximadamente 21%, e tamanho do genoma maior, 65 Mb (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011).

Em relação à diversidade de ETs em leveduras, apesar dos retrotransposon predominarem, o genoma deste organismo têm também diversos outros elementos da subclasse II como os da família LINE (long interspersed nuclear element) (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011). Os primeiros ETs identificados em leveduras pertencem à classe I, Ty, elementos com LTR (longas repetições terminais). O retrotransposon Ty-1, têm sido extensivamente estudado em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* desde 1980 (BLEYKASTEN-GROSSHANS E NEUVÉGLISE, 2011).

Com relação à organização do genoma de *Sclerotinia sclerotiorum*, o tamanho do genoma é de aproximadamente 38 Mb, 7% do genoma apresenta elementos transponíveis e a frequência de transposons com LTR é em torno 2 a 2,5% (AMSELEM et al., 2011).

BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE (2011) relataram que o conhecimento sobre o impacto dos elementos transponíveis sobre o genoma dos fungos é importante para estudos como a estabilidade do genoma do hospedeiro, mudanças epigenéticas, mobilidade, eficiência transcricional e modificações na expressão e regulação gênica.

3.6. Classificação geral dos elementos transponíveis

De modo geral, os transposons presentes em procariontos e eucariotos podem ser divididos em duas classes de acordo com a presença ou ausência de um RNA intermediário no processo de transposição (WICKER et al., 2007). REGNER e LORETO (2003) mencionam que a classe I é representada pelos elementos que se movem via RNA e, para tanto codificam uma transcriptase reversa. Nesta classe, estão incluídos os retrotransposons com LTRs, longas repetições terminais, com tamanho de aproximadamente 500 pb, localizadas nas extremidades do elemento transponível. A Figura 3 ilustra a classificação geral dos retrotransposons. Conforme REGNER e LORETO (2003) os retrotransposons são subdivididos em duas subclasses, a primeira

subclasse é dividida em dois grupos: *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy* de acordo com os domínios protéicos que codificam proteínas necessárias à transposição, como por exemplo, as enzimas integrase (IN), protease (PR), transcriptase reversa (TR) e ribonuclease (RN). A Figura 4 ilustra o esquema do ciclo de transposição dos retrotransposons LTR. A outra subclasse de retrotransposons correspondem aos grupos LINEs (long interspersed nuclear element) e SINEs (short interspersed nuclear element) que não possuem LTR. Nessa subclasse o critério de divisão é a presença ou a ausência da enzima transcriptase reversa (WICKER et al., 2007).

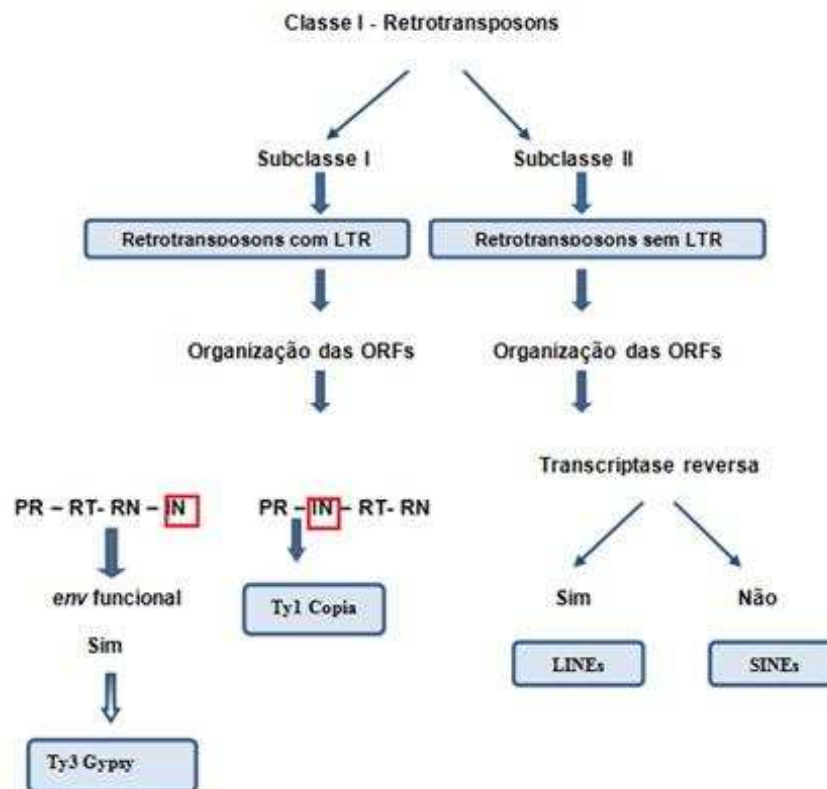


Figura 3. Classificação geral dos elementos transponíveis da classe I: PR = gene da protease, RT = transcriptase reversa, RN = gene da ribonuclease, IN = gene da integrase, *env* = gene do envoltório, LTRs = sequências terminais longas (REGNER e LORETO, 2003).

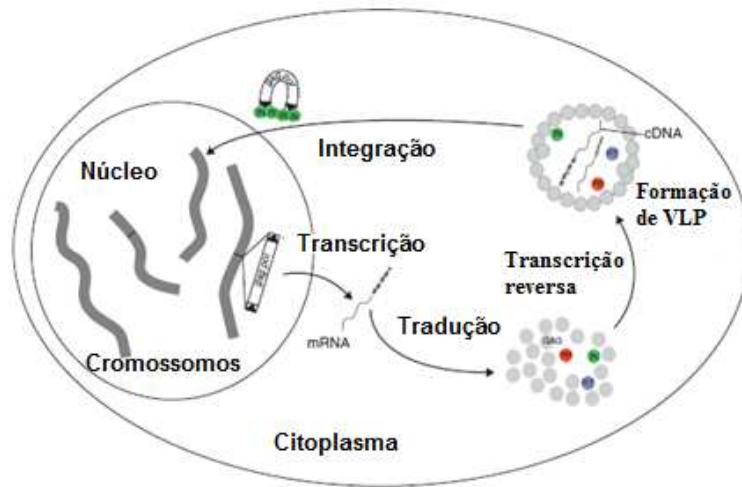


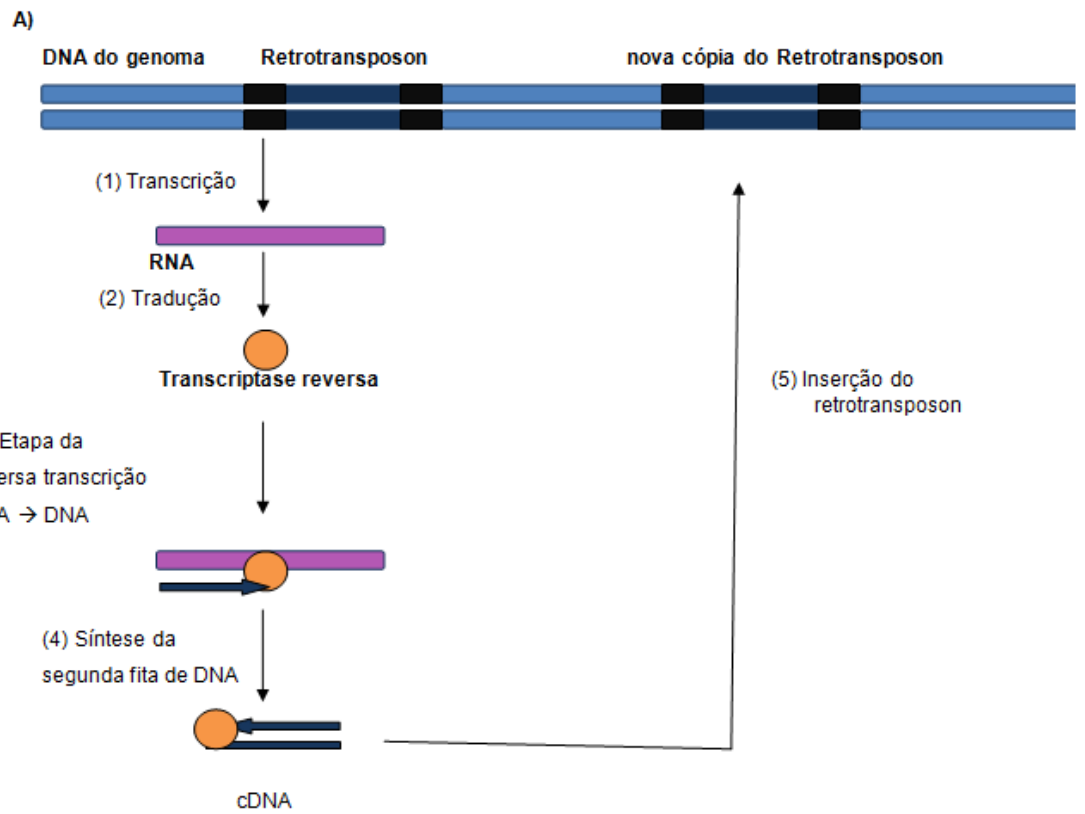
Figura 4. Ciclo de transposição: LTR retrotransposons. IN, integrase; PR, protease; RT, reverse transcriptase; VLP, partículas semelhantes aos encontrados em vírus (HAVECKER et al., 2004)

Segundo WICKER et al. (2007), os elementos transponíveis da classe I (retrotransposons) transpõem via um RNA intermediário, que é transcrito e utilizado como molde para síntese de cDNA via transcriptase reversa codificada pelo próprio elemento (Figura 5a). Cada ciclo completo de transposição produz uma nova cópia. Conseqüentemente, retrotransposons são mais frequentes e são responsáveis por uma fração considerável de DNA repetitiva no genoma. Os transposons da classe II se movem via DNA e todos os elementos da classe II contêm repetições terminais invertidas (ITR) de 10 a 500 pb (Figura 5b). Estes elementos movem-se pela excisão do sítio doador e reinserem-se em outra posição do genoma por ação da enzima transposase. Este mecanismo pode reverter mutações causadas pela sua inserção. Esta classe apresenta os elementos autônomo e não-autônomo (defectivo). Os elementos autônomos têm capacidade de transpor por codificarem transposase enquanto que a transposição dos defectivos, que não codificam transposase, está condicionada a integridade de suas repetições terminais e à presença simultânea, no genoma, dos elementos

autônomos (REGNER e LORETO, 2003). Os elementos transponíveis da classe II são classificados em duas subclasses: (1) subclasse I que possui assinatura dos resíduos de DDE que correspondem aos aminoácidos aspártico e ácido glutâmico no centro catalítico da enzima transposase, em posição conservada, e têm como representantes a superfamílias *mariner-Tc1* e *ISa*; (2) subclasse II com elementos que não possuem a assinatura com os aminoácidos DDE e várias superfamílias como, por exemplo, *ISb* de bactérias, *Hat* de *Drosophila* e *Ac-Ds* do milho são reconhecidas (Regner e Loreto, 2003; Deprá, 2005). Além disso, os elementos da classe II são encontrados tanto em procariotos quanto em eucariotos, sendo os retrotransposons LTR mais predominantes em eucariotos (DEPRÁ, 2005).

3.6.1. Mecanismos de transposição dos transposons da classe II

Nos elementos da classe II, ou transposons propriamente ditos, seus mecanismos de transposição consistem em três etapas: (1) realização de clivagens nas extremidades do transposon e no sítio-alvo de inserção (DNA-alvo); (2) ligação das extremidades do transposon às fitas simples do DNA-alvo e (3) preenchimento das lacunas formadas (Figura 5b) (ALBERTS et al., 2006). Existem ainda dois mecanismos para explicar o processo de transposição via DNA: (1) transposição conservativa onde o transposon é removido de um dado local e inserido em outro, conservando o elemento individual. Nesse caso, não ocorre o aumento do número de cópias desse transposon e o destino do sítio doador depende do organismo e do tamanho da molécula; (2) transposição replicativa, mecanismo pelo qual um transposon é duplicado antes de ser transportado para um novo local, sendo que uma cópia do elemento permanece no local e a outra é inserida em um novo sítio (ALBERTS et al., 2006).



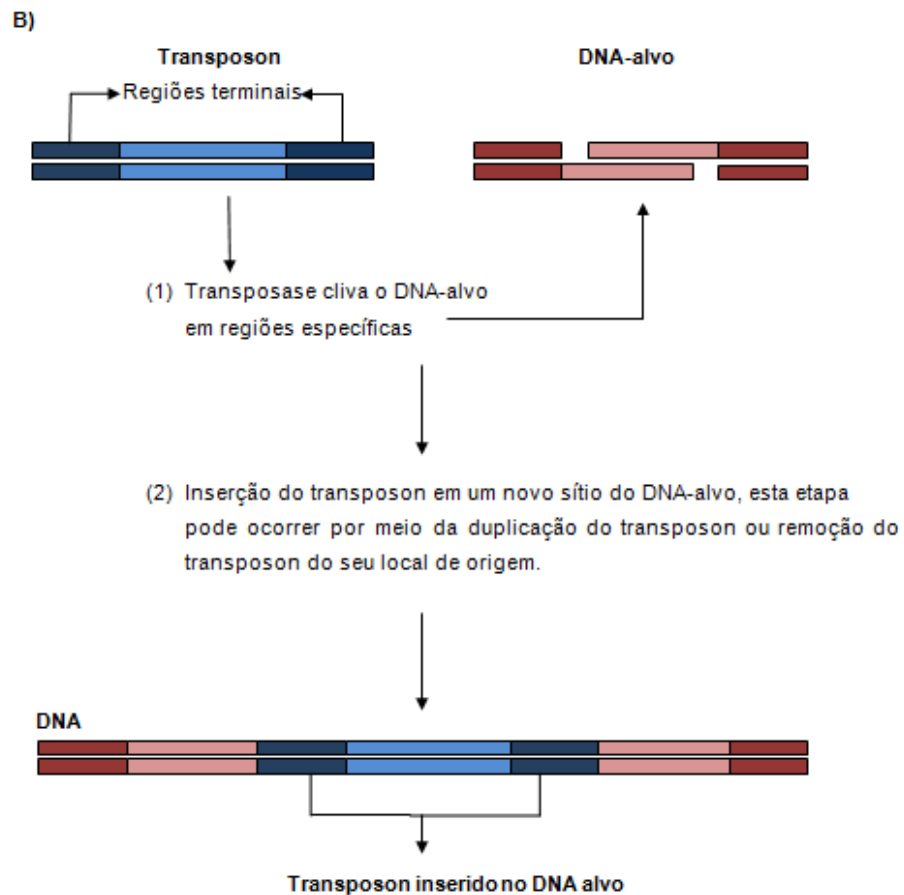


Figura 5. Esquema representando os mecanismos de transposição dos transposons no DNA: A) elementos transponíveis da classe I, os retrotransposons e B) elementos transponíveis da classe II, os transposons.

3.7. Regulação

O controle da transposição de retrotransposons no genoma é importante, pois a multiplicação destes elementos de forma contínua pode resultar na morte celular (FONSECA, 2007). São conhecidos alguns mecanismos que impedem a mobilização indiscriminada dos elementos transponíveis. Para isso, os organismos desenvolveram estratégias como metilação de DNA, RNA de interferência (RNAi) e RIP (mutação de ponto

induzida por repetição) que, na maioria das vezes, permite a presença do elemento repetitivo, porém, de forma inativa (SELKER et al., 1987).

No mecanismo de controle da transposição por metilação resíduos de citosina com certas combinações de nucleotídeos são metilados. No fungo *Neurospora crassa*, a metilação de citosina catalisada pela metil transferase é, frequentemente, associada a mutações do tipo RIP (GALAGAN e SELKER, 2004). Segundo FONSECA (2007), o mecanismo de metilação não é, necessariamente, utilizado por todos os eucariotos e que a preferência por sítios de inserção pode, também, exercer controle da atividade do transposon. Alguns grupos de retrotransposons possuem locais de preferência para sua inserção como centrômeros, telômeros e heterocromatina que são regiões sem ou com pouca atividade gênica (FONSECA, 2007). A modificação de sequências dos elementos, como perda de sequências LTR, é um outro fator que pode impedir a inserção do elemento, tornando-o inativo (FONSECA, 2007).

RIP, por sua vez, é um mecanismo de silenciamento resultante da mutação de sequências de DNA repetidas durante o ciclo sexual, entre a fertilização e a fusão nuclear e que este mecanismo previne o acúmulo de elementos transponíveis em fungos (GALAGAN e SELKER, 2004). Segundo estes mesmos autores, RIP induz mutações de GC para AT em sequências duplicadas de DNA que possuam mais de 400 pares de bases e com identidade maior que 80%.

3.8. Aspectos evolutivos dos transposons

Elementos transponíveis, vírus e retrovírus compartilham um ancestral comum. As evidências nesse sentido provêm das similaridades estruturais e funcionais entre retrovírus e retrotransposons. Alguns pontos de similaridades são os genes *gag*, *transcriptase reversa* e *RNAse H* presentes em retrotransposons sem LTR e retrotransposons com LTRs. Existem algumas hipóteses com base na posição dos elementos de transposição ao longo desse trajeto evolutivo para explicar se seriam

precursores das formas virais ou derivados delas. A principal diferença entre retrotransposons e retrovírus é a ocorrência das formas infectivas extracelulares nesses últimos. Existem duas hipóteses para explicar a origem dos transposons: a primeira é que esses elementos teriam dado origem aos vírus ao incorporarem sequências genômicas necessárias à constituição de formas extracelulares infectivas; a segunda é que os transposons seriam oriundos de formas virais degeneradas que, talvez por acúmulo de mutações, tenham perdido sua capacidade infectiva (ALBERTS et al., 2006; REGNER e LORETO, 2003)

Conforme CRAIG (2002) os elementos transponíveis possuem mecanismos de transposição que se baseia em uma reação de recombinação que intermedeia o movimento desses segmentos de DNA entre sítios não homólogos. O mesmo autor menciona que uma vez sendo elementos móveis, eles têm a capacidade de mudar informações genéticas do hospedeiro, alterando a estrutura dos cromossomos ou a organização dos genes. Diante dessas considerações é importante mencionar o exemplo da família do elemento *P* de *Drosophila* que está presente na subclasse II que pertence à classe II dos elementos transponíveis. Este elemento foi primeiramente identificado em *D. melanogaster*, por sua capacidade de provocar um fenômeno chamado de disgenesia do híbrido, que ocorre em algumas espécies do gênero *Drosophila*, quando cruzadas, sendo a progênie gerada portadora de uma série de defeitos genéticos como mutações, aberrações cromossômicas, segregação distorcida na meiose, recombinação no macho e esterilidade. Esse fenômeno representa a incapacidade de algumas linhagens de deter a mobilização indiscriminada de elementos transponíveis, o que provoca danos genéticos e a morte celular. Além do elemento *P*, outros sistemas responsáveis por disgenesia do híbrido em *Drosophila* envolvem os elementos *J*, *habo* e *Ulysses* da mesma subclasse II (REGNER e LORETO, 2003; RUBIN et al., 1982).

A distribuição dos elementos transponíveis é geralmente heterogênea por existir espécies distantes que contêm o mesmo elemento

e espécies mais próximas que não o possui. Além disso, elementos encontrados em espécies que pertencem a diferentes gêneros, famílias, ordens e até mesmo classes, podem ser, algumas vezes muito similares. Essas características filogenéticas são frequentemente devidas à transferência horizontal, hibridação entre espécies e polimorfismo ancestral (DEPRÁ, 2005).

Independente da sua origem, os transposons exercem influência nos organismos que os carregam, que além das mutações, podem criar regiões de homologia que facilitam rearranjos genéticos adicionais. Por estarem dispersos no genoma e em cópias múltiplas, esses elementos genéticos podem ser utilizados como substrato para o sistema de recombinação homóloga do genoma do hospedeiro. Eles podem funcionar como segmentos portáteis de homologia, permitindo o pareamento entre as mais diversas regiões genômicas e, então, por meio dos eventos de *crossing-over*, servir como sítios para inversões, deleções ou fusões cromossômicas (REGNER e LORETO, 2003).

De acordo com a linha “selecionista”, os transposons são fontes inesgotáveis de variabilidade genética e essas variantes genéticas representariam alternativas adaptativas para as populações e espécies sobre as quais a seleção natural irá atuar. Os elementos transponíveis seriam, então, agentes de reorganização genômica (REGNER e LORETO, 2003).

3.9. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são definidos por BRAMMER (2000) como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, são elementos herdados geneticamente e muito utilizados para a detecção de polimorfismos genéticos diretamente no DNA que podem ser utilizados, por exemplo, para diferenciar dois ou mais indivíduos. Com os avanços da genética e biologia molecular, a tecnologia do DNA recombinante, a reação em cadeia de polimerase

(PCR) e o sequenciamento automático do DNA consistem, hoje, em ferramentas que permitem o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação, por exemplo, dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007).

Os primeiros marcadores moleculares desenvolvidos foram RFLPs, RAPD, AFLPs, SNP e SSR. No RFLP (Polimorfismos no Comprimento dos Fragmentos de Restrição), sequências de DNA são clivadas com enzimas de restrição, para assim, gerar as diferenças do comprimento de fragmentos de DNA. O marcador molecular RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) desenvolvido com base na técnica de PCR, resulta em grande quantidade de polimorfismo de fragmento de DNA, utilizando primers randômicos, nas reações de amplificação do DNA (WILLIAMS et al., 1990). Os marcadores microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) são os mais polimórficos e consistem em pequenas sequências com 1 (um) a 5 (cinco) pares de bases que se repetem. Os AFLPs (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) se baseiam na técnica de clivagem do DNA genômico utilizando enzimas de restrição, seguida do emprego de adaptadores específicos, que são ligados a terminais dos fragmentos de DNA que foram clivados. Após esses procedimentos são realizadas amplificações por meio de PCR, e os fragmentos amplificados são separados em gel por eletroforese (Brammer, 2000). O marcador SNP (Polimorfismo de Base Única) se baseia em alterações nas moléculas de DNA, por mutações em apenas uma das bases nitrogenadas que são a forma mais frequente de variação genética. Mapeamento genético e genotipagem são exemplos de aplicações destes marcadores moleculares (SEIXAS, 2011).

Atualmente, marcadores baseados nas sequências dos retrotransposons têm sido utilizados com sucesso em estudos de diversidade genética, filogenéticos e mapeamento genético. Vários desses elementos têm sido sequenciados e alto grau de polimorfismo intra e interespecífico tem sido observado (FALEIRO, 2007).

3.9.1. Técnicas IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) e REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)

A presença ou ausência de um transposon em um dado loco pode ser utilizado como uma marca molecular do genótipo, que pode ser útil para obtenção de mapa de ligação e em investigação de diversidade e filogenia. A estrutura do retrotransposon a qual apresenta longas seqüências conservadas em segmentos do DNA pode permitir novas inserções e replicação desses elementos no genoma aumentando o polimorfismo. Essas novas inserções podem ser detectadas por meio de técnica de PCR e aplicadas nos estudos filogenéticos (GRZEBELUS, 2006).

Retrotransposons são marcadores altamente polimórficos o que viabiliza sua utilização em estudos de diversidade genética (FONSECA, 2007). Recentemente, técnicas para o desenvolvimento de marcadores com base nesses elementos vem sendo implementadas. Uma dessas técnicas é o SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism), uma variação do AFLP, com a diferença de nesta serem utilizados iniciadores específicos para seqüência LTR, permitindo a análise de polimorfismo e o mapeamento genético (FONSECA, 2007). Técnicas como IRAP e REMAP surgiram como metodologias diferentes das técnicas anteriormente utilizadas, pois ao invés de utilizar enzima de restrição, utilizam iniciadores que amplificam regiões entre retrotransposons (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) denominada de IRAP e entre retrotransposons e microsatélites (SSR-Single Sequence Repeat) chamada de REMAP, gerando um alto padrão polimórfico de fragmentos de DNA (KALENDAR et al., 1999). De acordo com PASQUALI et al. (2007) a técnica molecular IRAP apresenta algumas vantagens como a utilização de primers específicos que reduz o potencial de risco de contaminação por produtos inespecíficos, que pode ocorrer com o uso de primers escolhidos de forma randômica.

Para as técnicas IRAP e REMAP são desenhados oligonucleotídeos para regiões conhecidas e conservadas dos retrotransposons, como as LTRs (KALENDAR et al., 1999). Na técnica IRAP, os dois oligonucleotídeos iniciadores irão anelar nas regiões conservadas do retrotransposon (LTRs) e na REMAP um dos iniciadores anela em uma LTR e o outro em sequência microssatélite (SSR) o que permite a detecção de inserções de transposons próximo de SSRs (Figura 6). Segundo PASQUALI et al. (2007) a desvantagem do uso de IRAP-PCR é a necessidade de conhecer a sequência LTR no genoma em estudo. Essas duas técnicas permitem o estudo de diversidade genética, estudos filogenéticos e rastreamento de espécies. Permitem ainda, a amplificação de sequências específicas que podem ser utilizados para diagnóstico molecular através da técnica de IR-SCAR (Inter-retrotransposon sequence-characterized amplified regions) (KALENDAR et al., 1999; PASQUALI et al., 2007).

3.10. Importância dos transposons como marcadores moleculares para fungos fitopatogênicos

A caracterização dos elementos transponíveis em fitopatógenos possibilita um maior conhecimento sobre a organização e a evolução do genoma desses fungos. O estudo desses elementos genéticos móveis constitui novas ferramentas biotecnológicas, como por exemplo, em pesquisas de sistemas de inativação gênica e em pesquisas onde são utilizados como marcadores moleculares visando traçar o perfil populacional de espécies fitopatogênicas (SANTANA, 2009). Assim, o estudo dos transposons como marcadores moleculares podem ser utilizados como uma estratégia para identificar novas raças de fitopatógenos e para compreender os mecanismos epidemiológicos com relação ao desenvolvimento desses fungos nas espécies vegetais hospedeiras.

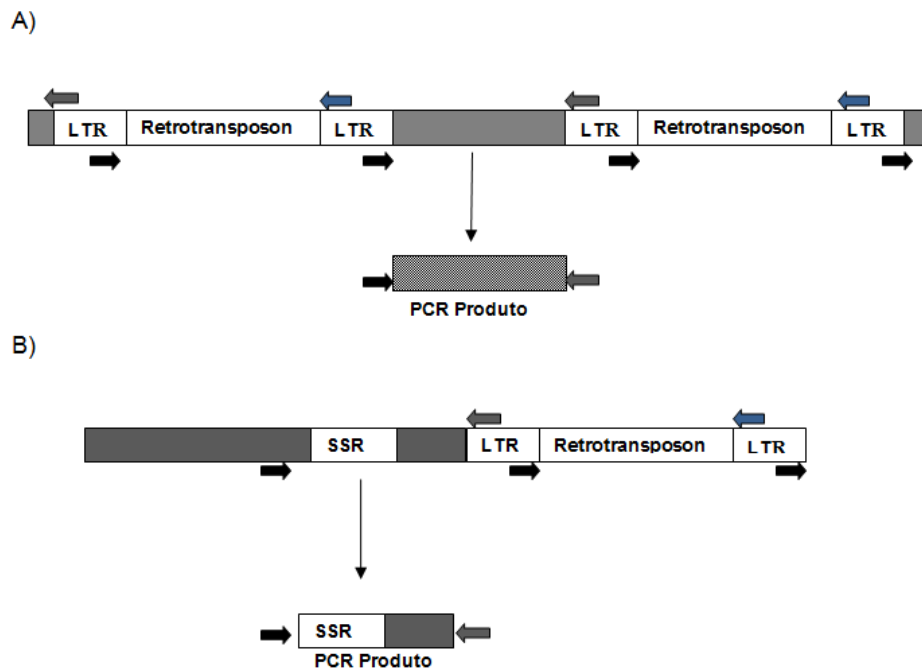


Figura 6. Esquema representando o anelamento dos primers e o resultado da amplificação para: A) IRAP-Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism retrotransposons e B) REMAP- Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism.

Considerando que as técnicas IRAP e REMAP são apropriadas para avaliar variabilidade genética de fungos, incluindo os fitopatogênicos, poderão ser úteis, também, para identificar elementos transponíveis em isolados de *S. sclerotiorum*, objeto de estudo deste trabalho, representando, assim, uma ferramenta para caracterização do perfil populacional dessa espécie.

Considerando o exposto, o presente estudo, propõe caracterizar elementos transponíveis da classe I, os retrotransposons, em isolados de *S. sclerotiorum* por meio da análise do seu genoma e avaliar a diversidade genética entre os isolados utilizando a técnica de amplificação inter-retrotransposon (IRAP).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWS, j.; RAFF, M.; ROBERTS,K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo: 4º Edição, Artmed Ed, 2006, p. 286-289.
- AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed). **Manual de Fitopatologia: princípios de conceitos**. São Paulo: ed Agronômica, 1995, p. 247-255.
- AMSELEM, J.; CUOMO, J.; VAN KAN, J.A.L.; VIAUD, M.; BENITO, E. P.; COULOX, A.; COUTINHO, P.M.; VRIES, R.P.; DYER, P. S.; FILLINGER, S.; FOUNIER, E. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Plos Genetics** 7: 1-27.
- BLEYKASTEN-GROSSHANS,C.;NEUVÉGLISE,C.2011.Transposable elements in yeasts. **Comptes Rendus Biologies** 334: 679–686.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. 1994. Index of plants hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology** 6:93-108.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso nos programas de melhoramento vegetal**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. 4p. (Embrapa Trigo, Documento n 3).
- CAMARGO, L. E. A. Análise genética de resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed). **Manual de Fitopatologia: princípios de conceitos**. São Paulo: ed Agronômica, 1995, p. 470-472.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed). **Manual de Fitopatologia: princípios de conceitos**. São Paulo: ed Agronômica, 1995, p. 76-77.
- CANTERI, M. G.; SILVA, O. C.; DALLA PRIA, M.; COSTA, J. L. S.; SOUZA, E. D. T.; BERNI, R. F. Principais medidas de controle. In: CANTERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 1999, p.139-159.

- CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, E. 1999. Ocorrência de nova doença do algodoeiro, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 6:1101-1106.
- COSTA, J. L. S. Soil inoculum density limiting the effectiveness of chemicals on the control of white mold on dry beans. In: **An integrated approach to combating resistance**, Harpenden/Herts, Proceedings... Harpenden/Herts, 1997, p. 78-80.
- CRAIG, N. Mobile DNA: an introduction. In: CRAIG, N.; CRAIGIE, R.; GELLERT, M.; LAMBOWITZ, A.M. (ed). **Mobile DNA II**. Asm Press, Washington, D.C, 2002, p 3-11.
- DABOUSSI, M. J. Fungal transposable elements and genome evolution. 1997. **Genetica** 100: 253-260.
- DEPRÁ, M. **Estudo da mobilização de transposons através de transformação genética**. 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores-genético moleculares aplicados a programas de conservação e uso dos recursos genéticos**. Planaltina DF, Embrapa Cerrados: editora Embrapa, 2007, p.38-40.
- FONSECA, F. C de A. **História evolutiva de um retrotransposon-LTR nos dois genomas componentes do amendoim**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.
- FURTADO, E. L.; TRINDADE, D. R. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M .; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A (ed). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: ed Agronômica, 2005, p. 589.
- GORGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. 2009. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44(12):1583-1590.
- GRZEBELEUS, D. Transposon insertion polymorphism as new source of molecular markers. 2006. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research** 14: 21-29.

- HALL, R.; STEADMAN, J.R. White mold. In: SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R.; FOSTER, R.L. (Eds.) **Compendium of Bean Diseases**, 2nd ed. 2005, p. 44-46.
- HALL, R.; NASSER, L. C. B. 1996. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology** 18:176-185.
- HAVECKER, E.R.; GAO, X.; VOYTAS, D.F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome Biology** 5: 225.
- IGNACCHITI, M.D.C.; SANTANA, M.F.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. The distribution of a transposase sequence in *Moniliophthora perniciosa* confirms of occurrence of two genotypes in Bahia, Brazil. 2011. **Tropical Plant Pathology** 36:276-286.
- ITO, F.M.; PARISI, J. J. D. **Mofu-Branco: doença que exige muita atenção, principalmente no período de outono-inverno**. Campinas, SP: Centro de pesquisa e desenvolvimento em Fitossanidade-Instituto Agronômico de pesquisa-IAC, 2009. 4p. (Comunicado Técnico, n 11).
- KALENDAR, R.; GORB, T.; REGINA, M.; SUONIEME, A.; SCHULMAN, A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. 1999. **Theoretical and Applied** 98: 704–711.
- KOHN, L.M. 1995. The clonal dynamic in wild and agricultural plantpathogen populations. **Canadian Journal Botany** 73: 1231–1240.
- KOLKMAN, J.M.; KELLY, J.D. 2002. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science** 42: 693-699.
- KRUGNER, T.L.; BACCHI, M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed). **Manual de Fitopatologia: princípios de conceitos**. São Paulo: ed Agronômica, 1995, p. 76-77.
- KULL, L.S.; VUONG, T.D.; HARTMAN, G.L.; POWERS, K.S.; ESKRIDGE, K.M.; STEADMAN, J.R. 2003. Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease** 87:1471-1476.
- LOBO JÚNIOR, M. **Epidemiologia da podridão de esclerotínia em tomateiro para processamento industrial**. 1999. 117 f. Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília (UnB), Brasília-DF.

- MIGHELI, Q.; STEINBERG, C.; DAVIERE, J.M.; OLIVAIN, C.; GERLINGER, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C.; DABOUSSI, M.J. 2000. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology** 90:1279-1284.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. F.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília DF: Embrapa Cenargen, 1998. 569 p.
- MURATA, H.; BABASAKI, K.; SAEGUSA, T.; TAKEMOTO, K.; YAMADA, A.; OHTA, A. 2008. Traceability of Asian matsutake, specialty mushrooms produced by the ectomycorrhizal basidiomycetes *Tricholoma matsutake*, on the basis of retroelement-based DNA markers. **Applied and Environmental Microbiology** 74: 2023-2031.
- OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. 2009. **Revista de Agrotecnologia** 2(4):1-4.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique.. **Phytopathology** 97: 987-996.
- PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão**. 2ed. atual. Viçosa: Editora UFV, 2006, p.359-414.
- PURDY, L. H .1979. *Sclerotinia sclerotiotum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology** 69:875-880.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão**. 2ed. atual. Viçosa: Editora UFV, 2006, p.415-436.
- REGNER, L. P.; LORETO, E. L. S. Transposons. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (Org). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: 3º Edição, Mercado Aberto Ed, 2003, p.203-226.
- REIS, A.; COSTA, H.; LOPES, C. A. **Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, DF, 2007. 5 p. (Comunicado Técnico, n 45).

- RUBIN, G. M.; KIDWELL, M.G.; BINGHAM, P. M. 1982. The molecular basis of *Drosophila melangaster* hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations. **Cell** 29: 987-994.
- SANTANA, M. F. **Retrotransposons LTR no genoma *Moniliophthora perniciosa* e *Cochliobolus heterostropus***. 2009. 72p. (Dissertação em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- SANTANA, M. F.; ARAÚJO, E. F.; SOUZA, J.T.; MIZUBUTI, E. S. G.; QUEIROZ, M.V. 2012. Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Moniliophthora perniciosa*. **Euro Journal Plant Pathology** 10: 1007-1060.
- SANTOS, L. V.; QUEIROZ, M. V.; SANTANA, M. F.; SOARES, M. C.; BARROS, E.G.; ARAÚJO, E.F.; LANGIN, T. 2011. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. **Journal Biotechnology Microbiology** doi 10.1007/s11274-011-0909-x.
- SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Moho Blanco. In: PASTOR-CORRALES, M. A.; SCHWARTZ, H. F. (Eds.) **Problemas de producción del frijol en los trópicos**. 2ed. Cali, Colômbia: CIAT, 1994, p.245-267.
- SEIXAS, F. **Marcadores Moleculares**. Pelotas,RS: Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2011. 19p. (Documento n 44).
- SELKER, E. U. ; CAMBARERI, E. B.; JENSEN, B. C.; HAACK, K. R.1987. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell**, 51: 741-752.
- STEADMAN, J. R. 1975. Nature and epidemiological significance of infection of bean seed by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology** 65:1323-1324.
- STEADMAN, J. R.; BLAD, B. L.; SCHWARTZ, H. F.1976. Feasibility of microclimate modification for control of white mold disease of bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative** 19:78-80.
- WANDER, A. E.; DEL PELOSO, M. J.; ALMEIDA, V. M. **Sistema de cultivo e custo de produção de feijoeiro comum em primavera do leste (MT), na Safra 2004/2005**. Santo Antônio de Goiás,GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 4p. (Comunicado Técnico 101).

- WEISS, A.; HIPPS, L. E.; BLAD, B. L.; STEADMAN, J. R. 1980. Comparison of within-canopy microclimate and white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) development in dry edible beans as influenced by canopy structure and irrigation. **Agricultural Meteorology** 22:11-21.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.
- WICKER, T.; SABOT, F.; HUAN-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MOGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A.K. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable. **Nature Reviews** 8: 973-982.
- ZANOTTI, M. G. S.; SANTOS, J. K.; REIS, K. C. P.; ARAÚJO, E. F.; DHINGRA, O. D.; QUEIROZ, M. V. 2005. Distribuição do elemento transponível *impala* em isolados de *Fusarium oxysporum* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 30: 244-249.
- ZIMMERMANN, M. J. O.; CARNEIRO, J. E. S.; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C.; RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; PEREIRA, P. A. A. Melhoramento genético e cultivares. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, Potafós, 1996, p.223-273.

CAPÍTULO I

Copia-LTR_SS e Gypsy-LTR_SS: RETROTRANSPOSONS NO GENOMA DE *Sclerotinia sclerotiorum* AGENTE CAUSAL DO MOFO- BRANCO

RESUMO

Foram identificados no banco genômico de *Sclerotinia sclerotiorum* dois retrotransposons denominados de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*. Esses elementos foram caracterizados como pertencentes às superfamílias *Copia* e *Gypsy*, respectivamente. As sequências de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* possuem 5.344 pb e 6.469 pb, respectivamente. O elemento *Copia-LTR_SS* apresenta longas repetições terminais (LTRs) diretas conservadas de 269 pb e uma ORF (sequência de leitura aberta) que codifica as proteínas *gag* e as proteínas da região *pol*, integrase, transcriptase reversa e RNase H. O elemento retrotransponível *Gypsy-LTR_SS* apresenta longas repetições terminais (LTRs) diretas conservadas de 435 pb e domínios conservados para a proteína *gag*. A região *pol* codifica apenas as enzimas transcriptase reversa e RNase H. Os dois elementos, apresentam as regiões PPT (Polypurine Tract) e PBS (Primer Binding Site). Um grande número de LTRs-Solo e elementos TRIMs (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*) foram identificados sugerindo grandes eventos de recombinação no genoma de *S. sclerotiorum*. A comparação das sequências das LTRs de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* sugere a presença do mecanismo de silenciamento RIP (Repeat-Induced Point Mutation) que pode ter implicações diretas no processo evolutivo dessa espécie.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é uma espécie altamente polífaga, por causar doenças em mais de 200 gêneros de plantas. Este patógeno causa o mofo-branco no feijoeiro que tem como principais características, a murcha da planta resultante do apodrecimento do caule bem como a presença do micélio branco nas folhas, nas hastes e nas vagens, sendo por isso a denominação mofo-branco. Esta é uma das doenças do feijoeiro mais prejudiciais no mundo (HALL e STEADMAN, 2005; Paula JÚNIOR e ZAMBOLIM, 2006)

Os elementos transponíveis (ETs) são sequências de DNA que apresentam a capacidade de mover-se de um local a outro dentro do genoma podendo gerar mutações no cromossomo. Desta forma, o conhecimento dos ETs é essencial para o entendimento da evolução dos genomas (KIDWELL, 2005).

Os transposons são classificados em duas classes de acordo com os mecanismos de transposição. Na classe I, estão presentes os elementos transponíveis que geralmente são referidos como retroelementos e na classe II, estão os “DNAs transposons” propriamente ditos (KIDWELL, 2005). Os transposons da classe II, são classificados de acordo com a forma de transposição e presença de uma assinatura DDE na enzima transposase (KIDWELL, 2005; REGNER e LORETO, 2003). Todos os elementos transponíveis da classe I transpõem via um RNA intermediário, que é transcrito de uma cópia do genoma e um cDNA é obtido via uma transcrição reversa por uma transcriptase reversa codificada pelo próprio elemento (WICKER et al., 2007). De acordo com WICKER et al. (2007) cada ciclo completo de transposição produz uma nova cópia e, conseqüentemente, retrotransposons são, frequentemente, os principais colaboradores para uma fração repetitiva do genoma. Os retrotransposons podem ser divididos em cinco ordens com base no mecanismo de transposição, organização e filogenia da transcriptase

reversa: retrotransposon LTR (long terminal repeat), DIRS-like (*Dictyostelium* intermediate repeat sequence), Penélope-like, LINEs (long interspersed nuclear element) e SINEs (short interspersed nuclear element) (WICKER et al., 2007).

Os retrotransposons LTR são predominantes em eucariotos e apresentam sequências repetidas diretas (LTRs) que flanqueiam uma região codificadora. Esses retrotransposons possuem tamanho variável, podendo chegar a 25 kb. Estes, tipicamente contêm ORFs denominadas *gag* e *pol*. A região *gag* codifica proteínas estruturais que formam uma partícula semelhante a dos vírus (proteínas do capsídeo) (Havecker et al., 2004.) e a região *pol* codifica as enzimas protease, transcriptase reversa, RNase e integrase (HAVECKER et al., 2004). As duas principais superfamílias destes retrotransposons são *Gypsy* e *Copia* que diferem na ordem das regiões que codificam a transcriptase reversa e a integrase na região *pol* (NEUMANN et al., 2003).

O primeiro estudo de ETs em fungos foi em *Saccharomyces cerevisiae* e a mobilidade do grupo *Ty* no genoma deste fungo resultou na presença de mutações em alguns genes (Cameron et al., 1979; Kinsey e Helber, 1989). Segundo ZANOTTI et al. (2005), os genes mutados têm grande potencial para codificarem determinantes de patogenicidade. KUNG et al. (2001) relatam que transposons apresentam um papel importante na evolução e adaptabilidade no genoma de fitopatógenos, pois podem permitir perda ou ganho de virulência.

A expansão dos ETs pode causar impacto na organização e funcionamento dos genes que podem ser modificados e/ou inativados, podendo, também, induzir alterações na regulação da expressão gênica (Amselem et al., 2011). Entretanto, o genoma dos organismos possuem diferentes estratégias para evitar a movimentação excessiva desses elementos. Em fungos, existe um mecanismo de silenciamento gênico denominado de RIP (Repeat-Induced Point Mutation) (SELKER, 2002; SELKER, 1990; DAVIDS, 2000). Este mecanismo consiste em identificar duplicações e introduzir mutações do tipo C:G para T:A em ambas fitas de

DNA (GALAGAN e SELKER, 2004). RIP foi originalmente encontrado na espécie *Neurospora crassa* através dos elementos transponíveis e em sequências altamente repetitivas que podem ser inativadas por mutações (KIDWELL, 2005) e, geralmente, atua em sequências duplicadas de DNA durante o ciclo sexual (GALAGAN e SELKER, 2004).

Os elementos transponíveis identificados em *S. sclerotiorum* ocupam 7% do genoma (AMSELEM et al., 2011). Até o momento, não foram relatados outros trabalhos acerca de ETs em *S. sclerotiorum*. Os ETs podem ter papel importante na estruturação do genoma deste fungo, permitindo um aumento na adaptação dessa espécie a diferentes ambientes. Nesse trabalho, foram caracterizados dois retrotransposons, *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*, de *S. sclerotiorum*, e fortes evidências de atuação do mecanismo de silenciamento RIP em sequências de LTR nesses elementos transponíveis identificados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação e classificação dos elementos transponíveis

Foi realizada uma busca no banco de sequências do genoma de *Sclerotinia sclerotiorum* (www.broadinstitute.org/annotation/genome) via ferramenta Search usando a palavra-chave “reverse transcriptase”. Para a identificação das principais regiões do retrotransposon foi utilizado o programa LTR-FINDER. A classificação do elemento foi realizada pelas características estruturais de cada elemento e análise filogenética da sequência que codificam a proteína transcriptase reversa. Para análise filogenética foram utilizadas sequências da proteína transcriptase reversa de diferentes grupos de elementos transponíveis. Os elementos com seus respectivos organismos de origem e acesso no Genbank foram: *Maggy*, *Magnaporthe grisea* (AAA33420); *Real*, *Alternaria alternata* (BAA89272); *Ty3*, *Saccharomyces cerevisiae* (M23367); *copia*, *Drosophila simulans* (D10880); *Ty1*, *S. cerevisiae* (Z48149); *jockey*, *Drosophila melanogaster*

(M22874); *Penelope*, *Drosophila virilis* (AAL14979) e *DIRS*, *Lytechinus variegatus* (BK001257).

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa MEGA4 (TAMURA et al. 2007) e para análise filogenética foi utilizando o método Neighbor-joining com valores de bootstrasp para 5000 replicatas.

2.2. Evidências de RIP (Repeat-Induced Point Mutation)

Foram analisadas 157 sequências de LTRs do elemento retrotransposon *Copia-LTR_SS* e 12 sequências de LTRs do elemento retrotransposon *Gypsy-LTR_SS* obtidas no banco de dados de *S. sclerotiorum* (www.broadinstitute.org/annotation/genome). Estes elementos possuem sequências LTR com 238 e 436 pb, respectivamente.

Para o alinhamento das sequências foi utilizado o programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). Para a análise de dinucleotídeos e cálculo de índices de RIP foi utilizado o software RipCal (HANE e OLIVER, 2008). Os índices utilizados para evidenciar RIP foram TpA/ApT e $(CpA+TpG)/(ApC+GpT)$.

Os dados obtidos para *S. sclerotiorum* foram comparados com os obtidos para transposase de *Colletotrichum cereale* (Crouch et al., 2007), PeTra de *Penicillium chrysogenum* (BRAUMANN et al., 2008), OPUIO3-1414 de *Ophiostoma umi* (BOUVET et al., 2008), *Fot 1* de *Fusarium oxysporum* (DABOUSSI et al., 1992) e *Punt* de *Neurospora crassa* (Magolin et al., 1998) utilizando os mesmos índices.

3. RESULTADOS

3.1. Dois novos retrotransposons que pertencem à superfamília *Copia* e *Gypsy* foram encontrados no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum*

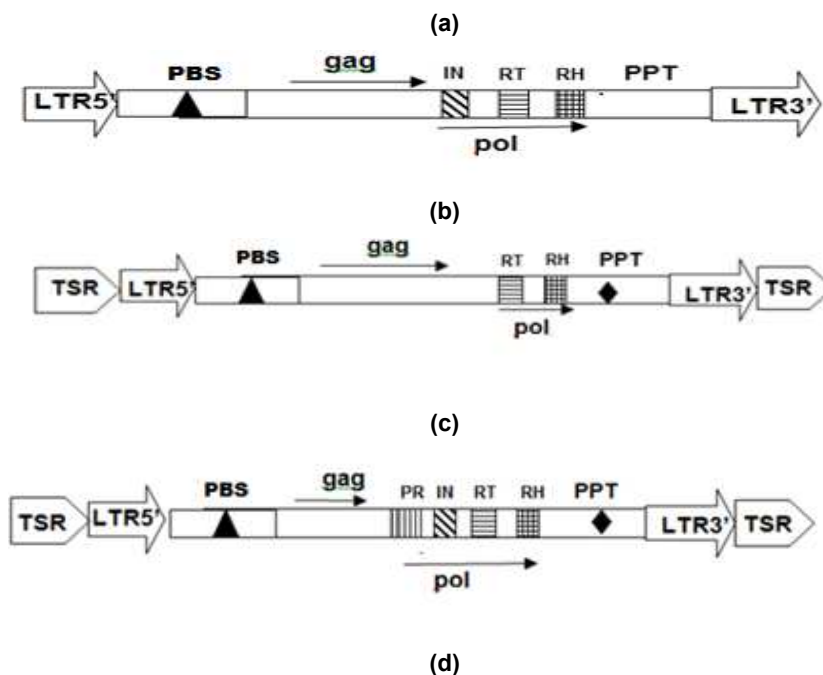
Uma busca no banco genômico de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando como palavra chave “reverse transcriptase” permitiu a identificação de dois elementos transponíveis que foram denominados de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*. Esses elementos são retrotransposons que pertencem à classe I, retrotransposon com LTR. Os elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* pertencem à superfamília *Copia* e *Gypsy*, respectivamente. As sequências de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* possuem 5.344 pb e 6.469 pb, respectivamente.

O elemento *Copia-LTR_SS* (Figura 1a) apresenta longas repetições terminais (LTRs) diretas conservadas de 269 pb e uma ORF (sequência de leitura aberta) que codifica as proteínas *gag* e as proteínas da região *pol*: integrase, transcriptase reversa e RNase H. Essas proteínas bem como sua disposição são típicas de elementos *Copia*. Foram também identificadas as regiões PPT (Polypurine Tract) rica em purinas e PBS (Primer Binding Site) importantes para a transcrição reversa do elemento transponível. As LTR 5' e 3' possuem 99% de identidade entre si e tipicamente terminam em repetições diretas com um consenso de 5'-TG...CA-3', característicos dos retrotransposons.

O elemento *Gypsy-LTR_SS* (Figura 1b) apresenta longas repetições terminais (LTRs) diretas conservadas de 435 pb e domínios conservados para a proteína *Gag*, transcriptase reversa e RNase H. No entanto, não foi possível identificar o domínio referente à integrase e protease. Tal como para *Copia-LTR_SS*, as LTR 5' e 3' de *Gypsy-LTR_SS* possuem 99% de identidade e tipicamente terminam em repetições diretas com um consenso de 5'-TG...CA-3'. Foi Também identificada, neste elemento, a região rica em purinas denominada de

PPT (Polypurine Tract) e PBS (Primer Binding Site). Além disso, existem sinais de inserção do elemento transponível denominado de TSR (Target Site Repeat), sequência de 4 a 6 pb que flanqueia as sequências LTR 3' e LTR 5', que são duplicados no momento da inserção.

Uma busca por novas cópias dos elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* foi realizada no banco genômico de *S. sclerotiorum*. Não foram encontrados outros elementos retrotransponíveis contendo os principais domínios referentes aos elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*. Entretanto, foram encontradas sequências referentes à LTR-Solo e elementos TRIM (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*). Ao todo foram encontradas 141 e 359 sequências LTR-Solo para os elementos retrotransposons *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*, respectivamente. Além disso, foram encontradas três sequências para elementos TRIMs originadas do elemento *Copia-LTR_SS* e 21 sequências de elementos TRIMs originadas do elemento *Gypsy-LTR_SS*.



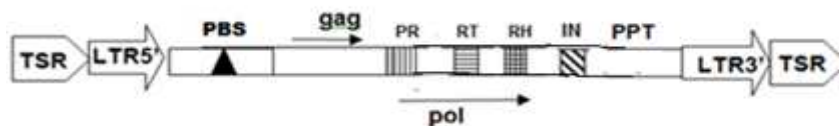


Figura 1. Estruturas dos retrotransposons *Copia-LTR_SS* (a) e *Gypsy-LTR_SS* (b) de *Sclerotinia sclerotiorum*. Estrutura básica dos retrotransposons das superfamílias *Copia* (c) e *Gypsy* (d). A região *pol* contém os domínios PR (protease), RT (transcriptase reversa), RH (RNase H) e IN (integrase). As regiões PBS (Primer Binding Site) e PPT (Polypurine Tract) são importantes para a transcrição.

Uma análise filogenética foi realizada com sequências que codificam a proteína transcriptase reversa dos retrotransposons a fim de determinar os grupos a que os elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* pertencem. O elemento *Gypsy-LTR_SS* agrupou com diferentes retrotransposons do grupo *Ty3/Gypsy*, enquanto o elemento *Copia-LTR_SS* foi incluído no grupo dos retroelementos *Ty1/Copia* (Figura 2).

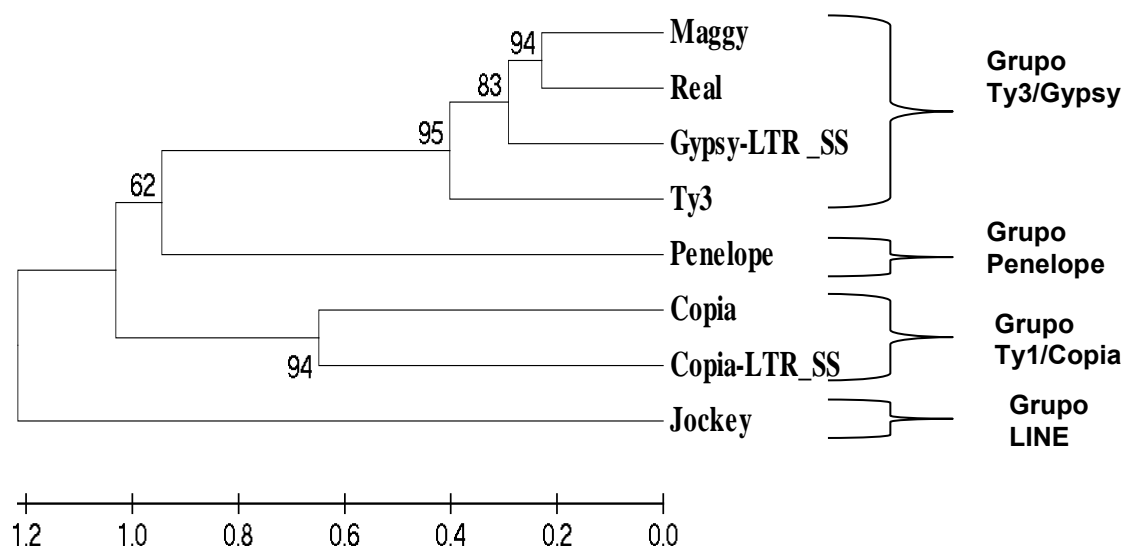


Figura 2. Dendrograma representando as relações filogenéticas dos elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* encontrados no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da proteína transcriptase reversa relacionando-os com outros grupos de elementos obtidos no GenBank. Esta análise foi realizada pelo

método Neighbor-joining com valores de bootstrasp para 5.000 replicatas.

3.2. RIP (Repeat-Induced Point Mutation) em sequências de LTR *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* presentes em *S. sclerotiorum*

Foram analisadas 157 sequências de LTRs para o elemento retrotransposnível *Copia-LTR_SS* e 12 sequências de LTRs do elemento retrotransposonível *Gypsy-LTR_SS*. Os resultados obtidos foram comparados com os descritos na literatura onde RIP tem sido evidenciado (Tabela 1). Os valores dos índices TpA/ApT e $(CpA + TpG)/(ApC+GpT)$ obtidos para *S. sclerotiorum* são consistentes com os da literatura sugerindo que em *S. sclerotiorum* os dinucleotídeo CpA são alvos para mutação gerada por atividade de um mecanismo semelhante a RIP.

Tabela 1. Índices TpA/ApT e $CpA+TpG/ApC+GpT$ para os transposons e retrotransposons

Sequências	(TpA/ApT)	($CpA+TpG)/(ApC+GpT$)
Retrotransposon <i>Copia-LTR_SS</i>	1.35	0.27
Retrotransposon <i>Gypsy-LTR_SS</i>	1.0	0.95
Transposase (<i>Colletotrichum cereale</i>)	2,00	0,44
<i>PetTra</i> (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	1,22	0.58
OPHIO3-1414 (<i>Ophiostoma ulmi</i>)	1,51	0,60
Fot1 (<i>Fusarium oxysporum</i>)	1,12	0,75
<i>Punt</i> (<i>Neurospora crassa</i>)	1,32	0,56

Valores de referência padrão de índices para RIP são $(TpA/ApT) > 0,89$, $(CpA+TpG)/(ApC+GpT) < 1,03$; (www.sourceforge.net/protects/ripca1).

4. DISCUSSÃO

Uma grande variedade de elementos transponíveis (ETs) já foi identificada no genoma de fungos, em especial nos fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011), estando a maioria presente em espécies do filo Ascomycota (DABOUSSE e COPY, 2003). Embora a maioria das espécies fúngicas dos filos Basidiomycota e Ascomycota apresentem genoma pequeno e compacto, com tamanho aproximado de 10 a 20 Mb, e baixa frequência de ET (aproximadamente 5%) (BLEYKASTEN-GROSSHANS e NEUVÉGLISE, 2011) alguns fungos filamentosos apresentam genoma de tamanho bem maior em relação ao tamanho geralmente relatado, além de alta proporção de ETs (DABOUSSE e COPY, 2003).

O tamanho do genoma de *Sclerotinia sclerotiorum* é de 38 Mb, sendo 7% deste genoma representado por transposons (AMSELEM et al. 2011). Neste trabalho, a partir da análise da estrutura dos elementos retrotransponíveis de *S. sclerotiorum*, foram identificados dois retrotransposons pertencentes às superfamílias *Copia* e *Gypsy* que foram denominados, respectivamente de *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*. Esta inferência teve como base a análise filogenética, considerando que estes elementos agruparam junto com elementos destas superfamílias.

São componentes estruturais dos retrotransposons *Copia* e *Gypsy*, as regiões PBS, *gag*, *pol* e PPT. As regiões PBS e PPT correspondem a sítios importantes para transposição do retroelementos com LTRs; o gene *gag* codificam proteínas estruturais semelhantes às que compõem o capsídeo viral sendo esta uma característica de similaridade entre o retrotransposons (LTR) e retrovírus;

a região *pol* codifica uma poliproteína, que é processada dando origem a proteínas envolvidas na transposição do retrotransposon incluindo a protease, que está associada à maturação e clivagem da poliproteína, a transcriptase reversa que transcreve o RNA em cDNA, a integrase que favorece a inserção do transposon no genoma do hospedeiro e a RNase H que degrada regiões do RNA durante a síntese de cDNA (HAVECKER et al., 2004; MANETTI et al., 2007). A identificação da localização do domínio conservado da integrase na região *pol* é importante pois, isso permite identificar a qual superfamília, *Copia* ou *Gypsy*, pertence o retrotransposon (KIDWELL, 2005).

O elemento *Copia-LTR_SS* de *S. sclerotiorum* apresenta domínios conservados das proteínas *gag* bem como das proteínas integrase, transcriptase reversa e RNase H localizados na região *pol*. Estes domínios foram identificados também na estrutura do elemento *Gypsy-LTR_SS* com exceção do relacionado à integrase. Uma provável explicação para a ausência da integrase, é a ocorrência de mutações nesse elemento, tornando-o inativo.

Foram encontradas sequências referentes à LTR-Solo e TRIM para os dois retrotransposons identificados. Segundo AMSELEM et al. (2011), as sequências de *Gypsy* e *Copia* dos retrotransposons presentes no genoma de *S. sclerotiorum* são compostas, principalmente, por regiões LTR-Solo e a presença dessas regiões evidencia que existe uma redução do tamanho dos retroelementos, ou seja, a diminuição dos retrotransposons completos para a forma LTRs-Solo. AMSELEM et al. (2011) ressaltam que essa característica pode evitar um aumento no tamanho do genoma. O potencial de deleções no genoma de *S. sclerotiorum* assim como o aumento do número dos ETs estão relacionados com a expansão de retroelementos incompletos, ou seja, na forma de LTR-Solo. Os autores sugerem que o genoma de *S. sclerotiorum* sofre um considerável remodelamento devido à expansão dos ETs. Essa expansão dos ETs no genoma de *S. sclerotiorum* pode

causar impacto na organização e funcionamento do genoma, incluindo a inativação, regulação, modificação ou regulação da expressão de genes.

Quanto às regiões de inserção, foi identificado no elemento *Gypsy-LTR_SS*, uma TSR de 5 pb (GAAAT). No entanto, no elemento *Copia-LTR_SS*, as sequências que flanqueiam as LTR 3' e LTR 5' são diferentes decorrente, provavelmente, de eventos de recombinação não podendo, desta forma, afirmar que estas sequências correspondem a sítios de inserção neste elemento. A presença no genoma de diferentes sítios de inserção nas extremidades de um mesmo elemento transponível pode ser decorrente de recombinação entre retrotransposons. SANTANA et al. (2012) relatam que variação nas sequências das regiões TSR dos elementos LTRs são evidências de recombinação ectópica no genoma podendo, este genoma, estar passando por constantes recombinações que podem, por consequência, acarretar uma reestruturação no genoma. Em *S. sclerotiorum* isso é reforçado pelo grande número de LTRs-Solo e elementos TRIM detectados no genoma deste fungo. As sequências LTR-Solo são resultantes da recombinação entre as LTRs 5' e 3' do mesmo elemento (AMSELEM et al., 2011) enquanto os elementos TRIM são derivados de pequenas regiões de aproximadamente 4 kb de LTR-retrotransposons não-autônomos, podendo, também, ser originados de LTR-retrotransposons com algumas sequências remanescentes das proteínas *Gag*, integrase e transcriptase reversa, ou seja, sequências dos LTR-retrotransposon autônomos (WICKER et al., 2007). Segundo HAVECKER et al. (2004), os elementos transponíveis não-autônomos não são capazes de codificar proteínas necessárias à transposição.

Existe evidência da presença de mecanismo defesa contra os elementos transponíveis no genoma de *S. sclerotiorum*. Os resultados obtidos são consistentes com os encontrados na literatura que evidenciam o mecanismo de silenciamento RIP, considerando que os índices detectados estão de acordo com os referentes para a existência deste mecanismo de defesa: $TpA/ApT > 0,89$ e $CpA+TpG/ApC+GpT < 1,03$. A presença de transições CpA–TpA pode introduzir aumento de

códons de terminação TAA e TAG induzindo o silenciamento de genes (MONTIEL et al., 2006).

Com base no exposto, a detecção de elementos LTR-Solo e TRIM em *S. sclerotiorum* evidencia a presença de recombinações no genoma desta espécie de fungo e sugere uma reestruturação do genoma mediado por elementos transponíveis. A evidência de mutações por RIP sugere existência em *S. sclerotiorum* de mecanismo de inativação dos transposons além destes eventos poderem resultar na formação de novos alelos que podem gerar diversidade genética neste patógeno. A abundância de cópias de LTR-Solo e TRIMs identificadas em *S. sclerotiorum* indica que estas sequências podem ser utilizadas como marcador molecular para estudo populacional e de diversidade genética em populações desta espécie de fungos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMSELEM, J.; CUOMO, J.; VAN KAN, J. A. L.; VIAUD, M.; BENITO, E.P.; COULOX, A.; COUTINHO, P. M.; VRIES, R.P.; DYER, P. S.; FILLINGER, S.; FOUNIER, E. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Plos Genetics** 7: 1-27.
- BLEYKASTEN-GROSSHANS, C.; NEUVÉGLISE, C. 2011. Transposable elements in yeasts. **Comptes Rendus Biologies** 334: 679-686.
- BRAUMANN, I.; BERG, M.; KLEMPKEN, F. 2008. Repeat induced point mutation in two asexual fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **Current Genetics** 53: 287-297.
- BOUVET, F. B.; JACOB, B.; PLOURD, K.V.; BERNIER, L. 2008. Stress-induced mobility of *OPHO1* and *OPHO2*, DNA transposons of the Dutch elm disease fungi. **Fungal Genetics and Biology** 45: 565-578.
- CAMERON, J.R.; LOH, E.Y.; DAVIS, R.W. 1979. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. **Cell** 16: 739-751.

- CROUCH, J.A.; GLASHEEN, B.M.; GIUNTA, M.A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. 2008. The evolution of transposon repeat-induced point mutation in the genome of *Colletotrichum cereale*: Reconciling sex, recombination and homoplasmy in an “asexual” pathogen. **Fungal Genetics and Biology** 45: 190-206.
- DABOUSSE, M. J.; COPY, P. 2003. Transposable elements in filaments fungi. **Annual Review of Microbiology** 57: 275-299.
- DAVIS, R. H. **Neurospora: contributions of a model organism**. Oxford University Press, 2000.
- GALAGAN, J. E.; SELKER, E. U. 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics** 20: 417-423.
- HALL, R.; STEADMAN, J.R. White mold. In: SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R.; FOSTER, R.L. (Eds.) **Compendium of bean diseases**, 2nd ed. 2005, p.44-46.
- HANE, J.; OLIVER, R. P. 2008. RIPCAL: a tool for alignment-based analyses of repeat-induced point mutations in fungal genomics sequences. **BMC Bioinformatics** 9: 478 doi: 10.1186/1471-2105-9-473.
- HAVECKER, E.R.; GAO, X.; VOYTAS, D.F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome Biology** 5: 225
- KIDWELL, M.G. Transposable Elements. **The evolution of the genome**. Ed. TR. Gregory, 2005, p105-220.
- KINSEY, J. A.; HELBER, J. 1989. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86: 1929–1933.
- KUNG, S.; LEBRUN, M.H.; FARRALL, L.; VALENT, B.; 2001. Gain of virulence caused insertion of a *Pot 3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **The American Phytopathology Society** 14: 671-674.
- MAGOLIN, B. S.; GARRETT-ENGELE, P.W.; STEVENS, J. N.; FRITZ, D.Y.; GARRETT-ENGELE, C.; METZENGERG, R. L.; SELKER, E. U. 1998. A methylated *Neurospora* 5S rRNA pseudogene contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation. **Genetics** 149:1787-1791.
- MANETTI, M. E.; ROSSI, M.; COSTA, A. P. P; CLAUSEN, A. M.; VAN SLUYS, M. 2007. Radiation on the Tnt I retrotransposon superfamily in three Solanaceae genera. **BMC Evolutionary Biology** 34:1-12.

- MONTIEL, M. D.; LEE, H. A.; ARCHER, D. B. 2006. Evidence of RIP (repeat-induced point mutation) in transposase sequences of *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics of Biology** 43 (6): 439-445.
- NEUMANN, P.; PAZARKOVA, D.; MACAS, J. 2003. Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. **Plant Molecular Biology** 3:399-410.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão**. 2ed. atual. Viçosa: Editora UFV, 2006, p.359-414.
- REGNER, L.P.; LORETO, E. L. S.; Transposons. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (Org). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: 3º Edição, Mercado Aberto Ed, 2003, p.203-226.
- SANTANA, M.F.; SILVA, J. C.F.; BATISTA, A.D.; RIBEIRO L. E.; SILVA, G. F.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. 2012. Abundance, distribution and potential impact of transposable elements in the genome of *Mycosphaerella fijiensis*. **BMC Genomics** 13:2-11.
- SELKER, E.U. 1990. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annual Review Genetic** 24:579-613.
- SELKER, E.U. (2002). Repeat-induced gene silencing in fungi. **Advances in Genetics**. 46: 439–450.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.
- WICKER, T.; SABOT, F.; HUAN-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MOGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A.K. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable. **Nature Reviews** 8: 973-982.

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Sclerotinia sclerotiorum* DO ESTADO DE MINAS GERAIS POR MEIO DA TÉCNICA MOLECULAR IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism)

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é o agente causal do mofo-branco, uma doença considerada a mais prejudicial à cultura do feijoeiro. Elementos transponíveis encontrados no genoma de diversos organismos, incluindo fungos fitopatogênicos, podem ser utilizados como marcadores para traçar o perfil genético de populações de patógenos, permitindo o rastreamento e identificação de raças específicas. Considerando a ampla distribuição dos transposons no genoma de *S. sclerotiorum*, o objetivo deste estudo foi caracterizar populações de *S. sclerotiorum* utilizando retrotransposons (LTR) com base no marcador molecular IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism). Foi estimada a variabilidade genética em populações de *S. sclerotiorum* do estado de Minas Gerais compreendendo 98 isolados procedentes de quatro regiões geográficas deste estado (Zona da Mata, Noroeste, Sul e Triângulo Mineiro). Alta diversidade genética foi observada em todas as populações avaliadas. Esta alta diversidade foi confirmada pelos altos valores de diversidade gênica de Nei e dos índices de Shannon estimados. Na AMOVA, os altos valores de variação gênica dentro das subpopulações da zona da Mata e do Noroeste aliado aos baixos valores de *F_{st}* estimados, sugerem que nestas duas populações suas respectivas subpopulações não estão geneticamente estruturadas. Estes resultados são confirmados pela análise de agrupamento dos isolados por UPGMA. O marcador molecular IRAP demonstrou ser apropriado para identificar marcas polimórficas no genoma de *S. sclerotiorum* permitindo assim o estudo de variabilidade genética neste fungo.

1. INTRODUÇÃO

O mofo-branco do feijoeiro que tem como agente causal o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, ocorre em um grande número de países, principalmente nas regiões de clima temperado e subtropical. É uma doença bastante destrutiva e pode ser um problema sério em áreas com histórico da doença e na safra irrigada do inverno (BIANCHINI et al., 2005). O fungo pode afetar toda a parte aérea da planta, causando lesões inicialmente pequenas, marrons e, em seguida, a podridão do caule (BIANCHINI et al., 2005).

O controle do mofo-branco requer a integração de vários métodos, pois este fungo tem a capacidade de produzir estruturas de resistência, os escleródios, que podem sobreviver no solo por períodos de 4 a 5 anos (GOMES et al., 2011). Além disso, os estudos sobre estrutura genética de *S. sclerotiorum* tem demonstrado alta diversidade genética entre os isolados de regiões tropicais (GOMES et al., 2011; Lehner, 2011). Com relação aos elementos transponíveis (ETs), SCHULMAN et al. (2004) mencionam que os mesmos têm um papel crucial na variabilidade genética de várias espécies de fungos.

ETs podem ser definidos como sequências de DNA moderadamente repetitivas com capacidade de mover-se de um local a outro no genoma e, desta maneira, podem ocasionar grande impacto na estrutura e na função dos genes bem como na organização dos cromossomos de todas as espécies (ZANOTTI et al., 2005). A descoberta de que estes elementos são componentes comuns do genoma fúngico, os tornam interessantes objetos de estudo em função do efeito que podem exercer no genoma de seus hospedeiros. Os ETs são responsáveis por grande número de mutações espontâneas, gerando modificações na expressão de genes, alterando as sequências de bases e a estrutura nos cromossomos (ZANOTTI et al., 2005).

Os ETs podem ser classificados de forma hierárquica em classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Existem duas

classes de elementos que se diferenciam pela presença ou ausência de um RNA intermediário. Na classe I, a partir de uma cópia de RNA do transposon ocorre, via transcriptase reversa, a síntese de DNA que então é capaz de se inserir em um sítio alvo. Nos elementos da classe II ocorre diretamente um processo de excisão seguido de integração (WICKER et al., 2007). Devido à sua abundância nos genomas e a capacidade de gerar cópias que são inseridas em outros sítios do genoma, os retroelementos representam potenciais marcadores genéticos. Atualmente, existem três técnicas de marcadores moleculares, baseadas em retroelementos, amplamente utilizadas para estudos de variabilidade genética: S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) (Waugh et al., 1997), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Kalendar et al., 1999) e REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (KALENDAR et al., 1999). Dentre estes marcadores, IRAP vem sendo muito utilizado para análise da variabilidade genética de diferentes populações de fungos (PASQUALI et al., 2007). Na técnica de IRAP, os dois oligonucleotídeos iniciadores anelam nas regiões conservadas do retrotransposon (LTRs), enquanto na REMAP um dos iniciadores anela em uma LTR e o outro anela em sequência microsatélite (SSR) o que permite a detecção de inserções de transposons próximo de SSRs (KALENDAR et al., 1999).

A técnica IRAP apresenta algumas vantagens em relação a outros marcadores moleculares como a versatilidade para a combinação de vários primers que anelam em regiões conservadas dos retrotransposons e a alta reprodutibilidade por meio do uso de primers específicos. Constituem desvantagens dessa técnica a necessidade de se conhecer previamente a sequência LTR do genoma do organismo para desenho dos primers, o fato das amplificações dependerem do número de cópias do retrotransposon e por serem considerados marcadores dominantes (SANTANA et al., 2012).

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivos analisar a variabilidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes

de feijoeiros de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, utilizando a técnica IRAP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Um total de 98 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* disponibilizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) foram avaliados neste estudo (Tabela 1). Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram coletados em lavouras de feijão afetadas pelo mofo-branco localizadas nas principais regiões produtoras de feijão, tipo Carioca, do estado de Minas Gerais durante o período de junho de 2009 a janeiro de 2011. A coleta foi realizada em 16 localidades distribuídas nas regiões Noroeste, Sul, Triângulo Mineiro/Alto do Parnaíba e Zona da Mata do estado de Minas Gerais (Figura 1). A distância em linha reta entre as cidades amostradas é de aproximadamente 13,98 Km (Viçosa a Coimbra) a 60,05 Km (Presidente Bernardes a Canaã) na região Zona da Mata, 96,46 Km no Noroeste e 109,04 Km no Triângulo Mineiro. As amostras foram codificadas com número conforme Tabela 1.

Tabela 1. Código das amostras e local de amostragem de *Sclerotinia sclerotiorum* em lavouras de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris*) do Estado de Minas Gerais.

Código das amostras	Localidade	Região geográfica de Minas Gerais
1	Viçosa	Zona da Mata
2	Oratórios	Zona da Mata
4	Viçosa	Zona da Mata
8	Canaã	Zona da Mata
9	Canaã	Zona da Mata
10	Canaã	Zona da Mata
11	Canaã	Zona da Mata
12	Canaã	Zona da Mata
13	Viçosa	Zona da Mata

14	Viçosa	Zona da Mata
15	Viçosa	Zona da Mata
17	Porto Firme	Zona da Mata
18	Viçosa	Zona da Mata
19	Viçosa	Zona da Mata
20	Porto Firme	Zona da Mata
21	Porto Firme	Zona da Mata
22	Porto Firme	Zona da Mata
23	Porto Firme	Zona da Mata
24	Porto Firme	Zona da Mata
26	Porto Firme	Zona da Mata
28	Presidente Bernardes	Zona da Mata
29	Presidente Bernardes	Zona da Mata
30	Presidente Bernardes	Zona da Mata
31	Presidente Bernardes	Zona da Mata
32	Oratórios	Zona da Mata
33	Oratórios	Zona da Mata
34	Coimbra	Zona da Mata
35	Coimbra	Zona da Mata
36	Coimbra	Zona da Mata
37	Coimbra	Zona da Mata
38	Coimbra	Zona da Mata
39	Viçosa	Zona da Mata
40	Viçosa	Zona da Mata
41	Viçosa	Zona da Mata
42	Viçosa	Zona da Mata
43	Viçosa	Zona da Mata
84	Rio Pomba	Zona da Mata
44	Paracatu	Noroeste
45	Paracatu	Noroeste
47	Paracatu	Noroeste
48	Paracatu	Noroeste
49	Paracatu	Noroeste
50	Paracatu	Noroeste
51	Paracatu	Noroeste
52	Paracatu	Noroeste
53	Paracatu	Noroeste
54	Paracatu	Noroeste
55	Paracatu	Noroeste
56	Unai	Noroeste
57	Unai	Noroeste
58	Unai	Noroeste
60	Unai	Noroeste
61	Unai	Noroeste
62	Unai	Noroeste
63	Unai	Noroeste
64	Unai	Noroeste
65	Unai	Noroeste
66	Unai	Noroeste
68	Unai	Noroeste
69	Unai	Noroeste
71	Unai	Noroeste
72	Unai	Noroeste
73	Unai	Noroeste
74	Unai	Noroeste

75	Unai	Noroeste
76	Unai	Noroeste
77	Unai	Noroeste
78	Unai	Noroeste
79	Unai	Noroeste
80	Unai	Noroeste
107	Paracatu	Noroeste
108	Paracatu	Noroeste
109	Paracatu	Noroeste
110	Paracatu	Noroeste
113	Unai	Noroeste
81	Ijaci	Sul
85	Ijaci	Sul
86	Ijaci	Sul
87	Ijaci	Sul
89	Ijaci	Sul
90	Ijaci	Sul
91	Ijaci	Sul
94	Ijaci	Sul
95	Ijaci	Sul
96	Ijaci	Sul
98	Ijaci	Sul
99	Ijaci	Sul
100	Ijaci	Sul
115	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
117	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
119	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
121	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
122	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
124	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
126	Patos de Minas	Triângulo Mineiro
127	Iraí de Minas	Triângulo Mineiro
129	Iraí de Minas	Triângulo Mineiro
131	Iraí de Minas	Triângulo Mineiro
Número total de amostras		98

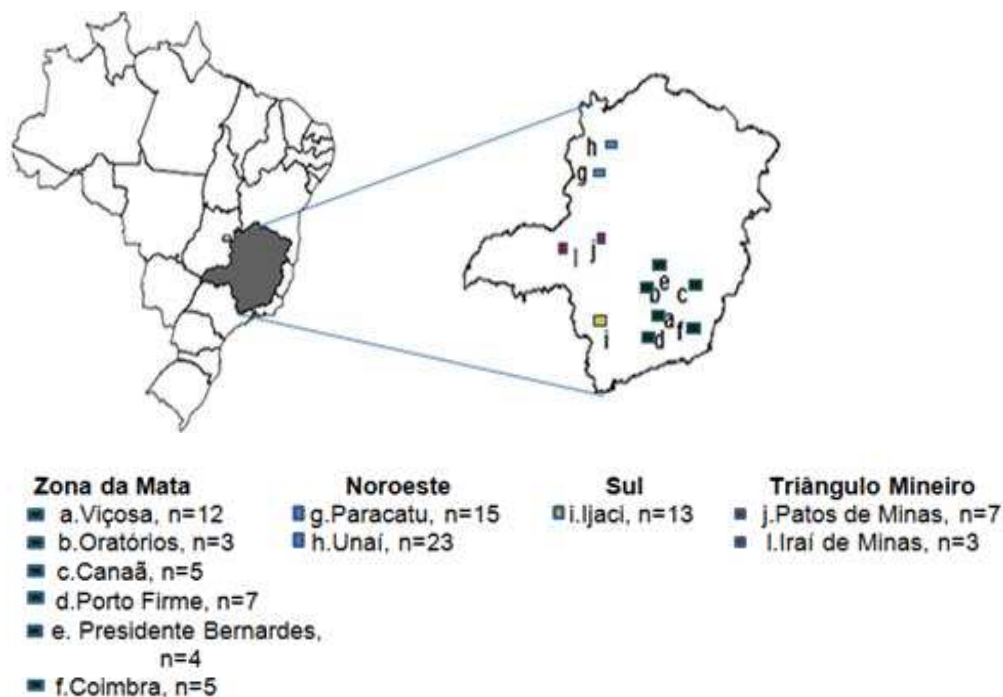


Figura 1. Localização das amostras de *Sclerotinia sclerotiorum* coletadas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, sendo (n) o número de isolados amostrados por região geográfica.

2.2. Purificação e cultivo dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Com o objetivo de assegurar a manutenção da identidade genética de cada isolado, os escleródios foram purificados utilizando o método de isolamento de ponta de hifa proposto por LEHNER (2011). Para este fim, os escleródios trazidos do campo foram submetidos a uma desinfestação superficial de acordo com metodologia descrita por NEERGAARD (1979). Os escleródios foram imersos em solução de álcool etílico a 70% por 3 minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio por 5 minutos e duas lavagens com água destilada esterilizada (ADE) (NEERGAARD, 1979). Após esses procedimentos, os escleródios foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar) suplementado com o antibiótico cloranfenicol na concentração de 0,25g/Litro. As placas foram colocadas em estufas do tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de 23 a 25°C por

um período de sete dias quando se observa formação do micélio (NEEGAARD, 1979). Após a germinação dos escleródios e formação da colônia, segmentos únicos de extremidade de hifas de cada isolado foram transferidos assepticamente para novas placas com BDA. As culturas foram mantidas a 23 °C no escuro por um período de 15 dias, sendo então preservadas a 4°C, também no escuro (LEHNER, 2011). Os escleródios produzidos a partir de culturas puras de hifas, foram submetidos aos mesmos procedimentos de desinfestação superficial (NEEGAARD, 1979) e germinação em meio BDA. O micélio formado foi utilizado para extração de DNA.

Todas as análises realizadas neste trabalho foram obtidas de culturas de *S. sclerotiorum* oriundas de extremidades de hifas.

2.3. Extração de DNA total de *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a extração de DNA total, o micélio de cada isolado de *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA sólido foi primeiramente transferido para meio líquido sintético (sacarose 1% (g), L-asparagina 0,2% (g), extrato de levedura 0,2% (g), KH_2PO_4 0,1% (g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% (g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,044% (mg), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,048% (mg) e $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,036% (mg)), o qual não contém batata que poderia influenciar na análise do DNA do fungo e mantido por três dias em BOD à temperatura de 23-25°C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, a cultura foi filtrada através de uma peneira e o micélio foi seco em câmara de fluxo laminar por quatro horas e preservado a -80°C em ultrafreezer. O micélio seco foi utilizado para extração de DNA total conforme metodologia descrita por DOYLE e DOYLE (1990) com modificações. O procedimento de extração consistiu em: (1) macerar o micélio em nitrogênio líquido; (2) adicionar tampão CTAB 2% (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM; PVP 1% e Metabissulfito de sódio 20 mM) e 1,5 % de Beta-mercaptoetanol; (3) incubar à 65°C por 30 min, centrifugar por 5 min a 13.000 g e posteriormente depositar 500 µL da fase aquosa em dois novos tubos; (4)

adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); (5) agitar em vortex, centrifugar a 13000 g por 5 min e transferir 700 µL da fase aquosa para um novo tubo; (6) adicionar 700 µL de isopropanol à fase aquosa, inverter suavemente e incubar a -20 °C por 10 min; (7) centrifugar a 13000 g por 7 min, descartar o isopropanol e lavar o precipitado com 500 µL de etanol 70% por duas vezes; (8) secar em bancada por 2 h, ressuspender em 50 µL de tampão TE contendo 2 µL de RNase (1 mg/mL) e incubar a 37 °C por 2 h (DOYLE e DOYLE,1990).

A qualidade e a quantidade do DNA total foram avaliadas por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O DNA obtido foi imediatamente armazenado a -20°C.

2.4. Obtenção de primers com base em sequências de nucleotídeos de transposons de *Sclerotinia sclerotiorum* e reação de cadeia da polimerase (PCR)

A técnica utilizada para obtenção de marcas polimórficas foi a técnica denominada de IRAP (*inter-retrotransposon amplified polymorphism*) que consiste em amplificação por PCR utilizando primers para as regiões conservadas que flanqueiam os retrotransposons LTR. Para a obtenção dos primers, inicialmente, sequências de nucleotídeos de transposons de *S. sclerotiorum* foram identificadas a partir de sequências do genoma deste fungo depositadas no banco de dados (Broad Institute *Sclerotinia sclerotiorum* www.broadinstitute.org) utilizando como palavras-chaves o termo “*reverse transcriptase*” (capítulo I deste trabalho). Posteriormente, as sequências de transposons identificadas foram utilizadas para o desenho de primers com base nas sequências LTR utilizando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Tabela 2). Cada reação de PCR constituiu de um volume final de 25 µL contendo tampão 1x do kit Go Flex (Promega), MgCl₂ 2,0 mM, 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, aproximadamente 30 ng de DNA e 1U de Taq DNA polimerase (Go Flex). As reações de PCR foram realizadas em

termociclador Eppendorf modelo AG 22331 Hamburgo, programado para realizar 6 ciclos de 30s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 2 min a 72°C. A estes seis ciclos iniciais foram adicionados mais 24 ciclos sendo que a cada seis ciclos foram somados 30 s ao tempo de extensão. O passo de extensão final foi de 10 min a 72 °C (Santana et al., 2012). O produto da amplificação foi analisado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com tampão Tris-Acetato-EDTA10X (0,3 M de Tris-HCl, 0,2 M de acetato glacial e 0,5 M de EDTA) e corado com prata na concentração de 2% (PRIOLLI et al., 2004). O tempo de corrida no gel de eletroforese foi de aproximadamente 5 horas a 155 volts. A imagem foi visualizada e documentada por meio de foto documentador da Locus Biotecnologia L. Pix.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para o PCR.

Identificação	Sequência (5' _3')	Combinação de primers
Forward 148	CCGAAGGCTGAATACCTAACC	148F e 20R
Reverse 20	AAGATCCCAGGAGGTCAACA	
Forward 148	CCGAAGGCTGAATACCTAACC	156R e 148F
Reverse 156	AGCCTTCGGAATTAAAGTGC	
36: Super 30R	CACGTGATCTAGACGGCAA	36: Super 30R e Super 312L
36:Super 312L	GTCTGTGCTTGCTGAAGGTG	

2.5. Diversidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum*

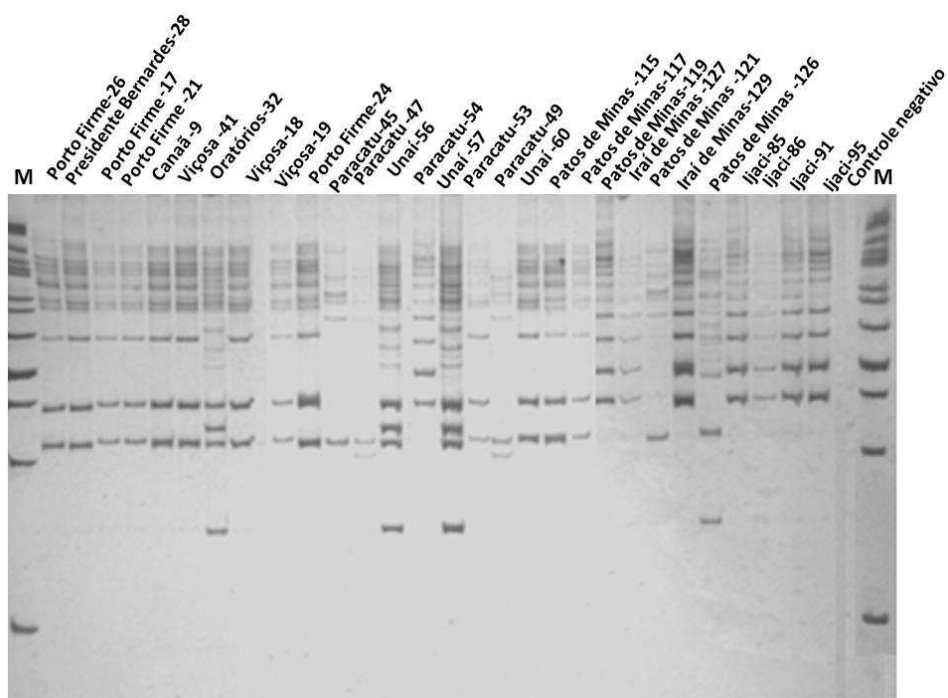
Para as análises de diversidade, os isolados de *S. sclerotiorum* foram agrupados em regiões de acordo com a região geográfica amostrada (Nordeste, Zona da Mata, Triângulo Mineiro e Sul). Os isolados de cada região amostrada foram considerados uma população e os isolados de cada cidade amostrada dentro de cada região foram considerados subpopulações (Figura 1).

Os perfis eletroforéticos obtidos foram analisados visualmente e uma matriz binária foi gerada onde a presença de uma banda foi codificada com o número 1 e a ausência com o número 0. Bandas comuns a todos os isolados não foram utilizadas para obtenção desta matriz. A matriz binária obtida foi utilizada para obtenção da matriz de distância genética entre os isolados com base no coeficiente de Nei (Nei, 1973). Os dados da matriz de distância genética foram empregados para calcular a estatística da variação genética de cada população. As estimativas incluíram porcentagem de locus polimórficos (**P**), número de alelos (**Na**), número de alelos efetivo (**Ne**), diversidade gênica pelo índice de Nei (Nei, 1973) (**h**) e diversidade genotípica pelo índice de Shannon-Wiener H' (Hill, 1973) (**I**). Os dados da matriz de distância genética foram utilizados, também, para agrupamento dos isolados com base no método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não-ponderados (UPGMA). Todas estas análises foram realizadas utilizando o software Popgene (YEH et al., 1999). Para avaliar se os isolados das subpopulações de *S. sclerotiorum* encontram-se geneticamente estruturados foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA–*Analysis of Molecular Variance*) estimada pela variação genética e pelo índice de fixação F_{st} (WEIR e COCKERHAM, 1984) implementados pelo Software Arlequin (Excoffier et al., 2006). O índice de fixação (F_{st}) (Weir e Cockerham, 1984) indica a distribuição da variabilidade genética entre populações com base na probabilidade de alelos idênticos. Estimativas de F_{st} menores que 0,050, entre 0,051 e 0,150, e entre, 0,151 e 0,250 representam baixa, média e altos níveis de diferenciação genética, respectivamente. A AMOVA foi calculada com dois níveis hierárquicos (entre e dentro de subpopulações) e apenas para as populações que continham mais de 20 isolados (Zona da Mata e Noroeste).

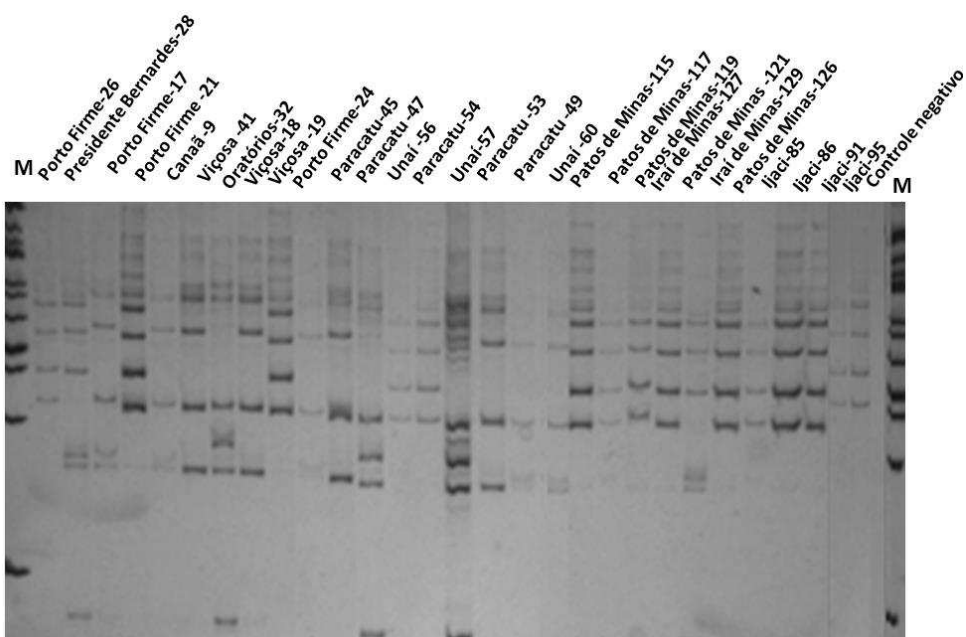
3. RESULTADOS

DNA de 98 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Tabela 1) foram analisados por PCR utilizando três combinações de primers (Tabela 2). Independente da combinação de primers utilizada, diferentes perfis eletroforéticos foram observados, indicando que todos os primers foram úteis para a detecção de polimorfismos na população avaliada (Figura 2, Anexo1).

A.



B.



C.

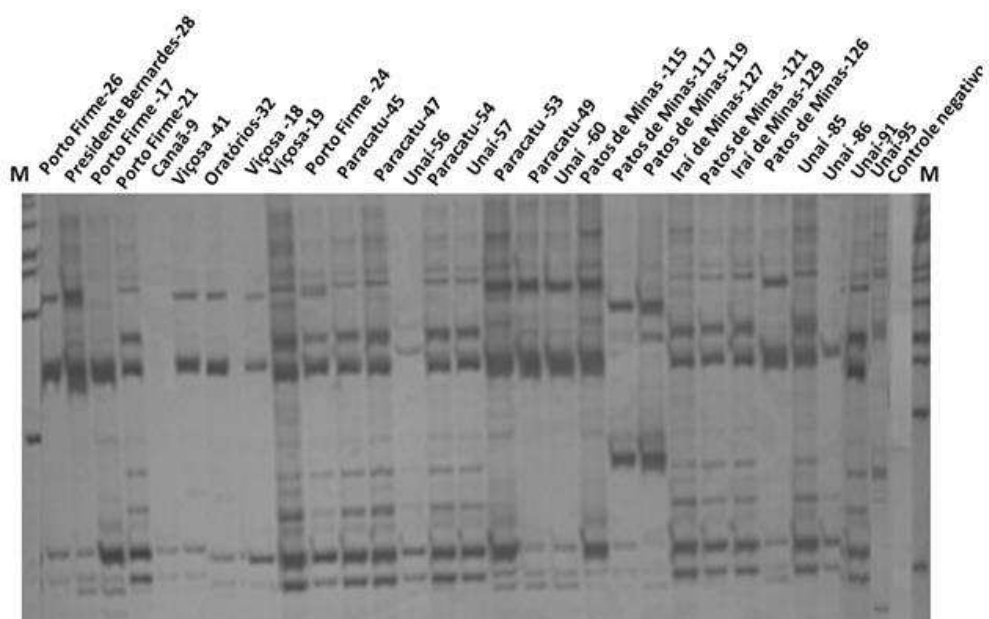


Figura 2. Perfis eletroforéticos em gel de poliácridamida a 10%, dos produtos da amplificação do DNA de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. A: primers 156R e 148F. B: primers 36: Super 30R e 36: Super 312L. C: primers. 148F e 20R. Porto Firme 26 a Porto Firme 24: amostras da Zona da Mata. 45 a 60: amostras do Noroeste. 115 a 126: Amostras do Triângulo Mineiro e 85 a 95: Amostras do Sul. C: controle negativo M: marcador de tamanho molecular 1Kb.

Ao todo foram identificados 103 haplótipos para as três combinações de primers Destes, 74 foram haplótipos exclusivos. O número de haplótipos exclusivos para cada combinação de primer e região geográfica podem ser observados na Tabela 3. Em geral, haplótipos compartilhados foram detectados dentro e entre as subpopulações analisadas.

Tabela 3. Número de haplótipos exclusivos para cada combinação de primers e região geográfica.

Combinação de primers	Região	Nº de haplótipos
156R e 148F	Zona da Mata	9
	Noroeste	9
	Triângulo Mineiro	3
	Sul	9
Total:		30
36: Super 30R e Super 312L	Zona da Mata	7
	Noroeste	6
	Triângulo Mineiro	3
	Sul	6
Total:		22
148F e 20R	Zona da Mata	7
	Noroeste	4
	Triângulo Mineiro	3
	Sul	8
Total:		22
Total de haplótipos exclusivos:		74

Observa-se na Tabela 4 o número de locos amplificados e a porcentagem de locos polimórficos quando as quatro populações de *S. sclerotiorum* foram analisadas. Para cada população avaliada, diferentes taxas de polimorfismo foram observadas quando diferentes combinações de primers foram utilizadas nas reações de PCR. Exceção foi observada

para a população Zona da Mata que apresentou 100% de taxa de polimorfismo independente da combinação de primer. A população da Zona da Mata foi a que apresentou maior taxa de polimorfismo. Embora o mesmo número de locos amplificados tenha sido identificado para as populações Triângulo Mineiro e Sul quando a mesma combinação de primer foi utilizada, as taxas de locos polimórficos variaram consideravelmente (exemplo: 22 locos foram amplificados quando a combinação de primer foi 148F e 20R sendo a taxa de locos polimórficos de 36.36% para a população do Triângulo Mineiro e 81.82% para a do Sul). Maior número de locos amplificados foi observado para as populações Triângulo Mineiro e Sul (19 a 22 locos), no entanto, a porcentagem de locos polimórficos, em geral, foi maior para as populações Noroeste e Zona da Mata (acima de 70%).

Tabela 4. Combinação de primers, número e porcentagem de locos amplificados para as populações de *Sclerotinia sclerotiorum* analisadas.

Combinação de primer	Número de locos amplificados	Porcentagem de locos polimórficos (%)
Noroeste		
156R e 148F	15	73,33
36: Super 30R e 36: Super 312L	15	100
148F e 20R	12	83,33
Zona da Mata		
156R e 148F	16	100
36: Super 30R e 36: Super 312L	18	100
148F e 20R	10	100
Triângulo Mineiro		
156R e 148F	20	25
36: Super 30R e 36: Super 312L	19	68,42
148F e 20R	22	36,36

Sul		
156R e 148F	20	65
36: Super 30R e 36: Super 312L	19	42,11
148F e 20R	22	81,82

Independente da população analisada, valores altos foram observados, em geral, para as diversidades gênica e genotípica (Índice de Shannon) (Tabela 5, Anexo 2). Observa-se na Tabela 5 que os valores obtidos para as populações Zona da Mata e Noroeste variaram de 0,17 a 0,35 (diversidade gênica) e de 0,27 a 0,52 (Índice de Shannon). Embora, para todas as combinações de primer utilizadas, valores similares de diversidade gênica tenham sido identificados na população Noroeste, o mesmo não foi observado para a população Zona da Mata onde os valores foram consideravelmente diferentes. Valores consideravelmente diferentes foram observados, também, para o índice de Shannon independente da combinação de primer utilizada e da população avaliada.

Tabela 5. Estimativas de variabilidade genética nas populações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Noroeste e Zona da Mata do estado de Minas Gerais.

Região Noroeste					
Combinação de primers	Número de locos	Na	Ne	h	I
156R e 148F	26	1,73 ± 0,45	1,28 ± 0,35	0,17 ± 0,18	0,27 ± 0,25
36: Super 30R e 36: Super 312L	26	2,0 ± 0,0	1,52 ± 0,25	0,17 ± 0,18	0,50 ± 0,14
148F e 20R	26	1,83 ± 0,38	1,52 ± 0,25	0,20 ± 0,18	0,32 ± 0,25
Região Zona da Mata					
Combinação de primers	Número de locos	Na	Ne	h	I
156R e 148F	23	2,0 ± 0,0	1,24 ± 0,20	0,18 ± 0,10	0,31 ± 0,14
36: Super 30R e 36: Super 312L	23	2,0 ± 0,0	1,59 ± 0,29	0,35 ± 0,12	0,52 ± 0,15

148F e 20R	23	2,0 ± 0,0	1,38 ± 0,27	0,25 ± 0,13	0,40 ± 0,17
------------	----	-----------	-------------	-------------	-------------

Na: número de alelos. **Ne:** número de alelos efetivo. **h:** diversidade gênica de Nei. **I:** índice de Shannon

A AMOVA foi realizada apenas para as populações Noroeste e Zona da Mata, em função do baixo número de isolados analisados para as demais populações. Independente da combinação de primer utilizada nas reações de PCR, praticamente nenhuma variação entre as subpopulações Noroeste e Zona da Mata foi observada (Tabelas 6 e 7, Anexo 3), no entanto, valores altos de variação gênica foram detectados dentro das subpopulações (Tabela 6 e 7). Valores de 99,74% e 100% foram determinados para variação dentro das subpopulações da Zona da Mata e Noroeste, respectivamente quando, utilizou-se o par de primer 156R e 148F (Tabelas 6 e 7). Índices de *Fst*, menores que 0.05, foram estimados, sendo os valores de 0.02620 e -0.02150 determinados para as populações das regiões Zona da Mata e Noroeste, respectivamente (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de subpopulações de *Sclerotinia sclerotiorum* da região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais com base nos dados obtidos pela combinação de primers 156R e 148F

Zona da Mata				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação (%)
Entre subpopulações	3	4,662	0,00403 Va	0,26
Dentro de subpopulações	17	26,100	1,53529 Vb	99,74
Total	20	30,762	1,53932	
(<i>Fst</i>)		0,00262		

GL: graus de liberdade

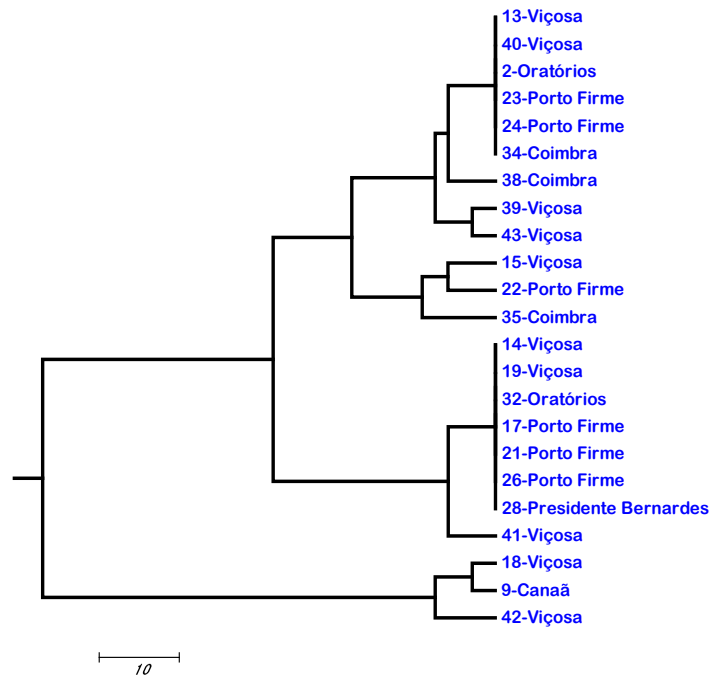
Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre subpopulações de *Sclerotinia sclerotiorum* da região Noroeste do estado de Minas Gerais com base nos dados obtidos pela combinação de primers 156R e 148F.

Noroeste				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação(%)
Entre subpopulações	1	1	-0,02850Va	0,0
Dentro de subpopulações	24	32,500	1,35417Vb	100
Total	25	33,538	1,32567	
(Fst)		-0,02150		

GL: graus de liberdade

Os dados obtidos com base na utilização das três combinações de primers foram utilizados para a análise de agrupamento dos isolados de *S. sclerotiorum* (Figura 3, Anexo 4). A Figura 3 mostra os dendrogramas obtidos para as populações Noroeste e Zona da Mata. Observa-se nos dois dendrogramas, que os isolados procedentes da mesma localidade (cidade) não foram posicionados no mesmo grupo, ou seja, os grupos formados são constituídos de isolados procedentes de diferentes localidades. Resultado semelhante foi obtido para a população Triângulo Mineiro (Anexo 4). Também na população Sul, representada por isolados amostrados em um único sítio de coleta (Ijaci) os mesmos foram distribuídos em grupos distintos (Anexo 4).

A)



B)

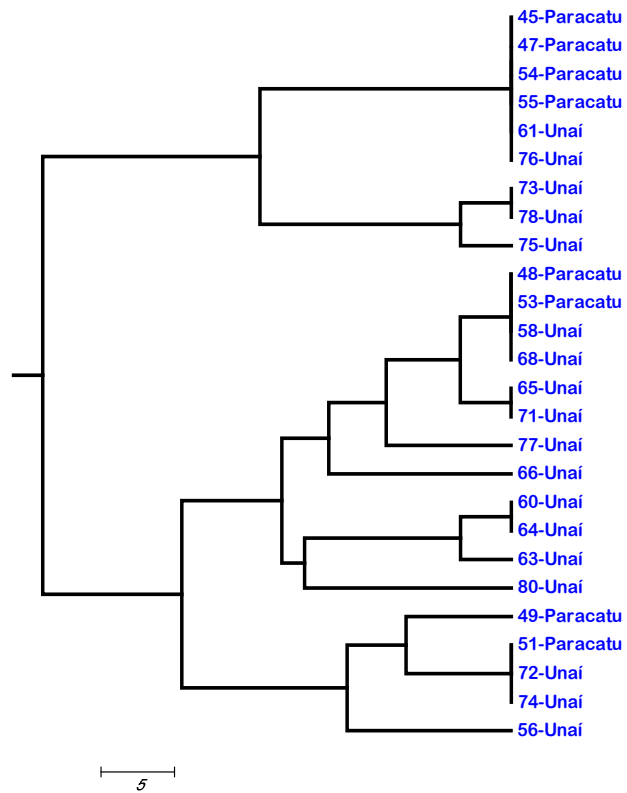


Figura 3. Dendrogramas (UPGMA) obtido por meio da análise do marcador molecular IRAP em isolados de populações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Zona da Mata (A) e Noroeste (B) do estado de Minas Gerais.

4. DISCUSSÃO

Devido à abundância e à forma de amplificação e inserção no genoma, os retrotransposons têm sido utilizados em estudos de diversidade e os resultados mostram que estes elementos são úteis para a discriminação de isolados inter e intra-espécies. Marcas polimórficas decorrentes de inserções polimórficas do transposon no genoma durante sua reprodução podem ser identificadas por meio de técnicas moleculares (SANTANTA et al., 2012). Em estudos com patógenos, uma das técnicas atualmente utilizadas é a IRAP que se baseia na detecção de polimorfismos de regiões inter-retrotransposons (PASQUALI et al., 2007).

A análise de polimorfismo com base em transposons na população de *S. sclerotiorum* amostrada em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, evidencia que a técnica IRAP é eficiente para discriminar genótipos deste patógeno. A alta taxa de polimorfismo somado ao considerável número de haplótipos identificados bem como a presença de um considerável número de haplótipos exclusivos, indicam alta variabilidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum*. O compartilhamento de haplótipos em cada região amostrada observado tanto dentro como entre as subpopulações avaliadas é um indicativo de ocorrência de fluxo gênico entre os isolados. Compartilhamento de haplótipos dentro e entre subpopulações de *S. sclerotiorum* foi observado, também, por ATALLAH et al (2004) ao avaliarem, com base em microssatélites, 167 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em quatro regiões produtoras de batata (sítios de coleta) no norte dos Estados Unidos.

O alto nível de variabilidade genética estimados para as populações de *S. sclerotiorum* avaliadas no presente estudo parece ser característico desta espécie, considerando que este nível de variabilidade tem sido relatado, também, para populações deste patógeno procedentes de outras regiões brasileiras (GOMES et al., 2011) e de outros países (SEXTON e HOWLETT, 2004) utilizando microssatélites como marcadores moleculares.

Os altos valores de diversidade gênica (índices de Nei) e de diversidade genotípica (haplotípica) (índice de Shannon), estimados para as populações analisadas sustentam a alta diversidade genética de *S. sclerotiorum*. Esta alta diversidade pode ser reflexo de um grande número de haplótipos exclusivos identificados nas populações de *S. sclerotiorum*, bem como de possíveis mutações com conseqüente introdução de novos genótipos. Estudos anteriores com *S. sclerotiorum*, têm também detectado, grande número de haplótipos exclusivos nas populações avaliadas (SEXTON e HOWLETT, 2004 e LEHNER, 2011). Os mesmos isolados analisados no presente estudo, foram analisados por LEHNER em 2011, porém, com base em marcadores microssatélites. Nossos resultados são concordantes com os de LEHNER (2011) que estimou valores altos de diversidade genotípica e haplotípica. GOMES et al. (2011) em seu trabalho com isolados *S. sclerotiorum* no Cerrado brasileiro, amostrados em quatro regiões produtoras de feijão sob sistema de irrigação, detectaram alta diversidade genética (79 isolados foram investigados, 102 haplótipos foram identificados e valores de 0,65 a 0,91 foram estimados para diversidade alélica com base em dados de microssatélites). Da mesma forma, SEXTON e HOWLETT (2004) analisaram a diversidade de *S. sclerotiorum* procedente da Austrália, e os resultados foram relativamente altos (82 haplótipos foram detectados e as diversidades genotípica e gênica variaram de 36 a 80% e 0,23 a 0,79, respectivamente).

Os dados da AMOVA realizada individualmente para as populações Zona da Mata e Noroeste, mostram variações acima de 90%

dentro das subpopulações do Noroeste e da Zona da Mata. Somado aos baixos valores de F_{st} , que inclui um valor negativo ($F_{st}=-0.02150$ para subpopulações do Noroeste), estes dados indicam que as subpopulações analisadas não estão geneticamente estruturadas, o que sugere ocorrência de fluxo gênico intrapopulacional, permitindo que compartilhem material genético. Segundo KOHLI et al. (1992) a variabilidade em populações de *S. sclerotiorum* pode ser mantida por diversos fatores tais como: mutação, fluxo gênico, recombinação sexual e seleção transitória. LEHNER (2011) sugere que em Minas Gerais, o fluxo gênico, entre as regiões amostradas é, possivelmente, um mecanismo que mantém a diversidade na população de *S. sclerotiorum*. LEHNER (2011) ressalta que por ser um fungo homotático é de se esperar maior variabilidade dentro das populações, outro fator e a maior chance de ocorrer recombinação entre os indivíduos que estão mais próximos geograficamente.

A possível ausência de estruturação dentro das subpopulações analisadas foi consistente com os resultados obtidos por GOMES et al. (2011) que analisou a diversidade deste patógeno dentro e entre áreas de plantação de feijão sob sistema de irrigação e separadas a uma distância de 10 a 50 Km. Neste estudo, embora o valor de F_{st} tenha sido considerado alto ($F_{st}=0,28793$), 71,21 % de variação foi estimada dentro e 28,79 entre as áreas amostradas, indicando alto nível de fluxo gênico intrapopulacional. Ausência de estruturação genética com possível ocorrência de fluxo gênico na população não é característico apenas em *S. sclerotiorum* do Brasil. SEXTON e HOWLETT (2004), por exemplo, ao analisarem populações *S. sclerotiorum* da Austrália amostradas em duas áreas de plantação de canola no sul dos estados de Victoria (50 Km de distância entre as áreas amostradas) e duas no sul de New South Wales (35 Km de distância entre as áreas amostradas) identificaram maior variação genética dentro das populações (79.4%) sendo apenas de 20,6%, a variação entre as populações dentro de cada estado. Os baixos valores de F_{st} (0,1 entre as populações do sul de Victoria e de 0,09 entre

as do sul do SWS) reforçam estes dados. Resultado semelhante foi obtido por ATALLAH et al (2004) ao avaliarem a estrutura genética de 167 isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões do norte dos Estados Unidos. Neste estudo os autores relatam que mais de 92% da variabilidade foi atribuída à variabilidade dentro dos sítios amostrados.

A não distribuição dos isolados *S. sclerotiorum* das subpopulações do Noroeste, bem como das subpopulações da Zona da Mata em grupos distintos observada nos dendrogramas UPGMA reforçam os dados da AMOVA que indicam ausência de estruturação genética nestas duas regiões.

De acordo com CUBETA et al. (1997) os ascósporos podem ser dispersos pelo ar a uma distância de 3 a 4 Km e BIANCHINI et al. (2005) relatam que o transporte de escleródios pode ocorrer por meio de sementes e água de irrigação. Considerando que o transporte de sementes de uma área de plantio a outra é uma prática comum, sementes contaminadas com escleródios podem ser transportadas o que significa que a atividade humana constitui uma prática relevante para o estabelecimento do padrão de distribuição da diversidade observado na maioria dos estudos com *S. sclerotiorum*

O presente trabalho é o primeiro estudo relatado sobre análise de diversidade *S. sclerotiorum* com base em transposons. Os dados obtidos poderão, juntamente com outros, contribuir para a implementação de estratégias de controle e manejo do mofo-branco. Assim, este estudo é importante para os programas de melhoramento genético do feijoeiro, por fornecer informações acerca da distribuição da variabilidade genética nas populações de *S. sclerotiorum*, este dado é essencial para obtenção de cultivares resistentes ao mofo-branco. No entanto, conforme recomendado por Lehner (2011), a alta variabilidade de *S. sclerotiorum* implica em maiores cuidados quanto à seleção de materiais resistentes a esta doença, que deve ser realizada com isolados de diferentes regiões a fim de minimizar o risco de suplantação de resistência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATALLAH, Z. K.; LARGET, B.; CHEN, X.; JOHNSON, D. A. 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology** 94:737-742.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A (ed). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: ed Ceres, 2005, p. 333-349.
- CUBETA, M. A.; CODY, B.R.; KHOLI, Y.; KHON, L. M. 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology** 87:1000-1004.
- DOYLE J.J.; DOYLE J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- EXCOFIER, I.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2006. ARLEQUIM ver 3.01. An integrated software package for population genetics data analyses. Computacional and molecular population genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne.
- GOMES, E. V.; NASCIMENTO, L. B.; FREITAS, M. A.; NASSER, L. C. B.; PETROFEZA, S. 2011. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology** 159: 95-99.
- HILL, M. O. 1973. Diversity evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology** 54: 427-432.
- KALENDAR, R.; GROB. T.; REGINA, M.; SUONIEME, A.; SCHULMAN, A.1999. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprint techniques. **Theoretical and Applied Genetics** 98:704-711.
- KOHLI, Y.; MORRALL, R. A. A.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. 1992. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. **Phytopathology** 82: 875-880.
- LEHNER, M.S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoads de Minas Gerais**. 2011. 33p. (Dissertação

em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. The Macmillan, London, UK, 1979, 839 p.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 70: 3321-3323.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. 2007 Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. **Phytopathology** 97: 987-996.
- PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. N. 2004. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 967-975.
- SANTANA, M. F.; ARAÚJO, E. F.; SOUZA, J. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; QUEIROZ, M. V. 2012. Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Moniliophthora perniciosa*. **Euro Journal Plant Pathology** 10: 1007-1060.
- SCHULMAN, A. H.; FLAVELL A. J.; ELLIS, T. H. 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. **Methods Molecular Biology** 260:145–17.
- SEXTON, A. C.; HOWLETT B. J. (2004). Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics** 46: 357-365.
- WAUGH, R.; MCLEAN, K.; FLAVELL A.J.; PEARCE, S. R.; KUMAR, A.; THOMAS B. B.; POWELL, W. 1997. Genetic distribution of BARE-1 retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequencespecific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular Genetics and Genomics** 253:687–694
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358-1370.
- WICKER, T.; SABOT, F.; HUAN-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MOGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. K. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable. **Nature Reviews** 8: 973-982.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. 1999. POPGENE. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada.

ZANOTTI, M.G.S.; SANTOS, J. K.; REIS, K. C. P.; ARAÚJO, E. F.; DHINGRA, O. D.; QUEIROZ, M. V. 2005. Distribuição do elemento transponível *impala* em isolados de *Fusarium oxysporum* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 30: 244-249.

CONCLUSÕES GERAIS

Dois elementos retrotransponíveis foram identificados no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum*, os elementos *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS* que pertencem aos grupos *Ty1/copia* e *Ty3/gypsy*, respectivamente. Nesses elementos, estão presentes quase todas as proteínas que compõem um retrotransposon (LTR).

Foram encontradas sequências referentes à LTR-Solo e TRIM para os dois retrotransposons identificados. A presença dessas sequências de elementos transponíveis (ETs) indica que possivelmente eventos de recombinações ectópicas são ou foram importantes modeladores do genoma de *S. sclerotiorum*, sendo uma evidência que o genoma desta espécie está em constante reestruturação.

O mecanismo RIP de inativação dos ETs foi detectado no genoma de *S. sclerotiorum*. Se por um lado, a presença desse mecanismo pode introduzir aumento de códons de terminação TAA e TAG e, dessa forma, silenciar genes; por outro, as mutações causadas por RIP em sequências duplicadas podem levar à formação de novos alelos com diferentes funções contribuindo, assim, para o processo evolutivo dessa espécie.

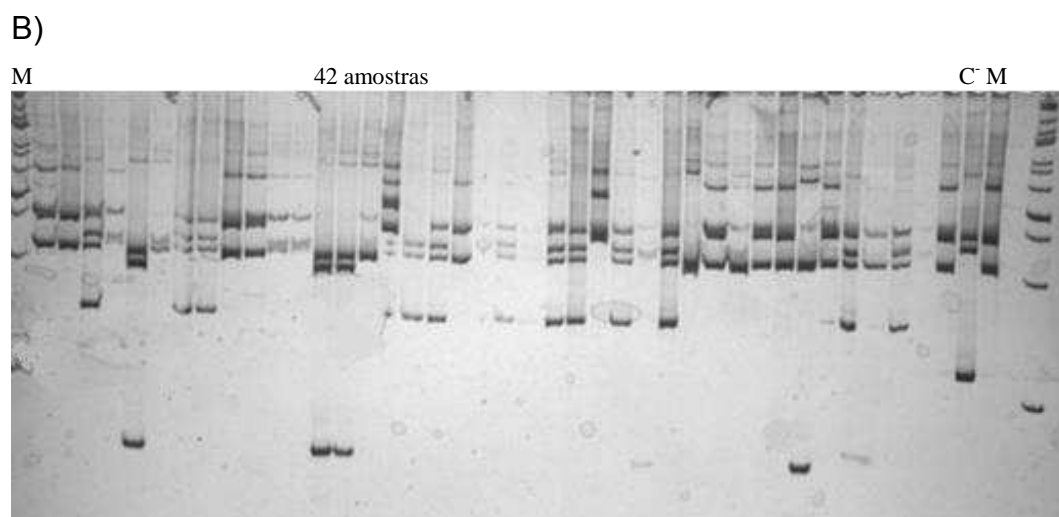
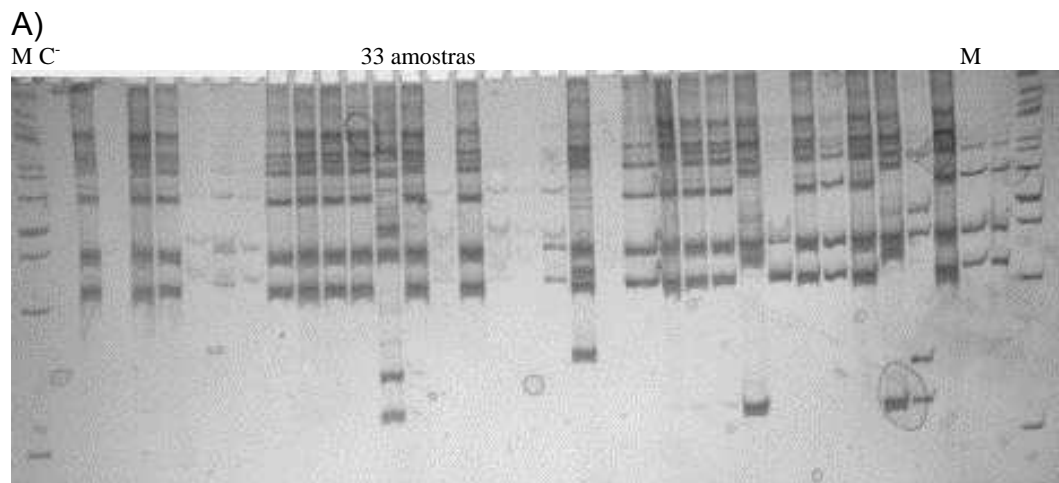
Devido ao grande número de cópias de LTR-Solo e elementos TRIMs referentes aos retrotransposons *Copia-LTR_SS* e *Gypsy-LTR_SS*, estes elementos mostraram alto potencial para ser utilizado em análises de variabilidade genética. O marcador molecular IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) foi eficiente para identificar marcas polimórficas no genoma de *S. sclerotiorum* permitindo assim o estudo de variabilidade genética neste fungo.

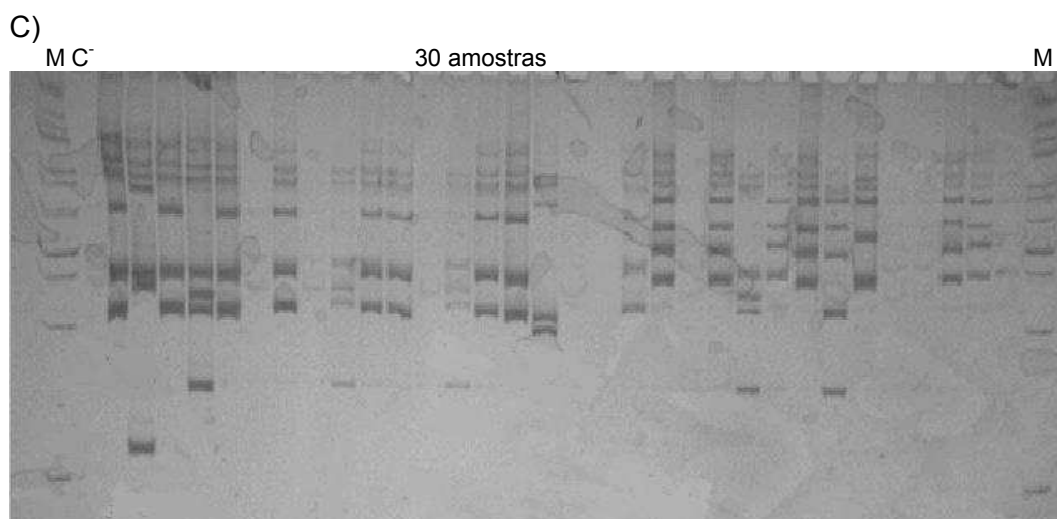
Foram detectados valores altos de diversidade gênica e genotípica nas populações de *S. sclerotiorum*; os valores de *F_{st}* indicaram que as populações analisadas de *S. sclerotiorum* não estão geneticamente estruturadas. Os valores de AMOVA indicaram uma maior variação genética dentro do que entre as subpopulações (sítios de coleta).

Por fim, evidências de grande remodelagem no genoma, bem como, a alta variabilidade haplotípica encontrada, demonstram que *S. sclerotiorum* possui grande variabilidade genética e, portanto, pode permitir a este patógeno uma melhor adaptabilidade às condições ambientais e a diferentes hospedeiros.

ANEXOS

Anexo1. Perfis eletroforéticos em géis de poliacrilamida a 10% do produto de amplificação do DNA com base na combinação de primer 156R e 148F para os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* de todas as regiões geográficas analisadas: Zona da Mata (A), Noroeste (B), Triângulo Mineiro e Sul (C). Marcador de tamanho molecular de 1Kb.





Anexo 2. Estimativas de variabilidade genética nas populações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Triângulo Mineiro e Sul do estado de Minas Gerais.

Região Triângulo Mineiro					
Combinação de primers	Número de locos	Na	Ne	h	I
156R e 148F	5	1,25 ± 0,44	1,14 ± 0,26	0,08 ± 0,15	0,13 ± 0,24
36: Super 30R e 36: Super 312L	5	1,68 ± 0,47	1,68 ± 0,47	0,23 ± 0,17	0,36 ± 0,25
148F e 20R	5	1,36 ± 0,49	1,21 ± 0,31	0,19 ± 0,17	0,27 ± 0,25
Região Sul					
Combinação de primers	Número de locos	Na	Ne	h	I
156R e 148F	9	1,65 ± 0,48	1,33 ± 0,34	0,20 ± 0,18	0,31 ± 0,26
36: Super 30R e 36: Super 312L	8	1,48 ± 0,50	1,28 ± 0,39	0,15 ± 0,20	0,23 ± 0,29
148F e 20R	8	1,81 ± 0,39	1,46 ± 0,34	0,27 ± 0,17	0,42 ± 0,23

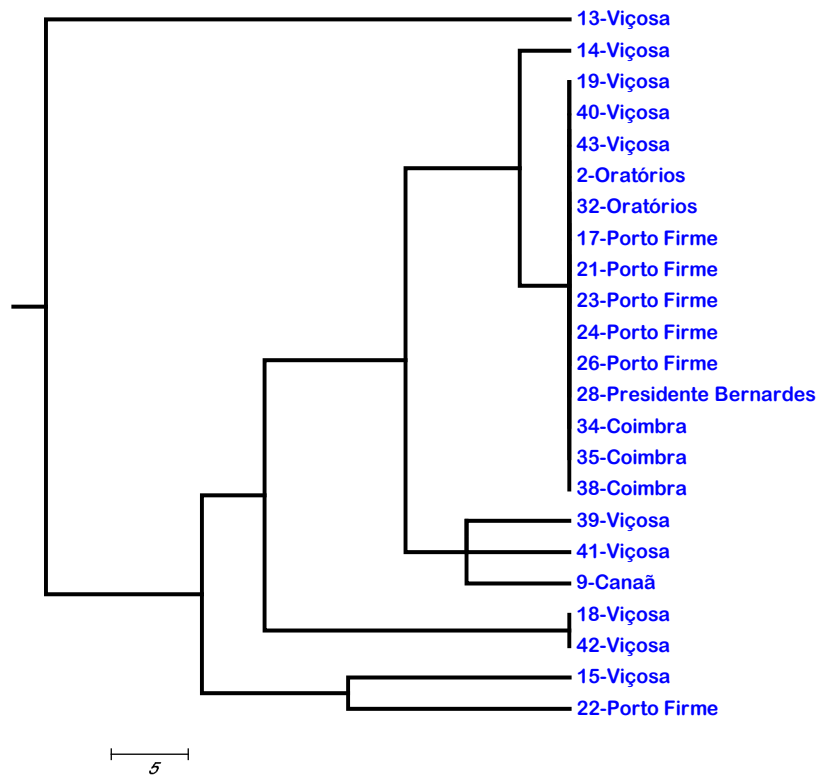
Anexo 3. Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre subpopulações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Zona da Mata e Noroeste do estado de Minas Gerais com base nos dados obtidos para as seguintes combinações de primers: 36: Super 30R e 36: Super 312L ; 148F e 20R.

Zona da Mata				
36: Super 30R e 36: Super 312L				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	3	15,033	0,25607Va	7,28
Dentro de subpopulações	16	52,167	3,26042Vb	92,72
Total	19	65,200	3,51649	
(Fst)		0,07282		
Noroeste				
36: Super 30R e 36: Super 312L				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	1	3,207	0,06145Va	2,37
Dentro de subpopulações	24	60,639	2,52662Vb	97,63
Total	25	63,846	2,58807	
(Fst)		0,02374		
Zona da Mata				
148F e 20R				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	3	4,662	0,00403Va	0,26
Dentro de subpopulações	17	26,100	1,53529Vb	99,74
Total	20	30,762	1,53932	
(Fst)		0,00262		
Noroeste				
148F e 20R				
Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	1	1,380	0,01030Va	0,81
Dentro de subpopulações	24	30,389	1,26620Vb	99,19
Total	25	31,769	1,27651	

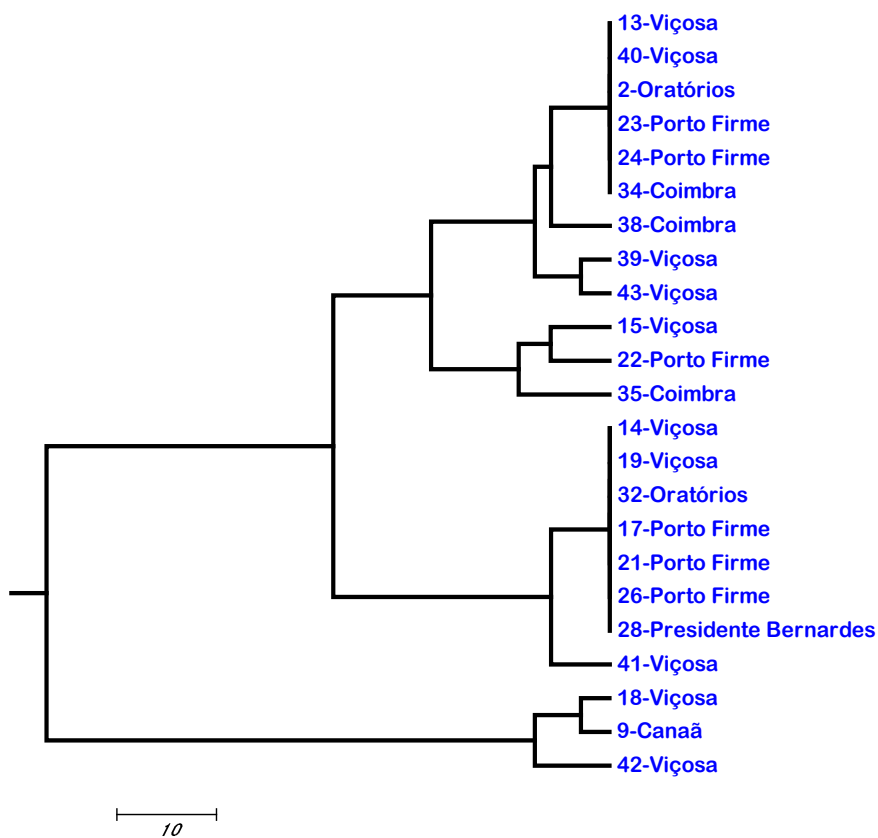
Anexo 4. Dendrogramas (UPGMA) obtido por meio da análise do marcador molecular IRAP em isolados de populações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Zona da Mata, Noroeste, Triângulo Mineiro e Sul do estado de Minas Gerais para todas as combinações de primers: **A:**156R e 148F; **B:** 36: Super 30R e 36: Super 312L; **C:**148F e 20R.

Região: Zona da Mata

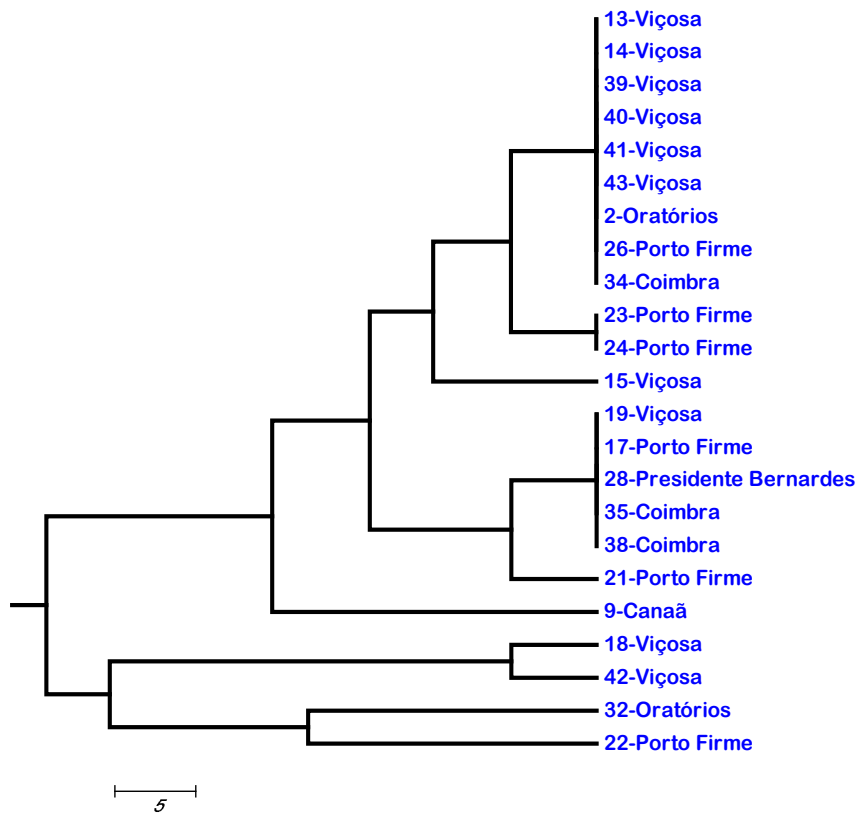
Combinação de Primer A



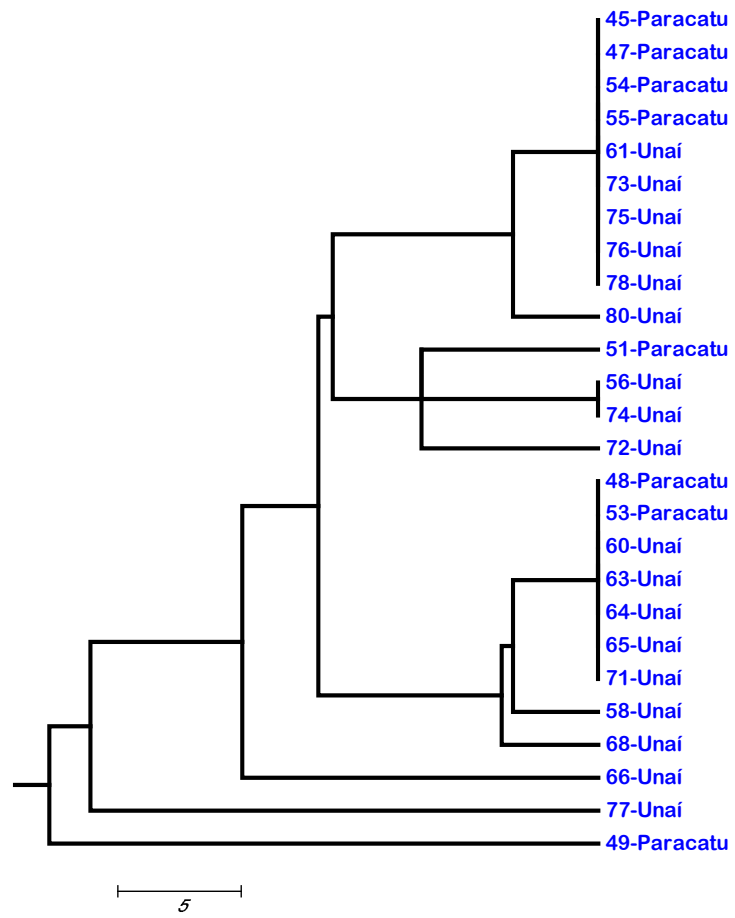
Combinação de Primer B



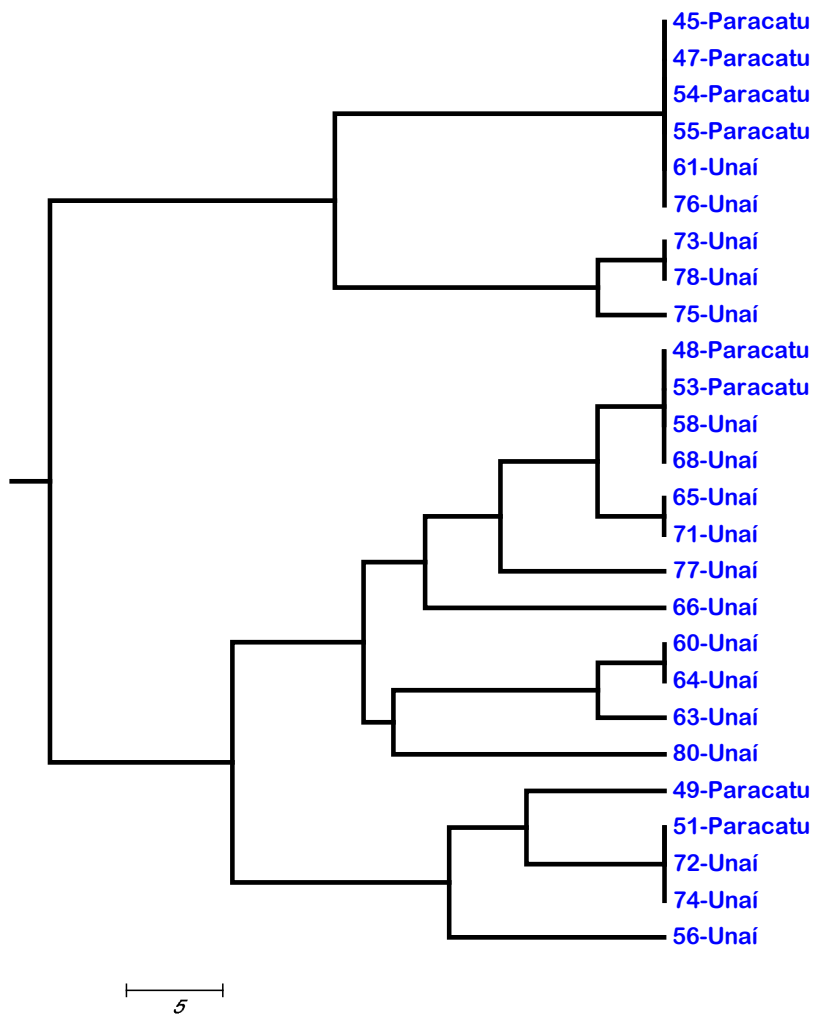
Combinação de Primer C



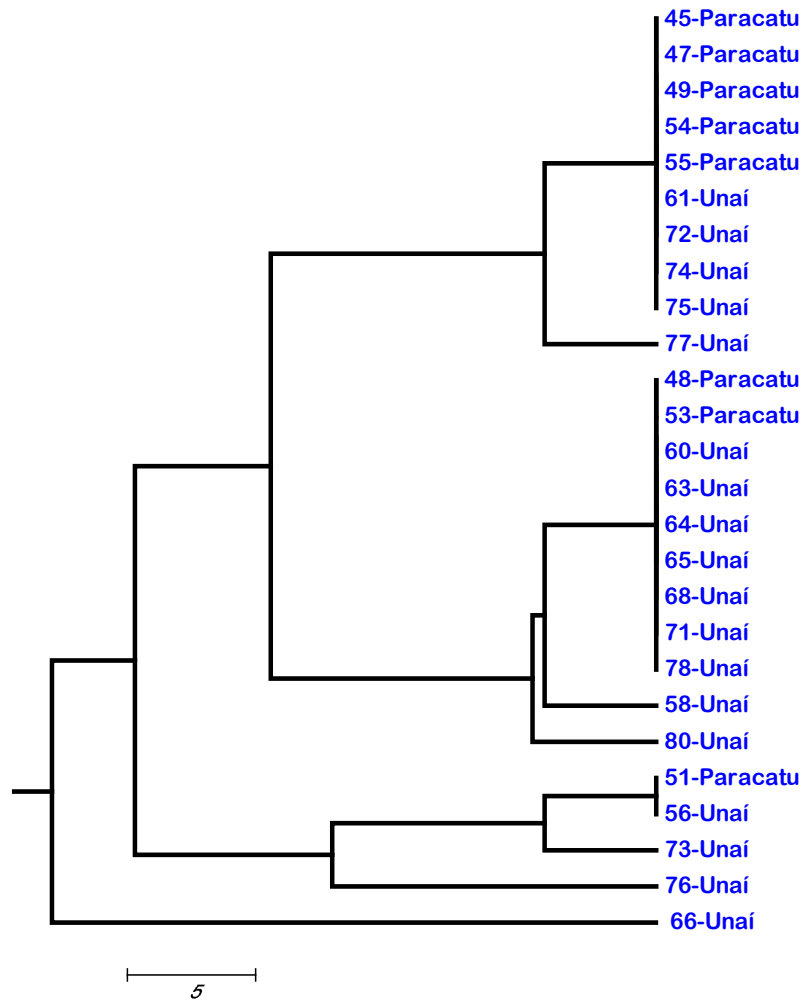
Região: Noroeste
Combinação de Primer A



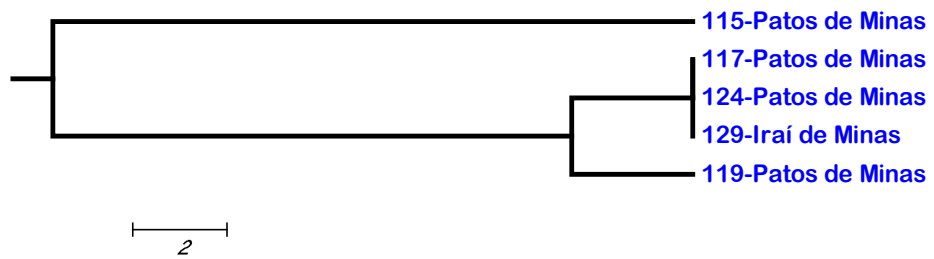
Combinação de Primer B



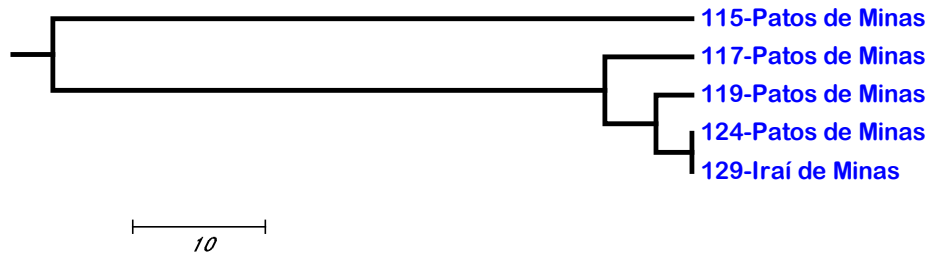
Combinação de Primer C



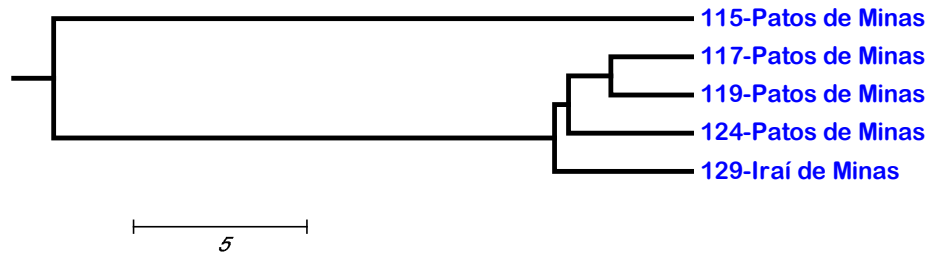
Região: Triângulo Mineiro
Combinação de Primer A



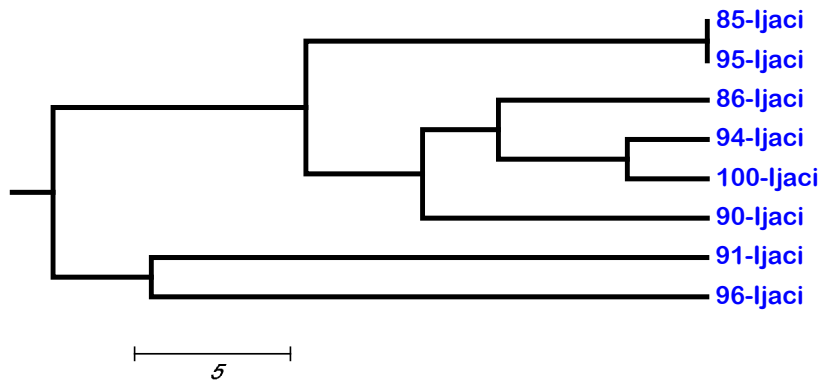
Combinação de Primer B



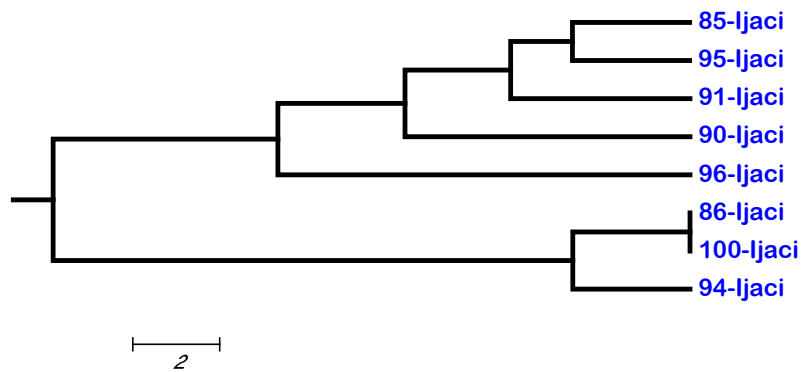
Combinação de Primer C



Região: Sul
Combinação de Primer A



Combinação de Primer B



Combinação de Primer C

