

Marcadores Morfofisiológicos e Isoenzimáticos na Análise da Diversidade Genética de Isolados de *Acremonium strictum**

Hudson Teixeira¹, Maria das Graças G. C. Vieira² & José C. Machado³

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, tel: (31) 3899-1096, e-mail: hudsont@ufv.br; ²Departamento de Agricultura, e-mail: sementes@ufla.br; Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG, tel: (35) 3829-1470, e-mail: machado@ufla.br

(Aceito para publicação em 11/05/2004)

Autor para correspondência: Hudson Teixeira

TEIXEIRA, H., VIEIRA, M.G.G.C. & MACHADO, J.C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. Fitopatologia Brasileira 29:413-418. 2004.

RESUMO

Os fungos *Acremonium strictum* e *Fusarium verticillioides* normalmente apresentam algumas similaridades morfológicas. Este fator dificulta sua diferenciação em sementes, particularmente quando ocorrem simultaneamente. A análise de isoenzimas tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos em complemento à análise morfológica. Este trabalho objetivou caracterizar e dimensionar a diversidade genética de dez isolados de *A. strictum* obtidos de sementes de milho (*Zea mays*), provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras por meio da análise de nove marcadores morfofisiológicos e de cinco sistemas isoenzimáticos (aldolase, esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e malato desidrogenase). Objetivou-se ainda diferenciar os

isolados de *A. strictum* de *F. verticillioides* por meio das técnicas citadas. A eletroforese de isoenzimas forneceu um total de 28 bandas polimórficas. Aspectos como pigmentação da colônia, velocidade e taxa de crescimento, produção de massa e densidade miceliais, e a análise isoenzimática tornaram possível e seguro o agrupamento de isolados de *A. strictum* e sua diferenciação de *F. verticillioides*. Os isolados de *A. strictum* apresentaram variabilidade intraespecífica entre 0% e 89,5%. Para a maioria dos casos não foi possível correlacionar a similaridade fenotípica com a origem geográfica dos isolados de *A. strictum*.

Palavras-chave adicionais: eletroforese, isoenzimas, variabilidade, fungos fitopatogênicos, sementes.

ABSTRACT

Morphophysiological and isoenzymatic markers in a genetic diversity analysis of *Acremonium strictum* isolates

Differentiation between *Acremonium strictum* and *Fusarium verticillioides* in corn (*Zea mays*) seeds is very difficult because they present morphological similarities. Isoenzymatic analysis has been applied with success, allowing the development of fast, sensible and specific methods for diagnosis of plant pathogens in complement to morphological analysis. The objectives of this work were to characterize and evaluate the genetic diversity of ten isolates of *A. strictum* associated with corn seeds from different Brazilian regions by means of morphophysiological and isoenzymes analysis, in

comparison to one isolate of *F. verticillioides*. Nine morphophysiological characteristics and five isoenzymes systems (aldolase, esterase, acid phosphatase, alcalin phosphatase and malate dehydrogenase) were considered in this study. Isoenzymatic analysis produced 28 polymorphic bands. Colony pigmentation, growth rates, weight, mycelial density and isoenzymatic analysis were efficient for grouping *A. strictum* isolates and to distinguish them from *F. verticillioides*. The isolates of *A. strictum* showed variable intraspecific diversity between 0% to 89,5%. No phenotypic similarities were correlated with geographic origin of the *A. strictum* isolates.

INTRODUÇÃO

Técnicas moleculares baseadas na análise de isoenzimas têm sido aplicadas com êxito em diversas áreas da Micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos. A caracterização morfológica, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados (Fungaro, 2000). Marcadores morfológicos, como pigmentação, textura, forma marginal e velocidade de crescimento da colônia, produção de estruturas típicas, presença ou ausência de zonas concêntricas (Burgess *et al.*, 1995; Urben & Oliveira, 1999), são, de modo geral, altamente instáveis e dependentes da

composição do meio utilizado, condições de incubação e da própria variação do patógeno. Portanto, são subjetivos, pouco conclusivos e podem induzir a erros de interpretação quanto à identificação das espécies em estudo, já que muitas vezes, colônias atípicas de um dos organismos podem assemelhar-se às colônias do outro.

A irrestrita adoção de marcadores isoenzimáticos no diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos. Vieira (1996) distinguiu satisfatoriamente, isolados de *Colletotrichum gossypii* South e de *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa obtidos de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) por meio

desta técnica. Podem ser citados também experimentos que objetivaram dimensionar a variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen (Andrade *et al.*, 1997), *Fusarium moniliforme* Sheldon (Camargo, Menezes & Assis, 1997), *Botryodiplodia theobromae* Pat. (Lima *et al.*, 1997), *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr. (Machado *et al.*, 1997) e *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque (Véras *et al.*, 1997).

A diagnose precisa de patógenos morfológicamente semelhantes, como *Acremonium strictum* W. Gams e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, em lotes de sementes de milho (*Zea mays* L.) é uma necessidade e representa uma proteção indispensável para o sistema de produção de sementes. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram caracterizar e dimensionar a diversidade genética de isolados de *A. strictum* por meio da análise de marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos, correlacionar tais aspectos com a origem geográfica dos isolados e diferenciá-los de um isolado de *F. verticillioides* por meio das técnicas citadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos

Foram utilizados dez isolados de *A. strictum* e um de *F. verticillioides* obtidos de sementes de milho pelo método de incubação em papel de filtro (Limonard, 1966). Os isolados de *A. strictum* foram provenientes de duas diferentes localidades representativas de cinco importantes estados produtores brasileiros (Tabela 1). A multiplicação de *A. strictum* e *F. verticillioides* constou no cultivo em meio MA (Smith e Onions, 1994) a 20 °C, fotoperíodo de 12 h de luz, por dez dias em BOD.

Marcadores morfofisiológicos na análise da diversidade de *A. strictum*

Os isolados de *A. strictum* e *F. verticillioides* obtidos foram cultivados em meio MA, recoberto por quadrado de papel celofane, de dimensão padronizada (56 cm²), previa-

mente tratado com EDTA 0,1 mM e esterilizado a 120 °C por 30 min. Após dez dias de incubação foram avaliadas as variáveis morfofisiológicas (Tabela 2).

Na determinação da velocidade e taxa de crescimento micelial foi medido o raio médio da colônia (Gams, 1971). Com relação às variáveis produção de massa micelial e densidade micelial, o peso em miligramas refere-se às estruturas fúngicas desenvolvidas sobre o papel celofane. Partindo dos dados morfofisiológicos de *A. strictum* e *F. verticillioides* coletados, construiu-se uma matriz de dissimilaridade, a qual originou um dendrograma (UPGMA, NTSYS-pc, versão 2.02, coeficiente Simple Matching). O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, com onze isolados fúngicos, cinco repetições e parcela constituída por uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo uma colônia de *A. strictum* ou de *F. verticillioides* em desenvolvimento.

Marcadores isoenzimáticos na análise da diversidade de *A. strictum*

Cinco discos de meio MA com 5 mm de diâmetro, contendo micélio de *A. strictum* e *F. verticillioides* foram retirados da periferia de colônias com dez dias de idade e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de meio líquido, composto de: NaNO₃ – 2 g/l; KH₂PO₄ – 1 g/l; MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 g/l; sacarose – 15 g/l; água destilada e esterilizada – 1.000 ml; 10 ml de solução mineral (elementos traços): FeSO₄ · 7H₂O – 20 mg/l; ZnSO₄ · 7H₂O – 100 mg/l; Na₂MoO₄ · 7H₂O – 2 mg/l; CuSO₄ · 5H₂O – 2mg/l; MnCl₂ · 4H₂O – 2 mg/l; pH do meio = 6,5. Os fungos foram mantidos a 20 °C, sem agitação, no escuro, por sete dias, sendo o micélio obtido coletado a vácuo e macerado em nitrogênio líquido em presença de areia de quartzo esterilizada e antioxidante PVP. Com relação à extração e análise eletroforética de isoenzimas, para cada isolado foram utilizados 150 mg de micélio fresco e macerado, os quais foram colocados em microtubos de 2 ml, adicionando-se, em seguida, 300 µl de tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0; 0,8% PVP; 4% PEG 6000; 0,1% BSA; 0,1% β-mercaptoetanol). A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16.000xg por 25 min, a 4 °C. Do extrato de cada amostra foram aplicados 100 µl em géis de poliácridamida confeccionados em sistema descontínuo (4,5% e 7,5%). As isoenzimas foram separadas em campo elétrico por aproximadamente 4 h, a 4 °C. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina pH 8,9. Após migração, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos aldolase (ALD), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (ALP), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO) e superóxido dismutase (SOD), segundo metodologia descrita por Alfenas (1998). Os géis foram avaliados quanto à presença (valor 1) ou ausência (valor 0) de bandas polimórficas entre os genótipos de *A. strictum* e *F. verticillioides*. Determinou-se a estimativa de dissimilaridade genética por meio da construção de um dendrograma (UPGMA, NTSYS-pc, versão 2.02, coeficiente de Jaccard).

TABELA 1 - Origem geográfica dos isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e de *Fusarium verticillioides* (FV11) obtidos de sementes de milho (*Zea mays*) e utilizados nos ensaios

Isolado	Origem da amostra	Localização	Altitude (m)	Hospedeiro
AS1	Sete Lagoas - MG	Centro	761	8447
AS2	Uberlândia - MG	Triângulo	863	C - 909
AS3	Miguelópolis - SP	Norte	510	AG - 3010
AS4	Itaí - SP	Sudoeste	614	C - 909
AS5	S ^o . Antônio Platina - PR	Norte	505	C - 444
AS6	S ^a . Terezinha Itaipu - PR	Sudoeste	218	AG - 9010
AS7	Vicentinópolis - GO	Sul	646	C - 901
AS8	Itumbiara - GO	Sul	448	AG - 1051
AS9	Passo Fundo - RS	Norte	687	-----
AS10	Cruz Alta - RS	COeste	452	AG - 3010
FV11	Sete Lagoas - MG	Centro	761	-----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores morfofisiológicos na análise da diversidade de *A. strictum*

Com base na classificação de aspectos morfofisiológicos adotada neste trabalho (Tabela 2) e de acordo com os resultados mostrados na Tabela 3, observou-se que os isolados de *A. strictum* apresentaram elevada variação fenotípica quanto ao crescimento micelial típico (C.M.T.), textura do micélio (T.M.), formação *in vitro* de feixes de hifas (F.F.H.), forma marginal da colônia (F.M.C.) e pigmentação da colônia (P.a.C.; P.v.C.). Foram observados também resultados coincidentes entre alguns isolados de *A. strictum* e o isolado de *F. verticillioides* com relação ao crescimento micelial típico, textura do micélio, formação de feixes de hifas e forma marginal da colônia. Reforçando os relatos de Gams (1971),

os isolados de *A. strictum* se desenvolveram mais lentamente em meio MA e, conseqüentemente, produziram menos massa micelial *in vitro* quando comparados a *F. verticillioides*. Os isolados de *A. strictum* apresentaram uma ampla faixa de cores, variando do bege (B) ao rosa alaranjado (Ra), em múltiplas combinações, predominando a pigmentação rosa e suas variantes. Por outro lado, *F. verticillioides* sempre apresentou no verso e anverso das colônias pigmentação violeta (Vio) intensa e suficientemente diferenciadora dos demais isolados (Tabela 3). Segundo Gams (1971), a espécie *A. strictum* produz micélio que pode variar do branco ao rosa, o que confirmou em parte os resultados obtidos neste trabalho. De acordo com Gois *et al.* (1997), Valim-Labres *et al.* (1997) e Cerqueira *et al.* (1999), algumas características morfológicas são subjetivas, logo, dependentes da interpretação de quem as avalia.

Com base nos aspectos morfofisiológicos avaliados,

TABELA 2 - Variáveis morfofisiológicas consideradas na análise de isolados de *Acremonium strictum* de *Fusarium verticillioides* obtidos de sementes de milho (*Zea mays*) e cultivados em meio malte-ágar (MA)

Variável morfofisiológica					
Crescimento micelial típico	Superficial (S)	Aéreo (A)			
Textura do micélio	Lisa (L)	Floculosa (F)	Cotonosa (C)		
Formação <i>in vitro</i> de feixes de hifas	Ausente (-)	Presente (+)			
Forma marginal da colônia	Regular (R)	Irregular (I)			
Pigmentação do anverso e verso da colônia (Munsell, 1976)	Bege (B) 2,5Y - 8,5/2	Rosa claro (Rc) 2,5R - 9/2	Rosa salmão (Rs) 10R - 7/10	Rosa alaranjado (Ra) 10R - 6/14	Violeta (Vio) 2,5R - 5/8
Velocidade de crescimento micelial (mm/10 dias) (Gams, 1971)	< 10 mm	10 < x < 30 mm	> 30 mm		
Taxa de crescimento micelial (mm/2 em dois dias, até o 10° dia) (Gams, 1971)	< 3 mm	3 < x < 6 mm	> 6 mm		
Produção de massa micelial (mg/10 dias)	<10 mg	10 < x < 30 mg	>30 mg		
Densidade micelial (mg/56,25 cm ²)	< 3 mg	3 < x < 6 mg	> 6 mg		

TABELA 3 - Avaliação de variáveis morfofisiológicas de isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) de *Fusarium verticillioides* (FV11) obtidos de sementes de milho (*Zea mays*) e cultivados em meio malte-ágar (MA)

Isolado	Variáveis morfofisiológicas									
	C.M.T.*	T.M.	F.F.H.	F.M.C.	P.a.C.	P.v.C.	V.C.	T.C.	P.M.	D.M.
AS1	S	L-F	-	R	Rs-Ra	Rs-Ra	19,0	3,3	13,0	3,5
AS2	S-A	F-C	+	I	Rs-Ra	Rs-Ra	20,0	3,3	12,8	3,5
AS3	S-A	L-C	+	R	Rc-Ra	Rc-Ra	23,0	3,9	15,3	3,7
AS4	S-A	F-C	+	R	B-Rs	B-Rs	22,0	3,8	15,0	3,7
AS5	S-A	F-C	+	R	B-Ra	B-Ra	24,0	4,3	17,6	4,0
AS6	S	L-F	-	R	Rs-Ra	Rs-Ra	23,0	4,2	15,7	4,0
AS7	S-A	F-C	+	I	Rs-Ra	Rs-Ra	18,0	3,3	13,2	3,3
AS8	S-A	L-C	+	I	B-Rs	B-Rs	20,0	3,4	12,0	3,0
AS9	S	L-F	-	R	B-Ra	B-Ra	22,0	3,6	15,0	3,3
AS10	S	L-F	-	R	Rs-Ra	Rs-Ra	23,0	4,3	15,8	4,0
FV11	S-A	L-C	-	R	Vio	Vio	35,0	7,2	33,0	6,8

*C.M.T. (crescimento micelial típico); T.M. (textura do micélio); F.F.H. (formação *in vitro* de feixes de hifas); F.M.C. (forma marginal da colônia); P.a.C. (pigmentação do anverso da colônia); P.v.C. (pigmentação do verso da colônia); V.C. (velocidade de crescimento micelial); T.C. (taxa de crescimento micelial); P.M. (produção de massa); D.M. (densidade micelial).

a pigmentação da colônia, a velocidade e taxa de crescimento, a produção de massa e a densidade micelial tornaram possível e seguro o agrupamento de isolados de *A. strictum* e sua diferenciação de *F. verticillioides* em meio MA. Os isolados de *A. strictum* apresentaram coeficiente de dissimilaridade intraespecífica variando de 0 a 60% e média de 37%, enquanto que a dissimilaridade interespecífica observada variou de 70% (AS3 e FV11) a 90% (AS2 e FV11; AS7 e FV11). A similaridade entre os isolados de *A. strictum*, pouco acima de 60%, sugere que a existência de um grande número de subpopulações do patógeno é pouco provável. Em alguns casos, pares de isolados provenientes de um mesmo estado brasileiro apresentaram ora menor, ora maior coeficiente de dissimilaridade do que aqueles provenientes de estados diferentes. A explicação provável para estes resultados talvez resida no fato de que os isolados de *A. strictum*, embora oriundos de um mesmo estado, foram obtidos de amostras de sementes de milho produzidas em localidades com características edafoclimáticas distintas. Desse modo, pode-se afirmar que o agrupamento de isolados de *A. strictum*, baseado somente em características morfofisiológicas, não foi suficiente para estabelecer qualquer correlação entre similaridade fenotípica e a origem geográfica dos mesmos. Este fato reforça o relato de Valim-Labres *et al.* (1997), no qual os autores sugerem que a diversidade morfológica não é ocasionada unicamente por pressões do ambiente, decorrentes de diferenças geográficas como temperatura e umidade relativa do ar e o fotoperíodo. Neste trabalho observou-se que a variabilidade morfofisiológica pode também estar sendo influenciada por algum fator intrínseco ao patógeno, genótipo do hospedeiro, ou ainda, à interação entre estes. De acordo com marcadores morfofisiológicos, os isolados fúngicos foram distribuídos em três grupos, considerando um limite arbitrário de 30% de distância genética relativa (Figura 2A). O grupo 1 foi formado pelos isolados AS1, AS6, AS10, AS9; grupo 2: AS2, AS7, AS3, AS4, AS5, AS8; e o grupo 3: FV11.

Marcadores isoenzimáticos na análise da diversidade de *A. strictum*

Os perfis eletroforéticos da liase ALD, das hidrolases EST, ACP e ALP, bem como da oxirredutase MDH exibiram um total de 28 bandas polimórficas, tendo sido considerada elevada a atividade em todos os sistemas enzimáticos citados (Figura 1). Alguns autores têm relatado atividade enzimática em outras espécies fúngicas para os sistemas avaliados neste ensaio. Como exemplo, são citados os experimentos de Leuchtmann & Clay (1990) utilizando a enzima ALD na detecção de variabilidade entre isolados de *Acremonium* sp., bem como a utilização dos sistemas ACP e MDH na determinação da diversidade genética de *strains* de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. e *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder & Hansen (Huss *et al.*, 1996) e, ainda, os trabalhos de Kerssies *et al.* (1994) e Skovgaard & Rosendahl (1998) na identificação de *Fusarium* sp. e *F. oxysporum* utilizando o sistema EST. No presente trabalho, a distância genética relativa mínima e máxima entre os isolados de *A.*

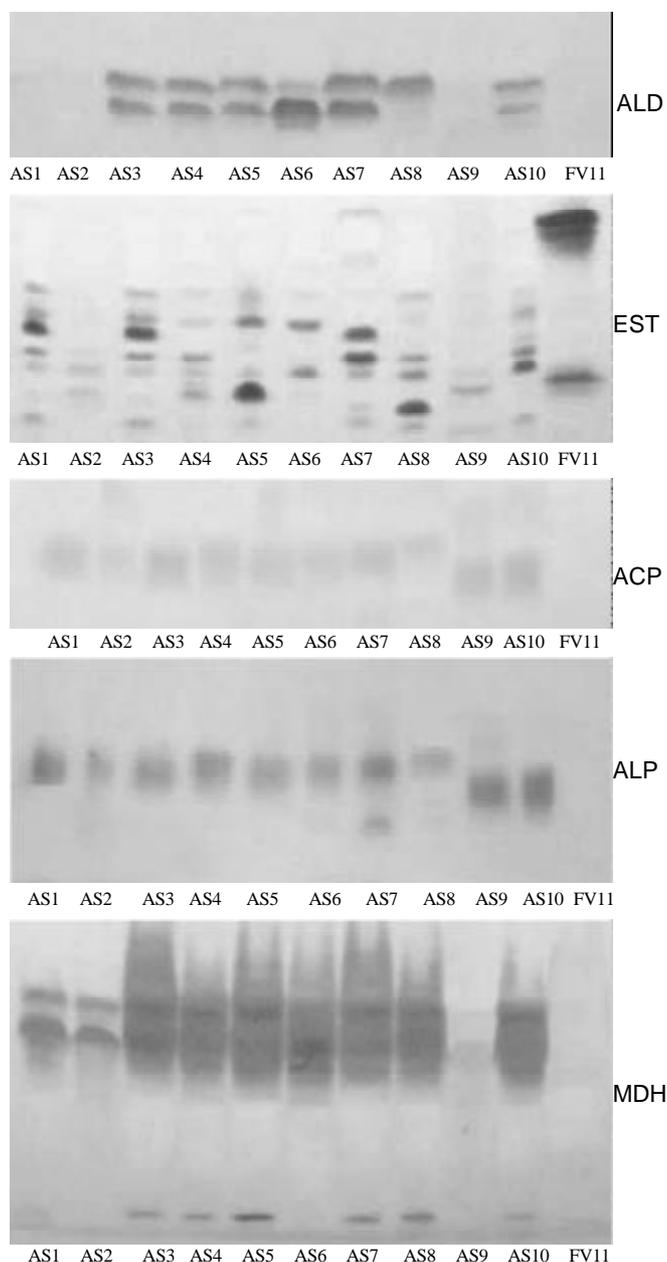


FIG. 1 - Padrões isoenzimáticos para isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e de *Fusarium verticillioides* (FV11) revelados para as isoenzimas aldolase (ALD), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (ALP) e malato desidrogenase (MDH).

strictum foram observadas entre os pares AS1 e AS3 (25%) e AS7 e AS9 (89,5%), respectivamente. A distância média intraespecífica em *A. strictum* foi de 58,5%. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos na análise morfofisiológica dos isolados, no que diz respeito à baixa variabilidade detectada entre isolados de *A. strictum*. A dissimilaridade entre *A. strictum* e *F. verticillioides* variou de 87,5% (AS7 e FV11) a 100% (AS9 e FV11).

A variabilidade dos perfis isoenzimáticos entre os isolados fúngicos foi resumida na Figura 2B. Os isolados

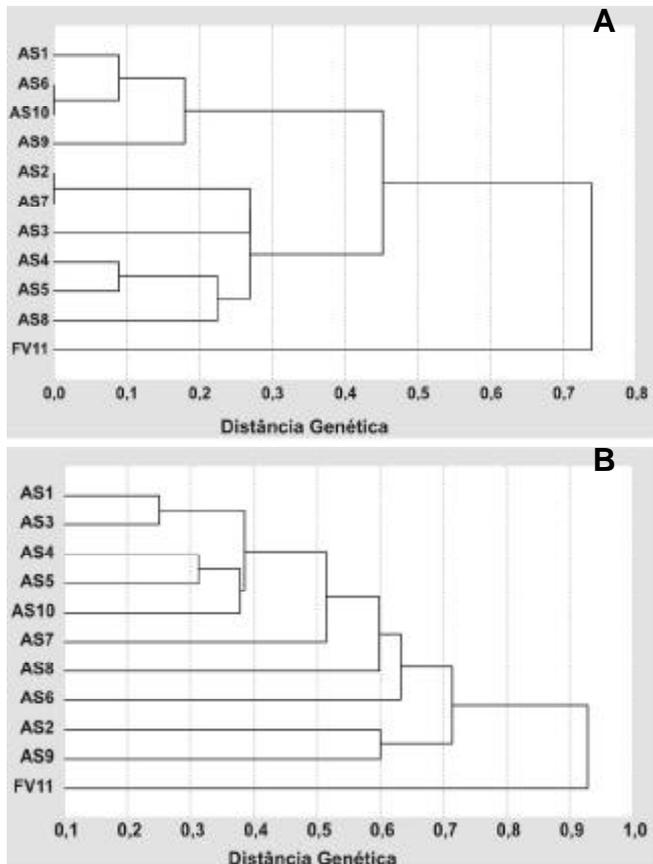


FIG. 2 - Agrupamento de isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e de *Fusarium verticillioides* (FV11), baseado nas distâncias genéticas (%) entre os indivíduos. Dados obtidos pela análise de variáveis morfofisiológicas (A) e eletroforese de isoenzimas (B).

foram divididos em três grupos, considerando um limite arbitrário de 65% de distância genética relativa. Grupo 1: AS1, AS3, AS4, AS5, A10, AS7, AS8, AS6; grupo 2: AS2, AS9; e o grupo 3: FV11. Exceto pela composição do Grupo 3, pode-se observar que, em sua maioria, os resultados da eletroforese de isoenzimas diferiram daqueles obtidos pela análise de aspectos morfofisiológicos. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de não haver qualquer relação genotípica entre as variáveis morfológicas consideradas e os sistemas isoenzimáticos analisados. Os sistemas enzimáticos PO e SOD não apresentaram atividade para os isolados de *A. strictum* e *F. verticillioides*. Do mesmo modo, Kerssies *et al.* (1994) e Leuchtmann & Clay (1990) relataram ausência de atividade de tais sistemas, respectivamente para *F. oxysporum* e *Acremonium* sp. Entretanto, Vieira (1996) e Skovgaard & Rosendahl (1998) observaram atividade para estas enzimas em *Colletotrichum* sp. e *F. oxysporum*, respectivamente. Os isolados AS1-AS3, AS4-AS5, AS2-AS9, AS5-AS6 e AS7-AS8-AS10 apresentaram perfis isoenzimáticos semelhantes para os sistemas ALP e EST, ALD e ALP, ALD e EST, ACP, MDH, respectivamente. No presente experimento, verificou-se que apenas os pares de isolados de *A. strictum* originários dos estados do Paraná

(AS5-AS6) e de Goiás (AS7-AS8) apresentaram correlação entre o padrão isoenzimático e a origem geográfica dos mesmos.

A análise conjunta dos resultados deste experimento permitiu observar que, na maioria dos casos, isolados provenientes de um mesmo estado (AS1 e AS2, ambos de Minas Gerais; AS3 e AS4, ambos de São Paulo; etc.) apresentaram fenótipos mais variados do que isolados oriundos de estados diferentes (AS1 e AS3; AS5 e AS9; AS4 e AS8). Este fato deveu-se, provavelmente, à utilização de isolados obtidos de genótipos hospedeiros com base genética diferente, exercendo alguma influência sobre o comportamento dos próprios isolados, mais que a origem geográfica dos mesmos. Da mesma forma, Alzate-Marin *et al.* (1997) não observaram correlação entre os grupos de similaridade genética observados e a origem geográfica dos isolados testados. Exceções à parte, e observando-se os resultados da aplicação das duas técnicas, constatou-se que o agrupamento de isolados afins de *A. strictum* não permitiu estabelecer um padrão. Estes resultados apresentam fundamento se considerarmos que dificilmente a expressão dos aspectos morfofisiológicos e isoenzimáticos dos isolados estariam sendo condicionados pelos mesmos alelos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa. SIF. 1998.
- ALZATE-MARIN, A.L., BAÍA, G.S., FALEIRO, F.G., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J. de; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. de. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. Fitopatologia Brasileira 22:85-88. 1997.
- ANDRADE, D.E.G.T., ASSIS, T.C., MICHEREFF, S.J. & MENEZES, M. Variabilidade isoenzimática entre isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de uma área de plantio de tomateiro. Fitopatologia Brasileira 22:243. 1997 (Resumo).
- BURGESS, T., MALAJCZUK, N. & DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. Mycological Research 99:1-13. 1995.
- CAMARGO, T.V., MENEZES, M. & ASSIS, T.C. Caracterização de isolados de *Fusarium moniliforme* através da análise eletroforética em gel de poliácridamida. Fitopatologia Brasileira 22:254. 1997 (Resumo).
- CERQUEIRA, A. de O., NEWMAN LUZ, E.D.M. & ROCHA, C.S.S. Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* spp. da micoteca do centro de pesquisas do cacau. Fitopatologia Brasileira 24:114-119. 1999.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. Biotecnologia: ciência & desenvolvimento 3:12-16. 2000.
- GAMS, W. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Stuttgart. G. Fischer. 1971.
- GOIS, M.R.B., REIFSCHNEIDER, F.J.B. & MILLER, R.N.G. Estudo da variabilidade de isolados de *Verticillium dahliae*. Fitopatologia Brasileira 22:267. 1997 (Resumo).

- HUSS, M.J., CAMPBELL, C.L., JENNINGS, D.B. & LESLIE, J.F. Isozyme variation among biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section Liseola). *Applied and Environmental Microbiology* 62:3750-3756. 1996.
- KERSSIES, A., EVERINK, A., HORNSTRA, L. & TELGEN, H. J. van. Eletrophoretic detection method for *Fusarium oxysporum* species in cyclamen and carnation by using isoenzymes. In: Schots, A., Dewey, F.M. & Oliver, R. (Eds.) *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification*. Cambridge. CAB International. 1994. pp.57-62.
- LEUCHTMANN, A. & CLAY, K. Isozyme variation in the *Acremonium/Epichloë* fungal endophyte complex. *Phytopathology* 85:1133-1139. 1990.
- LIMA, J.A.S., MARTINS, L.S.S. & TAVARES, S.C.C. Caracterização isoenzimática de quinze isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat. provenientes de diferentes hospedeiros. *Fitopatologia Brasileira* 22:322. 1997 (Resumo).
- LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 72:319-321. 1966.
- MACHADO, M.C.V., MACHADO, A.L.M. & MENEZES, M. Patogenicidade e caracterização isoenzimática de isolados de *Myrothecium roridum*. *Fitopatologia Brasileira* 22:302. 1997 (Resumo).
- MUNSELL, A.H. *Munsell book of color: glossy finish collection (2.5R-10G)*. Maryland. Macbeth Division. 1976.
- SKOVGAARD, K. & ROSENDAHL, S. Comparison of intra and extracellular isozyme banding patterns of *Fusarium oxysporum*. *Mycology Research* 102:1077-1084. 1998.
- SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. *The preservation and maintenance of living fungi*. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1994.
- URBEN, A.F. & OLIVEIRA, A.S. Caracterização morfológica em diferentes isolados de *Fusarium moniliforme* infectando sementes transgênicas de milho procedentes dos Estados Unidos. *Fitopatologia Brasileira* 24: 339. 1999 (Resumo).
- VALIM-LABRES, M.E., PRESTES, A.M., SAND, S. van der & MATSUMURA, A.T.S. Variação no aspecto cultural, morfologia e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana* de trigo. *Fitopatologia Brasileira* 22:483-487. 1997.
- VÉRAS, S.M. de, GASPAROTTO, L. & MENEZES, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaranicola*. *Fitopatologia Brasileira* 22:323. 1997 (Resumo).
- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro. (Tese de Doutorado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 1996.