

SIMONE ALBINO PAES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *GEOTRICHUM* spp.
ASSOCIADOS A PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM FRUTAS E
HORTALIÇAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P126d
2016 Paes, Simone Albino, 1980-
Diversidade genética de isolados de *Geotrichum* spp.
associados a podridões pós-colheita em frutas e hortaliças
no Brasil / Simone Albino Paes. - Viçosa, MG, 2016.
x, 32f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Olinto Liparini Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Geotrichum* - Genética. 2. Frutas - Perdas
pós-colheita. 3. Hortaliças - Perdas pós-colheita.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.563

SIMONE ALBINO PAES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *GEOTRICHUM* spp.
ASSOCIADOS A PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM FRUTAS E
HORTALIÇAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 23 de fevereiro de 2016.



Danilo Batista Pinho
(Coorientador)



Ana Paula Sato Ferreira



Olinto Liparini Pereira
(Orientador)

Dedico,
Especialmente à minha família que soube entender minha ausência e à
minha querida afilhada Alicy Vitória Oliveira Costa que mora no meu
coração.

“A persistência é o caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus que tem me guiado por caminhos bons e nunca me desamparou até aqui. Sempre me atendeu quando clamei por socorro e as pessoas do bem surgiram para me auxiliar. É realmente difícil agradecê-lo depois de anos de muita misericórdia prestada a meu favor. Nunca me deixou faltar nada.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Ailton Reis pela generosidade e disponibilidade em enviar os isolados fúngicos. Obrigada por contribuir para o sucesso deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFV, pela dedicação, disposição e ensinamentos, o meu reconhecido e carinhoso agradecimento. Em especial ao professor Olinto Liparini Pereira, pela orientação, por ter me acolhido e pela confiança, apoio e oportunidade de trabalharmos juntos. Um agradecimento pela competência, paciência e compreensão. Sempre criando um clima de amizade e bom relacionamento e pronto a ajudar.

Ao meu co-orientador professor Danilo Batista Pinho, pela colaboração na condução dos trabalhos, por ser incentivador na superação das minhas dificuldades. E também à Ana Paula Sato Ferreira pelas sugestões; em especial a ambos pela participação na banca examinadora e pelo conhecimento transmitido.

Este trabalho é dedicado especialmente aos meus pais, Maria do Rosário Albino Paes e Helvécio Paes de Oliveira, por serem modelos de coragem, que mesmo distantes me enviaram boas energias através de orações e por acreditarem em mim que seria possível superar os obstáculos.

Aos meus irmãos Kely, Mônica, Alessandro e Sirlaine pelo apoio incondicional e constante me incentivando mesmo distante. Obrigada pelo carinho e companheirismo.

Aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas por me proporcionar momentos de alegria mesmo diante de tanto sufoco.

Aos amigos de longa data e àqueles conquistados durante o mestrado. Obrigada pela força, incentivo e solidariedade.

Aos amigos do laboratório André Rosado, André Gomes, Alexandre, Pricilla, Vanessa, Athus, Lucas e Fábio, pela amizade e agradável convivência e por toda e qualquer ajuda que me deram com palavras de encorajamento e boas sugestões.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de entusiasmo e estudos compartilhados.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram ou torceram e me brindaram com inesquecíveis apoios em distintos momentos para que este trabalho pudesse ser concluído.

Ninguém vence sozinho...

Obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Simone Albino Paes, filha de Helvécio Paes de Oliveira e Maria do Rosário Albino Paes, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em março de 2009 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais.

Durante todo o período da graduação foi estagiária e bolsista de iniciação científica no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, sob a orientação da Professora Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti. Neste mesmo laboratório acompanhou e desenvolveu projetos nas linhas de pesquisa sobre produção de material de referência microbiológico e sobre a interferência da bovicina na adesão da *Salmonella enteritidis* à casca de melão.

Em 2014 graduou-se em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa - UFV, e em março de 2014 iniciou o curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola no nível do mestrado, sob a orientação do Professor Olinto Liparini Pereira, com ênfase na taxonomia e filogenia molecular de fungos fitopatogênicos, submetendo-se à defesa da dissertação em 23 de fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Marcadores microssatélites (SSR).....	8
2.2 Marcadores IRAPs.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Obtenção dos isolados	11
3.2 Extração do DNA genômico.....	13
3.3 Análise de diversidade genética	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

1. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade 19 jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando a combinação dos oligonucleotídeos CIIRAP1 e CIIRAP4.
2. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade 20 jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando a combinação dos oligonucleotídeos CIIRAP2 e CIIRAP4.
3. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (CAG)⁵. 21
4. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GA)⁸. 22
5. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GACAC)³. 23
6. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (TGTC)⁴. 24
7. Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GATA)⁴. 25

LISTA DE TABELAS

- | | |
|---|----|
| 1. Isolados fúngicos de <i>Geotrichum</i> sp. utilizados na análise de diversidade genética. | 11 |
| 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar parte dos genes da região ISSR e transposon. | 14 |

RESUMO

PAES, Simone Albino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Diversidade genética de isolados de *Geotrichum* spp. associados a podridões pós-colheita em frutas e hortaliças no Brasil.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Coorientador: Danilo Batista Pinho.

A podridão azeda causada pelo fungo *Geotrichum* é uma doença pós-colheita que ocorre em frutas e hortaliças. Visando caracterizar a diversidade genética de *Geotrichum* sp. para a escolha de estratégias de controle eficientes, este trabalho tem o objetivo de avaliar diferentes marcadores ISSRs e IRAPs para determinação da diversidade intra específica de *Geotrichum*. No total, 62 isolados de locais geograficamente distintos e diferentes hospedeiros foram utilizados neste estudo. Para a análise de diversidade genética, o DNA genômico foi extraído a partir do micélio. A região parcial dos genes que compreende o ISSR e transposon foram amplificadas usando sete oligonucleotídeos. A partir dos perfis de bandas foi construída uma matriz binária a qual foi adicionada ao software PAST3 onde o índice de similaridade de Jaccard foi calculado para cada combinação de duas amostras. Os dendrogramas foram construídos com base na matriz de similaridade de acordo com o método das médias aritméticas de grupos não ponderados (UPGMA- unweighted pair group method with arithmetic averages). Em todos marcadores moleculares analisados foram encontrados pelo menos um clado representado por dois ou mais isolados que apresentaram perfis idênticos. Existe uma tendência de isolados de um mesmo hospedeiro ou região geográfica serem semelhantes quando foi utilizado diferentes marcadores moleculares. Não houve semelhança entre os isolados quando os oligonucleotídeos IRAPs e microssatélites foram comparados pois o número de clados formados pelos marcadores IRAPS foram menores. *Geotrichum* possui grande diversidade genética e, portanto, pode permitir a este patógeno uma melhor adaptabilidade às condições ambientais e a diferentes hospedeiros.

ABSTRACT

PAES, Simone Albino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Genetic diversity of isolated *Geotrichum* spp. associated with rots post-harvest in fruit and vegetables in Brazil.** Advisor: Olinto Liparini Pereira. Co-advisor: Danilo Batista Pinho.

The sour rot caused by fungus *Geotrichum* genus is a disease that occurs in fruits and vegetables. In order to characterize the genetic diversity of *Geotrichum* sp. for the choice of efficient control strategies, this study aims to evaluate different ISSRs and IRAPs markers for determination of intraspecific diversity of *Geotrichum*. A total of 62 isolates from geographically different locations and different hosts were used in this study. For the analysis of genetic diversity, genomic DNA was extracted from the mycelium. The partial region of the genes comprising the ISSR and transposon were amplified using seven primers. From the bands profiles was built a binary matrix which were added to PAST3 software where the Jaccard similarity index was calculated for each combination of two samples. The dendrograms were constructed based on the similarity matrix according to the method of arithmetic averages of unweighted groups (UPGMA- unweighted pair group method with arithmetic averages). In all molecular markers analyzed were found at least one clade represented by two or more isolates that showed identical profiles. Strains not grouped according to the town which were isolated. There is a tendency of isolates from the same host or geographic region are similar when we used different molecular markers. There were not similarities between the isolated when IRAPs and microsatellite primer were compared because the number of clades formed by IRAPS markers were lower. *Geotrichum* has high genetic diversity and therefore may allow the pathogen better adaptability to environmental conditions and the different hosts.

1. INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças no Brasil está em torno de 17,5 mil toneladas/ano, sendo $\frac{3}{4}$ dessa produção concentrada na região Sul e Sudeste. Este setor movimenta anualmente 12 milhões de reais (Anuário de horticultura, 2014). Embora exista uma diversidade de produtos hortícolas para comercialização, ainda existe uma limitação quanto às vendas devido serem altamente perecíveis.

Já no setor de fruticultura, o Brasil possui uma área cultivada de 2.700.528 milhões de hectares, com uma produção aproximada de 43 milhões de toneladas/ano, gerando um valor anual de 16,5 bilhões de reais. O setor frutícola é responsável pela geração de mais de 5 milhões de empregos diretos, o equivalente a 34% da força de trabalho no meio rural (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2014; Agriannual, 2015).

A fruticultura é praticada em todas as regiões brasileiras, sendo que a região sudeste ocupa a primeira posição nacional com uma produção anual de aproximadamente 23.424 toneladas (IBGE, 2013; Embrapa Fruticultura, 2014).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, sendo superado apenas pela China e Índia, com uma produção mundial correspondente a 6,3% (FAO, 2013). Entretanto em relação à exportação, o Brasil não aparece na lista dos maiores exportadores de frutas e um dos desafios que o Brasil enfrenta com relação a isso é a qualidade na pós-colheita.

Em nível nacional são registrados altos níveis de perdas pós-colheita em cultivos de frutas e hortaliças, o que o coloca entre os 10 países que mais desperdiçam alimentos no mundo. As perdas geradas entre a colheita e a mesa do consumidor são consideradas muito elevadas, atingindo em média 40% do total produzido (Val, 2015). Para a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, FAO, a população mundial se encontra em um nível elevado de insegurança alimentar, pois um terço dos alimentos produzidos para consumo humano (cerca de 1,7 bilhões de toneladas) é perdido ou desperdiçado em todo o mundo.

As perdas pós-colheita podem ocorrer devido a doenças, injúrias mecânicas e perdas fisiológicas. Pesquisas devem ser conduzidas para que estas perdas sejam minimizadas aumentando a oferta de produtos, além de evitar desperdícios de investimentos financeiros e de tempo gasto na produção. As injúrias mecânicas por si só, não inviabilizam o consumo das frutas e hortaliças, mas podem servir de porta de entrada a patógenos predispondo-as a doenças pós-colheita. Neves Filho et al., (2007) afirmam que se as perdas pós-colheita atingirem níveis indesejáveis não valerá a pena produzir.

As etapas de manuseio durante a colheita e pós-colheita são importantes para manter a vida útil de frutas e hortaliças. Operações realizadas inadequadamente podem predispor os produtos hortifrutícolas às infecções causadas por micro-organismos que se desenvolvem nos tecidos que tenham sofrido algum dano mecânico.

A redução das perdas em pós-colheita na cadeia de comercialização das frutas representa um constante desafio, já que estas apresentam alto teor de água e nutrientes e, mesmo depois de colhidas, mantêm processos biológicos em atividade, o que as predispõem a ocorrência de doenças pós-colheita (Wilson et al., 1994). Baseado neste contexto, pesquisas voltadas à prevenção de ataque de patógenos em pós-colheita de produtos agrícolas se mostram de grande importância.

A produção de frutas e hortaliças no Brasil tem sido limitada por vários fatores, principalmente devido o ataque de doenças. Além das doenças que ocorrem no campo, as doenças ocorridas em pós-colheita, têm causado enormes perdas por comprometer a comercialização de alimentos.

O ataque por micro-organismos em pós-colheita pode ser por bactérias e fungos (Chitarra e Chitarra, 2005). As bactérias e os fungos atacam frutas e hortaliças levando à deterioração do produto e conseqüentemente a sua desvalorização comercial. Entre estes micro-organismos os fungos destacam-se como agentes das podridões de frutas e hortaliças, sendo o grupo de maior frequência e atividade responsável por 80 a 90% do total de perdas (Gullino, 1994).

Diversas doenças pós-colheita podem ocorrer em frutas e hortaliças, a exemplo da podridão azeda causada por *Geotrichum* spp.

Essa doença caracteriza-se inicialmente por pequenas áreas com encharcamento e amolecimento do tecido, com posterior aparecimento dos sinais do patógeno, caracterizado pela formação de um micélio esbranquiçado na superfície do produto. O produto torna-se apodrecido, com odor etílico e impróprio para a comercialização e consumo. No Brasil, tem sido observado um aumento da ocorrência de prodridação azeda em frutas e hortaliças em diversos estados.

Estudos relativos à caracterização do patógeno são necessários, para posterior estabelecimento de estratégias de manejo dessa importante doença pós-colheita. Portanto, visando caracterizar a diversidade genética de *Geotrichum* sp. para a escolha de estratégias de controle eficientes, este trabalho tem o objetivo de avaliar diferentes marcadores ISSRs e IRAPs para determinação da diversidade intra específica de *Geotrichum*; verificar os clados formados em cada marcador e verificar se os mesmos isolados agruparam em um mesmo clado usando marcadores diferentes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Geotrichum sp. é pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales e Família Dipodascaceae (Alper et al., 2011).

Geotrichum é um gênero de levedura dimórfica que exhibe comumente colônias de coloração creme (Alper et al., 2011), sendo morfológicamente caracterizado pela presença de artroconídios formados em cadeias pela fragmentação aleatória de hifas (Hoog et al., 1986). Os anamorfos estão associados com dois gêneros teleomorfos, *Galactomyces* e *Dipodascus*. *Galactomyces* engloba a espécie-tipo de *Geotrichum*, *Geotrichum candidum* (Hoog et al., 2004). *Geotrichum candidum* é o anamorfo de *Galactomyces geotrichum*, antigamente denominado de *Galactomyces geotrichum* (Hoog et al., 1998, Gente et al., 2006).

O gênero *Geotrichum* possui onze espécies até o ano de 1998, sendo que cinco espécies têm o teleomorfo no gênero *Dipodascus* e duas no gênero *Galactomyces*. E quatro espécies de *Geotrichum* não têm a fase sexual conhecida (Hoog et al., 1998).

A partir de 1998, novas espécies tem sido proposta (Naumova et al., 2001; Hoog et al., 2004). A comparação da sequência de DNA permitiu descrever algumas espécies novas como *Geotrichum silvícola* (Pimenta et al., 2005), *Geotrichum vulgare* (Wuczkowski et al., 2006), *Geotrichum brydzae* (Sulo et al., 2009), *Geotrichum carabidarum*, *Geotrichum histeridarum*, *Geotrichum cucujoidarum* (Suh et al., 2006).

O fungo *Galactomyces* possui importância na indústria de alimentos, porém algumas estirpes são patógenos de plantas e podem está associados com doenças pulmonares em humanos (Naumova et al., 2001).

O gênero *Geotrichum* inclui espécies que podem ser encontradas em vários ambientes incluindo solos, leite, água e como patógenos de plantas (Alper et al., 2011). Algumas espécies são conhecidas por estarem associadas com insetos (Suh et al., 2006). Além disso, algumas espécies podem estar associadas às doenças do sistema respiratório e

trato-gastrointestinal de humanos, causando infecções oportunistas, chamadas de *Geotricose* (Hoog et al., 2004; Alper et al., 2011; Gente et al., 2002).

Geotrichum candidum também pode causar infecções micóticas esporádicas em espécies animais durante o inverno quando as vacas são geralmente alimentadas com grandes quantidades de feno (Knudtson et al., 1992). As infecções podem está associadas com lesões de pele e pulmão em feto bovino abortado (Antoniassi et al., 2013). E também associadas com lesões de pele em cavalos (Figueredo et al., 2011).

Embora *Geotrichum candidum* causa deterioração em vários alimentos e causa perdas econômicas, este fungo é utilizado como cultura adjunta na produção de queijos, devido à capacidade proteolítica e aromática e por ser parte da microbiota natural de leite cru, comumente utilizado para impulsionar a maturação de queijos tipo Camembert (Alper et al., 2011; Gente et al., 2006, Gente et al., 2002; Marcelino et al., 2001). Esta espécie juntamente com outra espécie como o *Penicillium camemberti* são principais contribuintes para a textura e sabor da casca do queijo. *Geotrichum candidum* reduz a amargura de queijos Camemberts industriais devido atividade de aminopeptidases que hidrolizam peptídeos de baixo peso molecular originados pela degradação da β -caseína produzida por *Penicillium camemberti* (Lessard et al., 2014, Marcelino et al., 2001, Molimard et al., 1995).

Geotrichum candidum também ajuda a alcalinizar a superfície de queijos devido o catabolismo do ácido láctico produzido pelas bactérias durante o metabolismo dos aminoácidos (Marcelino et al., 2001, Molimard et al., 1995). Além disso, esta espécie tem sido estudada devido suas características biotecnológicas para indústria de alimentos (Gente et al., 2002, 2006; Marcelino et al., 2001).

A utilidade da estirpe para uso na fabricação de queijo não deve ser feita somente por meio de métodos de identificação convencional baseado em morfotipos e fenotípos, mas também com base em análises de relações genéticas entre estirpes (Prillinger et al., 1999).

Geotrichum candidum é capaz de produzir lípases ligadas ao micélio quando cultivado na presença de óleo, com estabilidade a longo tempo em temperatura de refrigeração que pode se usada como biocatalisador nas indústrias de gorduras e óleos e também em reações

sintéticas como esterificação (Loo et al., 2014); preparação de emulsões de sorvete (Liew et al., 2000).

Das treze espécies reconhecidas e atribuídas ao gênero *Geotrichum*, oito são formalmente reconhecidas como *Geotrichum citri-aurantii*, *G. europaeum*, *G. pseudocandidum*, *G. candidum*, *G. fermentans*, *G. decipiens*, *G. restrictum* e *G. klebahnii* (Hoog et al., 2004).

O teleomorfo *Galactomyces* compreende espécies homotáticas (auto-fértil) e heterotáticas (auto-estéril) (Groenewald et al., 2012). *Galactomyces citri-aurantii*, é encontrado em frutas de *Citrus*, em solo de pomares de *Citrus*, mas também em outros tipos de ambientes não associados ao *Citrus* (Mckay et al., 2012). *Galactomyces citri-aurantii* foi o primeiro patógeno a ser relatado como agente etiológico de podridão azeda em frutas (Smith, 1917) e fungicidas pós-colheita eficazes para controlar a doença ainda não estão registrados (Smilanick et al., 2007).

Galactomyces geotrichum é uma espécie encontrada como membro da microbiota intestinal e respiratória superior de humanos, do solo, de leite cru, queijos, água, frutas e plantas (Alper et al., 2011; Gente et al., 2006) também já foi encontrado em solos de pomares de *Citrus* (Mckay et al., 2012). Hoje a espécie *Galactomyces geotrichum* é denominado *Geotrichum candidum*, a forma anamórfica do ascomiceto *Galactomyces candidum* (Gente et al., 2006).

A taxonomia de *Geotrichum* é baseada em diversos estudos que utilizaram diferentes abordagens, como: morfologia, fisiologia, características culturais, reassociação de nDNA, sistema de compatibilidade sexual, PCR-fingerprinting, eletroforese de enzimas e filogenia molecular (Naumova et al., 2001; Hoog et al., 2004; Groenewald et al., 2012). Além da caracterização morfológica, análises moleculares têm sido utilizadas para descrever espécies de *Geotrichum* (Pimenta, 2005; Kaewwichian et al., 2010). Com base em análises filogenéticas algumas espécies foram transferidas para o gênero *Galactomyces*. Dentre elas, *Geotrichum silvícola* e *Geotrichum bryndzae* foram alocadas em *Galactomyces candidus* e *Geotrichum vulgare* sinonimizada para *Galactomyces pseudocandidus*.

A combinação de características morfológicas e fisiológicas ou cada uma separadamente são estratégias comumente utilizadas na taxonomia de leveduras (Gente et al., 2006). Entretanto, os métodos

desenvolvidos para identificar leveduras de importância clínica não são os mesmos utilizados para leveduras em agroindústria de alimentos (Gente et al., 2006).

A identificação de estirpes de leveduras de importância industrial é baseada principalmente em propriedades bioquímicas, fisiológicas, morfológicas ou combinação de ambas (Gente et al., 2006, Naumova et al., 2001). Entretanto, esses métodos não são muito utilizados, pois diferentes espécies são mais difíceis para identificar (Prillinger et al., 1999).

Variações morfológicas do gênero *Geotrichum* que ocorrem entre os isolados da mesma espécie e entre espécies diferentes que possuem morfologia semelhante são limitações para a classificação taxonômica (Groenewald et al., 2012; Hoog et al., 2004). Para distinguir espécies de *Geotrichum*, há evidências que somente as características fenotípicas não são satisfatórias devido à significativa variabilidade morfológica com ausência de padrões típicos (Prillinger et al., 1999). Além disso, algumas espécies de *Geotrichum candidum* possuem elevado polimorfismo (Alper et al., 2011, Gente et al., 2002).

Com base nisso, técnicas moleculares têm sido utilizadas para superar tais dificuldades de identificação baseadas em análises fenotípicas (Gente et al., 2006). Por isso, associado à diversidade morfológica, é necessário o uso de ferramentas tais como análises filogenéticas para diferenciação de estirpes (Alper et al., 2013). Porém as características genéticas do gênero *Geotrichum* ainda não são bem conhecidas, bem como aquelas de outros fungos filamentosos e leveduras (Gente et al., 2002).

Dentre as técnicas moleculares que tem sido utilizadas para análise de polimorfismo de DNA em fungos, inclusive para *Geotrichum candidum* existe os métodos baseados em PCR, RAPD (random amplified polymorphic) (Marcelino et al., 2001), e as técnicas RAM (random amplification) ou ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Para identificação de espécies de *Geotrichum* as regiões LSU rRNA e actina tem sido utilizadas para estudos de filogenia molecular (Groenewald et al., 2012).

A região ITS, eleita como código de barras universal em fungos, não tem sido utilizada para identificação e diferenciação de espécies de

Geotrichum porque possui superposição de picos dos eletroferogramas. Além disso, possui regiões de difícil alinhamento das sequências de nucleotídeos e variação de sítios (Hoog et al., 2004; Alper et al., 2011; Groenewald et al., 2012).

2.1 Marcadores microssatélites (SSR)

Marcadores genéticos têm sido utilizados para selecionar características desejáveis, bem como para taxonomia, análises filogenéticas e diversidade genética (Godwin et al., 1997).

Um tipo de marcador genético é o Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) que permite obter níveis de variação nas regiões microssatélite que se encontra no genoma de eucariotos (Zietkiewicz et al., 1994).

Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são sequências curtas repetidas que podem ser penta, tetra, tri e dinucleotídeos em tandem situadas entre sequências não repetidas no genoma de eucarioto (Tautz & Renz, 1984; Zietkiewicz et al., 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1996). As sequências que flanqueiam os microssatélites são bastante conservadas dentro e entre espécies e até mesmo entre gêneros, sendo utilizadas para desenhar oligonucleotídeos e amplificar microssatélites, permitindo a seleção de oligonucleotídeos específicos e complementar a estas sequências para a amplificação dos SSRs via PCR (reação em cadeia da polimerase) (Pugh et al., 2004; Caixeta et al., 2009)

As sequências microssatélites são altamente variáveis entre indivíduos devido à alta taxa de mutação (Zietkiewicz et al., 1994). O polimorfismo nos locos microssatélites é oriundo do *crossing-over* desigual, e também por inserções e deleções de nucleotídeos, que geram variações no número de repetições das sequências simples dos microssatélites (Caixeta et al., 2009). A detecção do polimorfismo é pela diferença do tamanho de banda entre os fragmentos amplificados, que é devido ao diferente número de repetições dentro da região microssatélite (Pugh et al., 2004).

Devido os microssatélites serem marcadores moleculares mais polimórficos, codominantes e ter uma distribuição frequente e aleatória no genoma, essas características os tornam úteis em estudos de diversidade genética (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Mudge et al., 1997;

Zucchi et al., 2002). O polimorfismo deste marcador é conferido pela presença de uma determinada marca em um indivíduo e ausência desta mesma marca em outro (Kalendar et al., 1999).

Marcadores ISSRs são amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de um oligonucleotídeo ou oligonucleotídeo complementar a um microssatélite. Oligonucleotídeos de ISSRs podem ser di ou trinucleotídeos que se complementam à sequência do microssatélite (Caixeta et al., 2009; Pradeep, 2002).

Marcadores ISSR geram grande número de sequências informativas por reação (sequências polimórficas); são específicos para sequências simples repetitivas (SSR) do genoma; são úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, mapeamento do genoma e biologia evolutiva; são maiores (formados por mais de 10 pb) apresentando maior superfície de ancoragem do que os primers para RAPD e possuem temperaturas de ligação dos oligonucleotídeos mais altas, aumentando a reprodutibilidade dos produtos de ISSR (Tsumura et al., 1996; Reedy et al., 2002). Outra vantagem é que podem ser utilizados para analisar qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (Arcade et al., 2000).

2.2 Marcadores IRAPS

Marcadores IRAPs (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) são marcadores baseados nas sequências dos retrotransposons que utilizam oligonucleotídeos iniciadores que amplificam regiões entre retrotransposons (Boronnikova et al., 2010; Kalendar et al., 1999).

Os retrotransposons apresentam longas sequências conservadas em segmentos do DNA que permite novas inserções e replicação desses elementos no genoma. Vários desses elementos têm sido sequenciados e alto grau de polimorfismo intra e interespecífico tem sido observado (Kalendar, 2011; Boronnikova et al., 2010). Estas novas inserções podem ser detectadas por meio de técnica de PCR e aplicadas em estudos filogenéticos, diversidade genética e mapeamento genético (Kalendar, 2011; Grzebelus, 2006).

Assim como os marcadores ISSR, o polimorfismo dos marcadores IRAPs é conferido pela presença de uma determinada marca em um

indivíduo e ausência desta mesma marca em outro (Kalendar et al., 1999).

Os oligonucleotídeos iniciadores para a técnica molecular IRAP são desenhados para as regiões conservadas dos retrotransposons, as LTR, que vão se anelar nestas regiões conservadas (Kalendar et al., 1999 e Kalendar, 2011).

Uma das vantagens desta técnica é a utilização de primers com especificidade para reduzir a contaminação por produtos inespecíficos e uma das desvantagens é a necessidade de conhecer as sequências LTR no genoma o qual será estudado (Pasquali et al. 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Etiologia de doenças fúngicas de Plantas pertencente ao Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1 Obtenção dos isolados

Os 62 isolados foram provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-HORTALIÇAS). Os isolados foram obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados de *Geotrichum* sp. utilizados na avaliação de diversidade genética.

Gênero	Código DNA	Hospedeiro	Local de coleta
<i>Geotrichum</i>	822	Acerola fruto	Águas Claras/DF
<i>Geotrichum</i>	824	Alface caule	Vargem Bonita/DF
<i>Geotrichum</i>	825	Beterraba raiz tubérculo	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	828	Araçá Boi fruto	Viçosa/MG
<i>Geotrichum</i>	829	Araçá Roxo fruto	Pelotas/RS
<i>Geotrichum</i>	830	Morango fruto	Rio Grande /RS
<i>Geotrichum</i>	835	Cenoura processada	Malunga Catetinho
<i>Geotrichum</i>	836	Maxixe fruto	Planaltina/DF
<i>Geotrichum</i>	838	Batata tubérculo	Canoinhas/SC
<i>Geotrichum</i>	841	Batata tubérculo	Sul de Minas/MG
<i>Geotrichum</i>	842	Batata tubérculo	Cristalina/GO
<i>Geotrichum</i>	843	Batata tubérculo	Cristalina/GO
<i>Geotrichum</i>	846	Chuchu fruto	Claro das Porções/MG
<i>Geotrichum</i>	847	Chuchu fruto	Ceilândia/DF
<i>Geotrichum</i>	848	Chuchu fruto	Ceilândia/DF
<i>Geotrichum</i>	849	Chuchu fruto	Ceilândia/DF
<i>Geotrichum</i>	850	Chuchu fruto	Ceilândia/DF
<i>Geotrichum</i>	851	Banana maçã fruto	Luiz Alves/SC
<i>Geotrichum</i>	852	Banana maçã fruto	Luiz Alves/SC

<i>Geotrichum</i>	854	Pitanga fruto	Embrapa/Asa Norte-DF
<i>Geotrichum</i>	856	Pitanga fruto	Embrapa/Asa Norte-DF
<i>Geotrichum</i>	857	Banana prata	Luiz Alves/SC
<i>Geotrichum</i>	861	Pitanga fruto	Pelotas/RS
<i>Geotrichum</i>	866	Pitanga fruto	Anápolis/GO
<i>Geotrichum</i>	867	Pitanga fruto	Goianópolis/GO
<i>Geotrichum</i>	870	Tomate indústria	Goiânia/GO
<i>Geotrichum</i>	871	Tomate fruto	Ponte Alta/Gama/DF
<i>Geotrichum</i>	872	Tomate fruto	Ponte Alta/Gama/DF
<i>Geotrichum</i>	873	Tomate de mesa	Planaltina/DF
<i>Geotrichum</i>	874	Tomate de mesa fruto	Gama/DF
<i>Geotrichum</i>	877	Tomate de mesa fruto	Planaltina/DF
<i>Geotrichum</i>	879	Cenoura	Brasília/DF
<i>Geotrichum</i>	882	Berinjela fruto	Chã Grande/PE
<i>Geotrichum</i>	883	Tomate Indústria fruto	Mucugê/BA
<i>Geotrichum</i>	509	Jiló	Viçosa/MG
<i>Geotrichum</i>	571	Batata doce	Viçosa/MG
<i>Geotrichum</i>	1219	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1220	Tomate mesa	Corumbá/GO
<i>Geotrichum</i>	1221	Maxixe fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1222	Abacate fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1227	Abacate fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1229	Abacate fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1230	Abacate fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1231	Abacate fruto	Padre Bernardo/GO
<i>Geotrichum</i>	1232	Goiaba fruto	Camucim São Félix/PE
<i>Geotrichum</i>	1233	Goiaba fruto	Camucim São Félix/PE
<i>Geotrichum</i>	1236	Acerola fruto	Ananindeua/PA
<i>Geotrichum</i>	1240	Tomate fruto	Corumbá/GO
<i>Geotrichum</i>	1241	Tomate rasteiro fruto	Planaltina/ DF
<i>Geotrichum</i>	1242	Tomate fruto	Cocalzinho/GO
<i>Geotrichum</i>	1245	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1246	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1247	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1248	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1250	Morango fruto	Brazlândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1251	Cebola podridão do prato	Cristalina/GO

<i>Geotrichum</i>	1252	Pitanga fruto	Cristalina/GO
<i>Geotrichum</i>	1255	Chuchu fruto	Ceilândia/DF
<i>Geotrichum</i>	1257	Banana nanica polpa	Luiz Alves/SC
<i>Geotrichum</i>	1259	Tomate indústria fruto	Goiânia/GO
<i>Geotrichum</i>	1260	Batata Baroa	Marechal Floriano/ES
<i>Geotrichum</i>	1261	Batata Baroa	Marechal Floriano/ES

Minas Gerais (MG), Distrito Federal (DF), Goiás (GO), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Pernambuco (PE) Bahia (BA), Pará (PA), Espírito Santo (ES).

3.2 Extração do DNA genômico

Para identificação molecular, os 62 isolados foram cultivados em placas com batata dextrose ágar (BDA) cobertas com papel celofane e mantidas a 25 °C por até duas semanas, o que dependerá de cada isolado. O micélio foi removido com auxílio de um escalpelo e colocado em microtubos de 1,5 mL. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme Pinho et al. (2012).

3.3 Análise de diversidade genética

Para amplificação fragmentos de DNA foram utilizados os sete primers descritos na tabela 2. As reações de PCR foram preparadas utilizando os reagentes e concentrações recomendados pelo fabricante.

As reações de PCR foram preparadas utilizando os seguintes reagentes para cada reação de 25 µL: 12,5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 µL de cada primer (10 µM) sintetizado por Invitrogen (Carlsbad, EUA), 2 µL de DNA genômico (25 ng/µL) e água livre de nuclease para completar o volume total. As condições de PCR foram conduzidas em termociclador com temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão programadas de acordo com cada primer. A amplificação foi realizada e amplicons foram estocados a -20°C até serem feitas as análises em gel de agarose 1,5 %. Alíquotas dos produtos amplificados foram separados por eletroforese a 80 V por 2 horas em gel contendo Gelred e tampão TAE e examinado sob

luz UV para verificar a pureza e o tamanho dos fragmentos. Os marcadores de peso molecular, 1 Kb foi incluído em cada ensaio para tornar possível a determinação dos tamanhos dos fragmentos.

As posições das bandas foram utilizadas para criar uma matriz binária cuja ausência e presença de bandas foram codificadas por 0 e 1, respectivamente. Essa matriz foi adicionada ao software PAST3 (Hammer et al., 2001), onde o índice de similaridade de Jaccard foi calculado para cada combinação de duas amostras. A partir da matriz de similaridade, os dendrogramas foram construídos de acordo com o método das médias aritméticas de grupos não ponderados (UPGMA- unweighted pair group method with arithmetic averages).

Tabela 2: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para analisar a diversidade genética de *Geotrichum* sp.

Oligonucleotídeos	Referência
CIIRAP1-5'-CGT ACG GAA CAC GCT ACA GA-3' CIIRAP4- 5'-CTT TTG ACG AGG CCA TGC-3'	Santana et al., 2012
CIIRAP2 - 5'- AAT AAC GTC TCG GCC TTC AG-3' CIIRAP4 - 5'- CTT TTG ACG AGG CCA TGC- 3'	Santana et al., 2012
(CAG) ⁵ - 5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'	Rodrigues et al., 1991
(GA) ⁸ - 5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'	Andrea González e Xitlali Aguirre, 2004
(GACAC) ³ - 5'-GACACGACACGACAC- 3'	Weising et al., 1989
(TGTC) ⁴ - 5'-TGTCTGTCTGTCTGTC-3'	Rodrigues et al., 1991
(GATA) ⁴ - 5'-CATAGATAGATAGATA- 3'	Gente et al., 2006

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, 62 isolados de *Geotrichum* sp. foram utilizados para análise da diversidade genética utilizando marcadores microssatélites e IRAPs. Os isolados foram obtidos de vários hospedeiros e de regiões geográficas distintas.

O estudo é mais representativo em número de isolados de *Geotrichum* obtidos de frutas e hortaliças com presença de podridão azeda no Brasil. Trabalho semelhante foi conduzido por Gente et al., (2006) em diferentes países em que estudaram a diversidade de isolados de *Geotrichum candidum* obtidos de diferentes substratos, dentre eles de laranja, para estudos de tipagem molecular.

Foram testados cinco marcadores microssatélites e dois marcadores IRAPs nas estirpes de *Geotrichum* sp. para seleção do oligonucleotídeo com maior poder discriminatório entre os isolados, ou seja, que apresente maior polimorfismo.

Análises de UPGMA gerou um dendrograma gráfico, e cada isolado apresentou um padrão específico de banda dentro de cada marcador molecular e os perfis de bandas diferiram de acordo com a posição (dados não mostrados).

A escolha do ponto de corte limite fixado em 70% de similaridade foi feito com a intenção de distinguir para cada marcador molecular o número de isolados que formaram ou não clados. Os isolados que se ramificaram acima de 70% de similaridade foram considerados relacionados ou mesmo idênticos. Gente et al., 2002 consideraram um limite de 80% quando utilizaram a técnica RAM-PCR e 70% quando utilizaram o RAPD-PCR.

Houve grande diversidade genética entre os isolados de *Geotrichum* sp. deste estudo. Estudos prévios de diversidade genética dentro de espécies de *Geotrichum candidum* a partir de diferentes morfotipos, substratos e origem geográfica por meio do uso de técnicas moleculares como RAM-PCR e RAPD-PCR, utilizando primers ISSR e primers (10 mers) respectivamente revelaram alto grau de diversidade genética, indicando que diferentes habitats exibem diferentes perfis genéticos detectado pela técnica de PCR (Gente et al., 2002).

Apesar da origem geográfica e fonte de isolamento diferentes, em todos marcadores moleculares analisados foram encontrados pelo menos um clado representado por dois ou mais isolados que apresentaram perfis idênticos (Figuras 1-7).

De acordo com o dendrograma obtido utilizando o oligonucleotídeo microssatélite (GATA)⁴, foi possível verificar a formação de um clado com maior número de isolados agrupados, por exemplo, 846, 866, 872, 877, 1241, 1242, 1252, 849, 835, 836, 843, 850, 873, coletados de hospedeiros como tomate, batata, cenoura, chuchu, maxixe e pitanga nos estados de Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal (Figura 7).

Por outro lado, foi observado que muitos isolados não foram agrupados em clados, indicando que não possuem semelhança com os outros isolados estudados (Figuras 1-7).

A análise dos dendrogramas UPGMA resultado da amplificação com os sete oligonucleotídeos testados para avaliar a diversidade genética em frutas e hortaliças não revelaram nenhuma relação entre a cidade dos quais *Geotrichum* sp. foram procedentes. Isso pode ser observado nos dendrogramas que nem todos os isolados procedentes da mesma cidade não foram posicionados no mesmo clado.

Somente o primer (GA)⁸ classificou alguns isolados como idênticos, em dois clados, com base na cidade e estado brasileiro dos quais eles foram procedentes. Por exemplo, os isolados 1221, 1222, 1227, 1229 e 1231 são da cidade de São Bernardo e os isolados 1251 e 1252 são da cidade de Cristalina, ambos do estado de Goiás (Tabela 1 e figura 4).

Os isolados 872 e 873 foram os únicos isolados agrupados identicamente pelo primer (TGTC)⁴ quanto ao hospedeiro (tomate) e estado brasileiro simultaneamente (Distrito Federal) (Tabela 1 e figura 6). Em estudos realizado por meio da técnica PCR-fingerprinting utilizando primers universal N21, microssatélite ((GTG)⁵, (GACA)⁴, (CAC)⁵) e M13 com complexo *Galactomyces geotrichum* coletados de diferentes origens geográficas e fontes de isolamento, Naumova et al., (2001) observaram que sete estirpes da espécie B exibiram perfis similares apesar da origem geográfica e fonte de isolamento diferentes. Porém o oligonucleotídeo microssatélite (CAC)⁵ não mostrou nenhuma correlação significativa entre o fingerprinting e a origem e fonte de isolamento.

Todos os sete primers podem ser usados para classificar alguns isolados idênticos em pelo menos um clado com comum substrato, cidade e estado brasileiro simultaneamente. Com exceção dos primers (GACAC)³ e (GATA)⁴ que foram os únicos que apresentaram dois cladogramas.

Marcellino et al., (2001) conduzindo um trabalho com estirpes de *Geotrichum candidum* isolados de sete regiões de fabricação de queijo na França para estudar a diversidade genética por meio da técnica de PCR, verificaram que houve um alto grau de diversidade genética nas estirpes estudadas, porém estas não se agruparam de acordo com a região das quais foram isoladas.

Os isolados 1245, 1247 e 1250 procedentes da cidade de Brazlândia e isolados de morango agruparam em um mesmo clado utilizando os marcadores (GATA)⁴, (GACAC)³, (GA)⁸ e (CAG)⁵, enquanto somente os isolados 1247 e 1250 agruparam com o marcador CIIRAP2 e CIIRAP4. Além disso, esses três isolados agruparam em cladogramas diferentes ao utilizar os marcadores CIIRAP1 e CIIRAP4 e (TGTC)⁴. Enquanto somente os isolados 1247 e 1250 agruparam com o marcador CIIRAP2 e CIIRAP4. Além disso, esses três isolados agruparam em cladogramas diferentes ao utilizar os marcadores CIIRAP1 e CIIRAP4 e (TGTC)⁴. Embora os seis isolados de morango foram obtidos em Brazlândia, somente três isolados (1245, 1247 e 1250) foram semelhantes usando os marcadores (GATA)⁴, (GACAC)³, (GA)⁸ e (CAG)⁵.

Os isolados 870, 871, 872, 874, 877 isolados de tomate e procedentes de localidade diferentes agruparam em um mesmo clado utilizando os marcadores CIIRAP1 e CIIRAP4, CIIRAP2 e CIIRAP4 e (CAG)⁵, enquanto os isolados 870, 871, 872 agruparam em mesmo clado com o marcador (GA)⁸ e (GACAC)³. Além disso, os isolados 874 e 877 agruparam em um mesmo clado ao utilizar (GA)⁸, (GACAC)³ e (TGTC)⁴. E os isolados 870 e 871 agruparam com o marcador (GACAC)³ e os isolados 870, 871 e 874 agruparam com o marcador (GATA)⁴. Os isolados 870, 871 e 874 agruparam em cladogramas diferentes ao utilizar o marcador (TGTC)⁴. Embora onze isolados foram isolados de tomate, somente os cinco isolados (870, 871, 872, 874 e 877) foram semelhantes usando os marcadores CIIRAP1 e CIIRAP4, CIIRAP2 e CIIRAP4, (CAG)⁵.

Dos sete marcadores testados, quando utilizou o marcador microssatélite (TGTC)⁴, um total de quarenta e oito isolados não agruparam em clados. Indicando que os isolados são diferentes, uma vez que os perfis de bandas gerado por este marcador foram diferentes.

A técnica de amplificação PCR utilizando os oligonucleotídeos IRAPs revelou que não houve semelhança dos isolados quando comparados com aqueles em que foram utilizados oligonucleotídeos microssatélites pois o número de isolados que foram agrupados no mesmo clado quando foi utilizado marcadores IRAPS foram menores. Para os dois oligonucleotídeos CIIRAP1 e CIIRAP4 nove clados foram encontrados (Figuras 1 e 2 respectivamente) enquanto que para a maioria dos oligonucleotídeos microssatélites (CAG)⁵, (GACAC)³, (GATA)⁴ dez clados foram formados (Figuras 3, 5 e 7 respectivamente). Já para os oligonucleotídeos (GA)⁸ e (TGTC)⁴ onze e cinco clados foram formados respectivamente (Figuras 4 e 6 respectivamente).

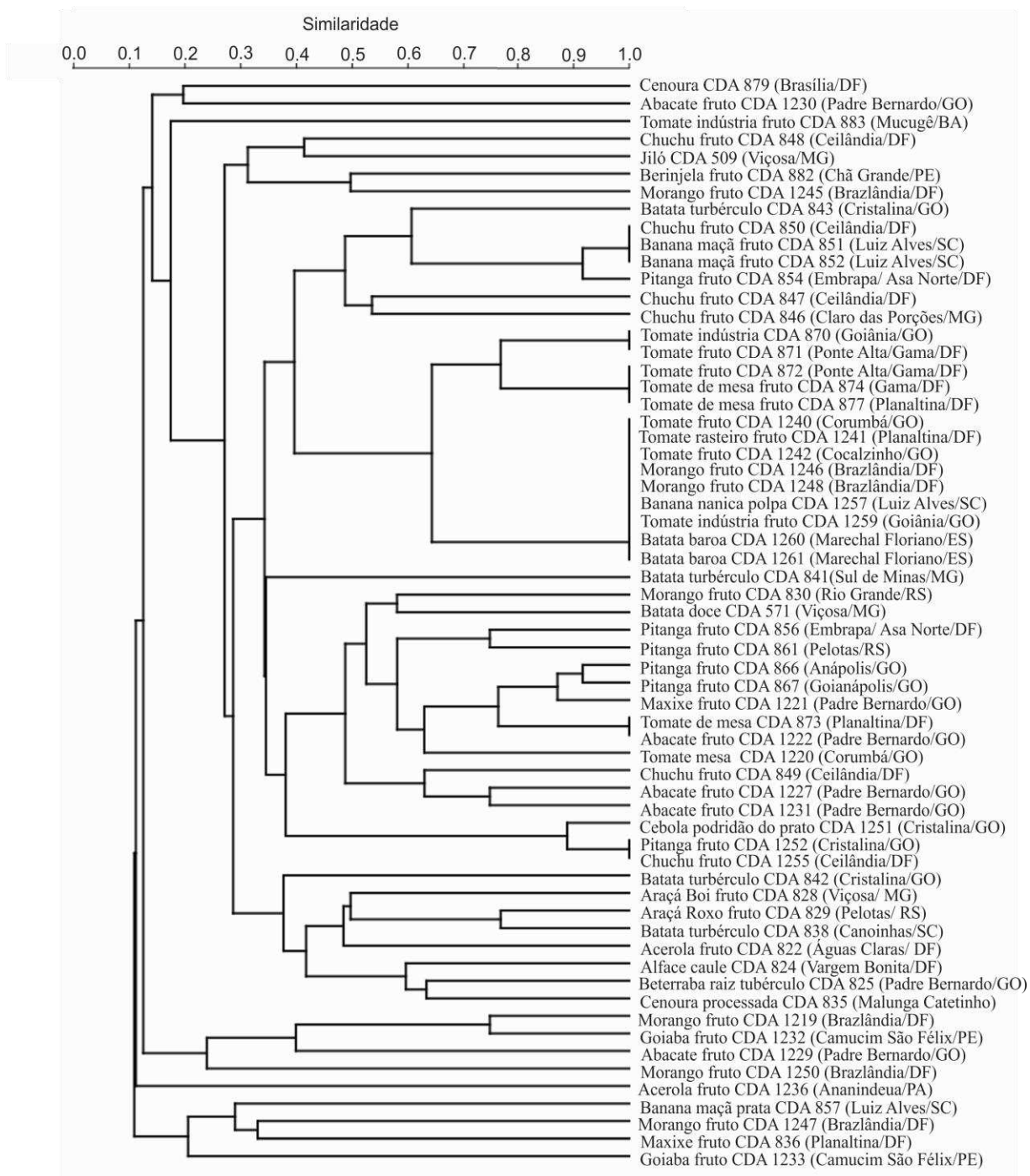


Figura 1: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando a combinação dos oligonucleotídeos CIIRAP1 e CIIRAP4.

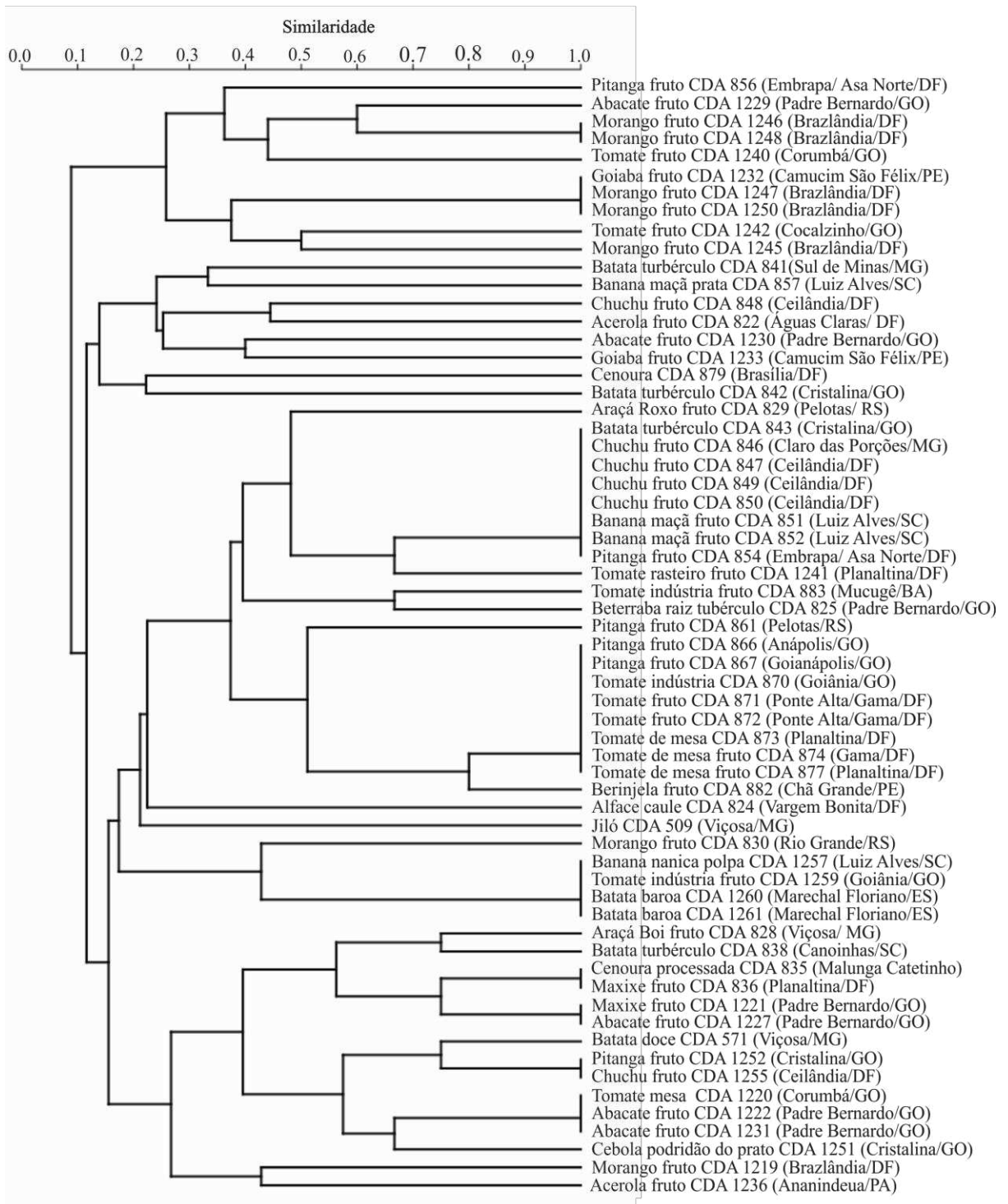


Figura 2: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando a combinação dos oligonucleotídeos CIIRAP2 e CIIRAP4.

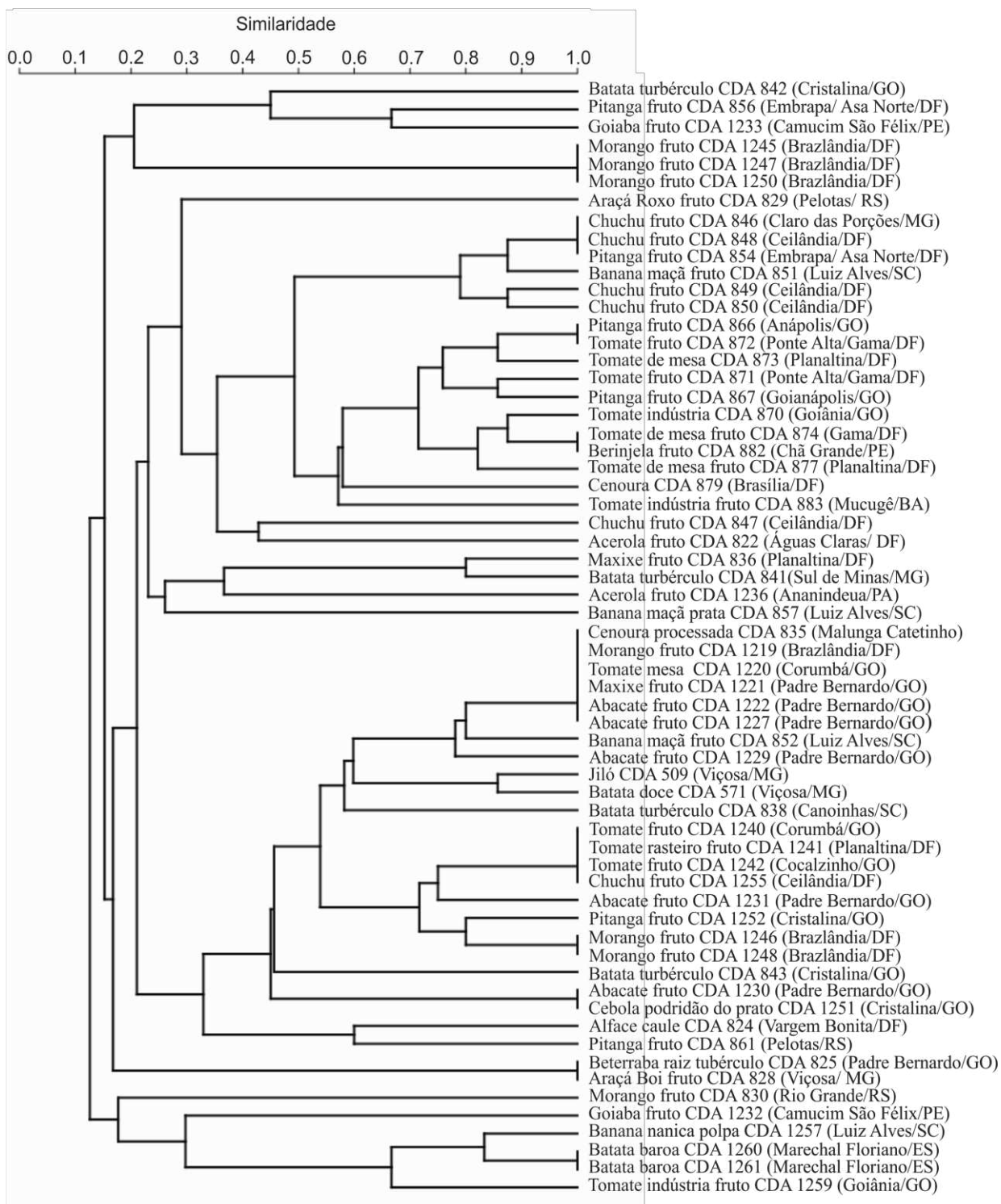


Figura 3: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (CAG)⁵.

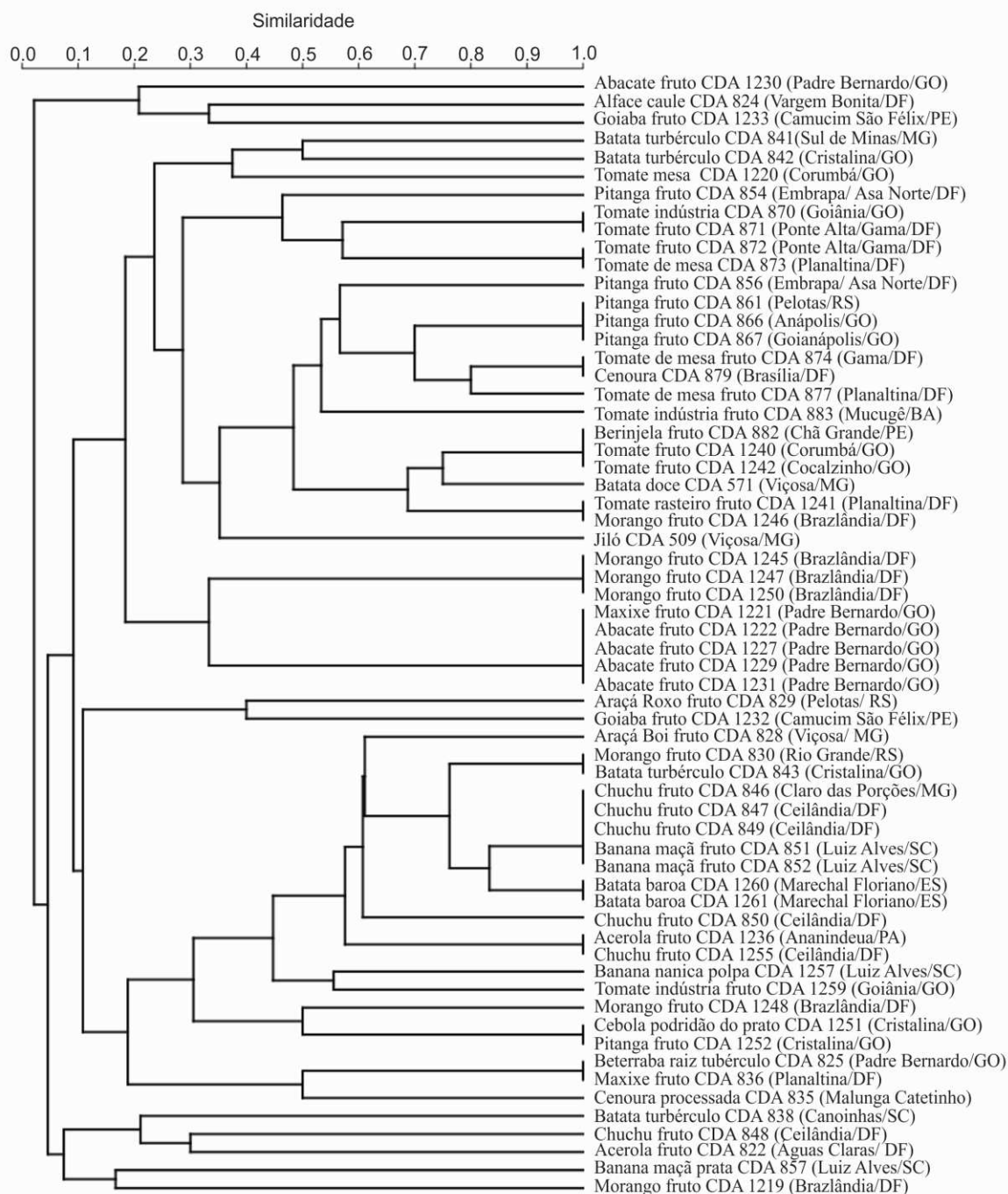


Figura 4: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GA)⁸.

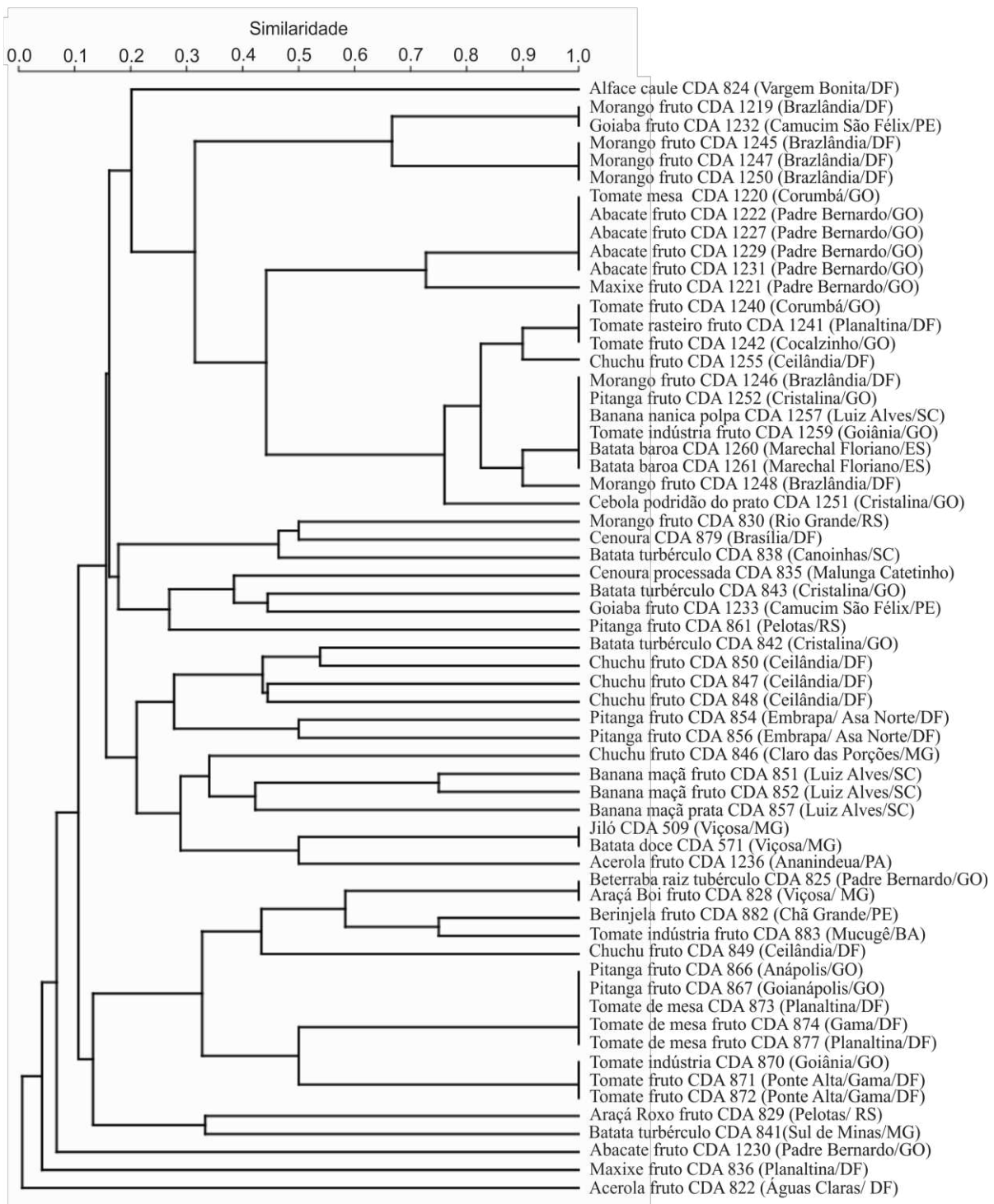


Figura 5: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GACAC)³.

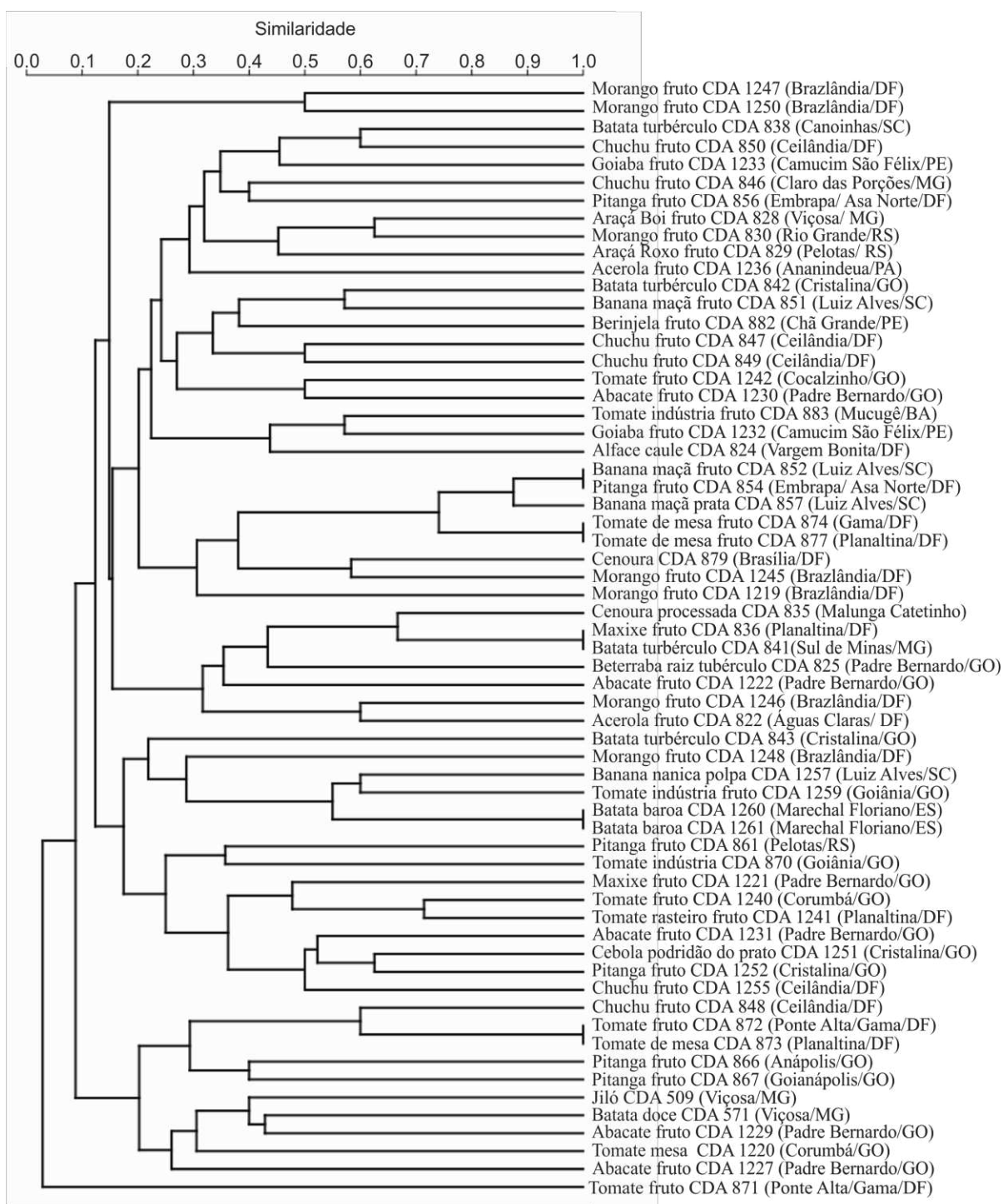


Figura 6: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (TGTC)⁴.



Figura 7: Dendrograma gerado a partir do índice de similaridade jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA para 62 isolados de *Geotrichum* sp. usando o oligonucleotídeo (GATA)⁴.

5. CONCLUSÕES

- Há uma elevada diversidade genética entre os isolados obtidos de diferentes hospedeiros e procedentes de diferentes localidades brasileira.
- Existe uma tendência de isolados de um mesmo hospedeiro ou região geográfica serem semelhantes quando foi utilizado diferentes marcadores moleculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. Informa Economics/FNP South America. São Paulo, 463 p, 2015.
- ALPER I.; FRENETTE M.; LABRIE, S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. **Fungal Biology**, v.115, p.1259–1269, 2011.
- ALPER I.; FRENETTE M.; LABRIE, S. Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains revealed by multilocus sequence typing . **Appl Microbiol Biotechnol**, v.97, p.5907–5920, 2013.
- ANDREA, G.; XITLALI, A. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs), 2004, p. 567-571.
- ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **Brazilian Fruit Year book**. Editora Gazeta, ISSN 1908-4931, 2014.
- ANUARIO DE HORTIFRUTICULTURA. **Hortifruti Brasil**. Edição especial, ano 13, nº 141, dez /2014, jan/2015, ISSN 1981-1837, 2014.
- ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER. *Geotrichum candidum* as possible cause of bovine abortion. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p. 795-797, 2013.
- ARCADE, A.; ANSELIN, F.; RAMPANT, P.F.; LESAGE, M. C.; PAQUES, L. E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p. 299-307, 2000.
- BORONNIKOVA, S. V.; KALENDAR, R. N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 36-42, 2010.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores moleculares**. 2 ed. Viçosa-MG: Edito Folha de Viçosa, p. 11-94, 2009.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: FAEPE, 2005. 2ed. 783p.

EMBRAPA. **Empresa brasileira de pesquisa agropecuária mandioca e fruticultura tropical.** Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 de maio 2015.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.1792–1797, 2004.

FAO – **Food and Agriculture Organization of The United Nations.** Disponível em: www.fao.org/. Acesso em: 15 de maio 2015.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1996.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. *Geotrichum candidum* as etiological agent of horse dermatomycosis. **Vet Microbiol**, v. 148, p. 368-371, 2011.

GENTE, S.; DESMASURES, N.; PANOFF, J.M.; GUÉGUEN, M. Genetic diversity among *Geotrichum candidum* strains from various substrates studied using RAM and RAPD-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.491–501, 2002.

GENTE, S.; SOHIER, D.; COTON, E.; DUHAMEL, C.; GUÉGUEN, M. Identification of *Geotrichum candidum* at the species and strain level: proposal for a standardized protocol. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.33, p.1019–1031, 2006.

GROENEWALD, M.; COUTINHO, T.; SMITH, M.T.; WALT, J. P. Species reassignment of *Geotrichum bryndzae*, *Geotrichum phurueaensis*, *Geotrichum silvicola* and *Geotrichum vulgare* based on phylogenetic analyses and mating compatibility. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p. 3072–3080, 2012.

GODWIN, I.D.; AITKEN, E.A.B.; SMITH, L. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v.18, p.1524-1528, 1997.

GRZEBELEUS, D. Transposon insertion polymorphism as new source of molecular markers. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 14, p. 21- 29, 2006.

- GULLINO, M.L. Lotta biológica a funghi agenti di marciumi della frutta in post-raccolta. **Informatore Fitopatologico**. Bologna, v. 4, p. 5-13, 1994.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, p.9, 2001.
- HOOG, G.S.; SMITH, M.T.; GUÉHO, E. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v. 29, p.1– 131, 1986.
- HOOG, G.S.; SMITH, M.T.; GUÉHO, E. Dipodascus de Lagerhein. In the Yeast, a Taxonomic Study. **Elsevier**, 4 ed, p. 181- 193, 1998.
- HOOG, G.S.; SMITH, M.T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v.50, p. 489–515, 2004.
- IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Agrícola Municipal 2012. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=lavourapermanente>. Acesso em: Abril de 2015.
- KAEWWICHIAN, R.; YONGMANITICHAI, W.; FUJIYAMA, K.; LIMTONG, S. *Geotrichum siamensis* sp. Nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. Nov., two asexual arthroconidial yeast species isolated in Thailand. **FEMS Yeast Research**, v.10, p. 214-220, 2010.
- KALENDAR, R. The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. **Ratar. Povrt./Field Veg. Crop Res.**, v.48, p.261-274, 2011.
- KALENDAR, R.; GORB, T.; REGINA, M.; SUONIEME, A.; SCHULMAN, A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied**, v. 98, p. 704-711, 1999.
- KNUDTSON, W. U.; KIRKBRIDE, C. A. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states. **J Vet Diagn Invest**, v. 4, p. 181-185, 1992.
- LIEW, M. Y. B.; GHAZALI, H. M.; LONG, K.; YAZID, A. M.; LAI, O. M. Production and transesterification activity of mycelium-bound lipase from *Rhizomucor miehei*. **J. Mol. Biol. Biotechnol**, v. 8, p.57-66, 2000.
- LESSARD, M. H.; VIEL, C.; BOYLE, B.; GELAIS, D.; LABRIE, S. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti*

- and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. **BMC Genomics**, v.235, p.15, 2014.
- LOO, J. L.; KHORAMNIA, A.; LAI, O. M.; LONG, K.; GHAZALI, H. M.; Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. **Molecules**, v.19, p. 8556-8570, 2014.
- MCKAY, A.H.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Distinguishing *Galactomyces citri-aurantii* from *G. Geotrichum* and characterizing population structure of the two postharvest sour rot pathogens of fruit crops in California. **Phytopathology**, v.102, p.528–538, 2012.
- MARCELINO, N.; BEUVIER, E. GRAPPIN, R.; GUÉGUEN, M.; BENSON, DR. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.4752-4759, 2001.
- MOLIMARD, P.; BOUVIER, I.; ISSANCHOU, S.; LESSCHAEVE, I.; VASSAL, L.; SPINNLER, H. E. Cooperation between *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum*: effect on taste and flavour qualities of Camembert type cheese. Etievant and P. Schreier (ed), Bioflavour 95. **Colloques de l'INRA (FRA)**, v.75, p. 167-172, 1995.
- MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P. KENWORTHY, W.J.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, Madison, v.37, p. 1611- 1615, 1997.
- NAUMOVA, E.S.; SMITH, M.T.; BOEKHOUT, T.; HOOG, G.S.; NAUMOV G.I. Molecular differentiation of sibling species in the *Galactomyces Geotrichum* complex. **Antonie van Leeuwemhoek**, v. 80, p. 263–273, 2001.
- NEVES FILHO, L. de C.; SILVEIRA JÚNIOR, V.; CORTEZ, L.A.B. Sem refrigeração correta, perdas atingem níveis indesejáveis. **Visão Agrícola**, v.7, p.44-49, 2007.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique.. **Phytopathology**, v. 97, p. 987- 996, 2007.
- PIMENTA, R.S.; ALVES, P.D.D.; COOREA-JR, A.; LACHANCE, M. A.; PRASAD, G.S.; RAJARAM, SINHA, B.R.R.P.; ROSA, C.A. *Geotrichum silvicola* sp.nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 497-501, 2005.

- PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; PEREIRA, O. L.; FERREIRA JUNIOR, W. G. An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliolacentellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v.122, p.333-345, 2012.
- PRILLINGER, H.; MOLNAR, O.; ELISKASES-LECHNER, F.; LOPANDIC, K. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.75, p. 267-283, 1999.
- PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B. CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers; development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p. 1151-1161, 2004.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p.9-17, 2002.
- RODRIGUES, R. J.; YODER, O. C. A family of conserved repetitive DNA elements from the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum lindemathianum*). **Experiment Micology**, v.15, p.232-242, 1991.
- SANTANA, M. F.; BATISTA, A. D.; RIBEIRO, L. E.; ARAÚJO, E. F.; Queiroz, M. V. Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 9999, p. 1-5, 2012.
- SMITH, C.O. Sour rot of lemon in California. **Phytopathology**, v.7, p.37-41, 1917.
- SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F. Influence of temperature and humidity on survival of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. **Plant Disease**, v. 91, p. 990-996, 2007.
- SUH, S.O.; BLACKWELL, M. Tree new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. **Mycological Research**, p. 220-228, 2006.
- SULO, P.; LAURENCÍK, M.; POLÁKOVÁ, S.; MINÁRIK, G.; SLÁVIKOVÁ, E. *Geotrichum bryndzae* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2370–2374, 2009.

- TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.
- TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theor. Appl. Genet.**v. 92, p. 40-45, 1996.
- WILSON, C.L.; ELGHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, v.78, n.9, p.837-844, 1994.
- WUCZKOWSKI, M.; BOND, C.; PRILLINGER, H. *Geotrichum vulgare* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 301–303, 2006.
- VAL, A. **Modelo agrícola desperdiça 35% da produção brasileira.** Disponível em: <http://mercadoetico.terra.com.br/arquivo/modelo-agricola-desperdica-35-da-producao-brasileira>. Acessado em: 20 de abril de 2015.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. & LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p. 176-183, 1994.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Notes*. **Oxford**, v.2, p. 512- 514, 2002.
- WEISING, K.; WEIGAND, F.; DRIESELL, A.J.; KAHL, G.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J.T. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. **Nucleic Acids Research**, v.17,1989.