

Marcadores RAPD 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, Universidade Federal de Lavras, e-mail: sementes@ufla.br;

³Departamento 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 08/07/2004)

Autor para correspondência: Hudson Teixeira

TEIXEIRA, H., VIEIRA, M.G.G.C. & MACHADO J.C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. Fitopatologia Brasileira 29:651-655. 2004.

RESUMO

Os fungos *Acremonium strictum* e *Fusarium verticillioides* normalmente apresentam algumas similaridades morfológicas, o que dificulta sua diferenciação em sementes de milho (*Zea mays*), particularmente quando ocorrem simultaneamente. Técnicas moleculares de análise do DNA têm 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, provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras, por meio da análise do

DNA genômico (RAPD). Objetivou-se ainda, diferenciar os isolados de *A. strictum* de *F. verticillioides* por meio da técnica citada. Pela análise do DNA, 25 primers Operon geraram polimorfismos, os quais 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 3,4% e 44,4%. Para a maioria dos casos não foi possível correlacionar a similaridade genotípica e a origem geográfica dos isolados de *A. strictum*.

Palavras-chave adicionais: DNA, variabilidade, fungo fitopatogênico, *Cephalosporium acremonium*, semente, milho.

ABSTRACT

RAPD markers in the genetic diversity analysis of *Acremonium strictum* isolates

Differentiation between *Acremonium strictum* and *Fusarium verticillioides* infecting corn (*Zea mays*) seeds is difficult because they present some morphological similarities. Molecular techniques have been applied with success, allowing the development of fast, sensible and specific diagnostic methods for plant pathogens in complement to morphological analysis. The objectives of this work were to characterize

and measure the genetic diversity of ten isolates of *A. strictum* associated with maize (*Zea mays*) seeds from different Brazilian regions, using DNA analysis (RAPD) in comparison with one isolate of *F. verticillioides*. Twenty-five Operon primers generated polymorphisms that were efficient in grouping *A. strictum* isolates and in distinguishing them from *F. verticillioides*. The isolates of *A. strictum* showed variable intraspecific diversity between 3.4% to 44.4%. No genotypic similarities were correlated with the geographic origin of the *A. strictum* isolates.

INTRODUÇÃO

O aumento da demanda mundial por produtos agrícolas tem tornado imperativo o desenvolvimento de mecanismos mais rápidos e confiáveis no exercício do controle da qualidade sanitária do insumo semente, a qual tem sido insuficientemente investigada com as técnicas disponíveis da biotecnologia. Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA 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 essencial, é limitada algumas vezes devido ao 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), entre outros, são, de modo geral, instáveis e dependentes de vários aspectos, por exemplo, composição do meio utilizado, condições de incubação e a própria variação intraespecífica do patógeno. Portanto, podem ser 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 moleculares do tipo RAPD na detecção, diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados gerados. A técnica RAPD tem se mostrado extremamente útil para medir e caracterizar a variabilidade genética (Fungaro, 2000). Por utilizar diretamente o DNA,

*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2001)

não sofre influência dos fatores que afetam a expressão gênica. Sendo assim, tem sido considerada uma das mais viáveis para uso rotineiro, devido à sua rapidez e simplicidade na detecção de variabilidade genética, especialmente em organismos haplóides, como é o caso dos fungos (Coddington & Gould, 1992). Como exemplos da utilização desta técnica na caracterização de espécies fúngicas, podem ser citados os trabalhos de Guthrie *et al.* (1992), Schafer & Wostemeyer (1992), Grajal-Martin *et al.* (1993), Schilling *et al.* (1994) e Salgado *et al.* (1997), entre outros. Levantamentos da diversidade genética utilizando RAPD como marcador foram conduzidos com sucesso por Alzate-Marin *et al.* (1997), Santos *et al.* (1997), Faleiro *et al.* (1998) e Weir *et al.* (1998).

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 de marcadores RAPD, correlacionar tal aspecto com a origem geográfica dos mesmos, e ainda, diferenciá-los de um isolado de *F. verticillioides* por meio da técnica citada.

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 extrato de malte-ágar, MA (Smith & Onions, 1995) a 20 °C, fotoperíodo de 12 h de luz, por dez dias, em câmara incubadora do tipo BOD.

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

Cinco discos de meio MA, com 5 mm de diâmetro,

contendo micélio de *A. strictum* ou de *F. verticillioides* foram retirados da periferia de colônias com dez dias de idade e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de meio líquido, constituído por: NaNO₃ - 2 g/l; KH₂PO₄ - 1 g/l; MgSO₄ · 7H₂O - 0,5 g/l; sacarose - 15 g/l; água destilada 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 - 2 mg/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 na presença de areia de quartzo esterilizada e do antioxidante Polyvinylpyrrolidone (PVP). Na extração do DNA genômico, o micélio previamente macerado foi colocado em microtubo de 2 ml, preenchendo-o, no máximo, a um terço de seu volume total. Foram adicionados 1.300 µl de tampão de extração (1% de β-mercaptoetanol; 20 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 5 ml de NaCl 5M; 5 ml de EDTA 0,5 M; 5 ml de SDS 10%; 65 ml de água pura deionizada e esterilizada) ao microtubo de 2 ml, o qual foi agitado até a obtenção de um homogenato e mantido em temperatura ambiente por 30 min. A seguir, a mistura foi centrifugada a 16.000 g por 5 min e recolheu-se o sobrenadante em um novo microtubo, sendo seu volume completado para 1 ml com tampão de extração. Foram adicionados ½ vol (volume) de Tris saturado com fenol, pH 8,0 e mais ½ vol de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão por 5 min e, em seguida, procedeu-se à centrifugação por 5 min a 11.600 g, sendo a fase aquosa removida para um novo microtubo cujo volume foi completado para 1 ml com tampão de extração. Foram adicionados 20 µl de RNase (estoque: 5 mg/ml) e incubou-se por 45 min a 37 °C, misturando-se por inversão a cada 10 min. Adicionou-se 1 vol de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturando-se bem até a formação de uma emulsão. A mistura obtida foi centrifugada por 5 min a 11.600 g e a fase aquosa novamente coletada em novo microtubo de 2 ml, onde foram adicionados 100 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, misturando-se por inversão durante 5 min. O DNA foi precipitado pela adição de 1 ml de etanol (98%) gelado. Procedeu-se a uma nova centrifugação por 30 s a 16.000 g, descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o microtubo sobre papel toalha para secagem do pelete, o qual

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

Isolado	Origem da amostra	Localização	Altitude (m)	Genótipo do 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 ^{to} . Antônio Platina -PR	Norte	505	C 444
AS6	S ^{ta} . 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	-----

foi ressuspenso em 360 µl de TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1mM de EDTA, pH 8,0). Foram adicionados 180 µl de acetato de amônia, 7,5 M, misturando-se gentilmente por inversão. Manteve-se o microtubo em gelo por 10 min. A seguir, a mistura foi submetida a uma centrifugação por 20 min, a 16.000 g a 4 °C. O pelete formado foi descartado e o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5 ml, ao qual também foi adicionado 1 ml de etanol (98%) gelado. A mistura, homogeneizada por inversão, foi mantida a -20 °C por 12 h, sendo então submetida à centrifugação por 5 min, a 16.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo invertido sobre papel toalha para drenagem do pelete. Cada microtubo foi lavado com etanol (70%) gelado e centrifugado por 5 min, a 16.000 g a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o microtubo novamente invertido sobre papel toalha para a secagem final do pelete de DNA, o qual foi ressuspenso em 50 µl de TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM de EDTA, pH 8,0) e a concentração de DNA determinada em fluorímetro Hoefer, Dyna Quant 200 (Pharmacia). A reação de amplificação apresentava-se com um volume total de 23 µl e foi constituída por água ultrapura deionizada, 15,5 µl; tampão 5x, 2,5 µl; d-NTP's (100 µM cada), 1 µl; primer (0,4 µM), 1 µl; taq polimerase (1 unidade), 1 µl; e 2 µl de DNA (10 ng/µl). Foram testados os seguintes primers decâmeros de seqüência arbitrária da marca Operon Technologies Inc.: A-01; A-02; A-03; A-04; A-05; A-06; A-07; A-08; A-09; A-10; A-11; A-12; A-13; A-14; B-01; B-02; B-03; B-04; C-01; D-01; D-02; D-03; D-04; D-05; D-06; D-07; D-08; D-09; D-10; E-01; E-02; F-01; F-02; F-10; G-01; G-02; G-03; G-04; G-05; G-06; G-07; G-08 e G-10.

A amplificação baseou-se em Williams *et al.* (1990), utilizando um termociclador Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR System 2400, com a seguinte programação: 3 min a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação das fitas de DNA), 1 min a 36 °C (anelamento dos primers), 2 min a 72 °C (alongamento das novas fitas de DNA) e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1%, submetidos à eletroforese em tampão TBE (90 mM Tris-borato; 1 mM EDTA, pH 8,0), sendo posteriormente corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 min e descorados em água por 20 min. Os géis foram fotografados sob luz UV e avaliados quanto à ocorrência de bandas polimórficas entre os genótipos de *A. strictum* e *F. verticillioides*. Os dados do RAPD foram analisados e, considerando-se a presença (1) ou ausência (0) de bandas polimórficas, foi determinada a dissimilaridade genética dos isolados a partir da qual se construiu um dendrograma (UPGMA, NTSYS-pc, versão 2.02), utilizando o coeficiente Dice.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 43 primers testados, 30 amplificaram os fragmentos de DNA. Destes, 25 primers (OP-A02; OP-A03; OP-A04; OP-A05; OP-A07; OP-A09; OP-A10; OP-A11; OP-A12; OP-A13; OP-D01; OP-D02; OP-D04; OP-D05; OP-D07; OP-

D08; OP-E01; OP-F01; OP-F10; OP-G02; OP-G04; OP-G05; OP-G06; OP-G07 e OP-G08) geraram um total de 176 bandas polimórficas, utilizadas no cálculo das distâncias genéticas (Tabela 2) e na construção do dendrograma (Figura 2). Pela Figura 1 é possível observar exemplos de padrões de amplificação obtidos pelos primers OP-A05, OP-A07, OP-D07 e OP-G07. A grande maioria dos primers testados forneceu bandas exclusivas para os diferentes genótipos fúngicos, as quais futuramente poderão ser isoladas e utilizadas como sondas (SCAR), facilitando todo o processo de detecção e identificação dos mesmos. Estas observações permitiram confirmar a eficiência de marcadores RAPD aplicados ao estudo da genética de fungos, como tem sido relatado por outros autores (Vieira, 1996; Machado *et al.*, 1997; Faleiro *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 1998; Fungaro, 2000).

A distância genética relativa (dissimilaridade) entre os isolados de *A. strictum* variou entre 3,4% (AS1 e AS3) e 44,4% (AS2 e AS4) (Tabela 2). Assim sendo, a similaridade de 55,6 a 96,6% entre os isolados de *A. strictum* pode ser considerada elevada. Estes resultados indicam que é pouco provável a existência de alta variabilidade intraespecífica em *A. strictum*, ainda que tenham sido analisados poucos indivíduos. Foi possível constatar também 75,8% (AS2-FV11) a 87% (AS4-FV11) de polimorfismo (dissimilaridade) entre *A. strictum* e *F. verticillioides*.

Os resultados deste experimento, assim como aqueles obtidos por Alzate-Marin *et al.* (1997), Mesquita *et al.* (1998) e Faleiro *et al.* (1998) reforçam a eficiência da técnica de RAPD em detectar variabilidade intraespecífica. Baseando-se nos perfis de DNA (Figura 2), os 11 isolados fúngicos foram divididos em três grupos, considerando um limite arbitrário de 32,5% de distância relativa. Os isolados AS1, AS3, AS5, AS9, AS10, AS6, AS7 e AS2 formaram o grupo 1. O grupo 2 foi formado por AS4 e AS8, e o isolado FV11 constituiu o grupo 3.

A análise geral dos resultados obtidos neste experimento, permitiu observar que, na maioria dos casos, isolados

TABELA 2 - Distância genética (%) entre isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e *Fusarium verticillioides* (FV11), baseada no coeficiente de dissimilaridade Dice*

%	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	AS7	AS8	AS9	AS10
AS2	35,2									
AS3	3,4	34,7								
AS4	43,3	44,4	42,9							
AS5	26,3	27,2	27,2	32,9						
AS6	31,1	36,1	29,3	32,4	24,7					
AS7	29,7	32,0	29,3	30,9	23,4	28,0				
AS8	37,6	35,5	37,1	31,0	31,3	35,4	30,7			
AS9	35,3	28,9	34,8	32,3	14,1	27,5	30,4	32,2		
AS10	28,8	37,4	28,2	31,7	26,1	28,4	31,3	27,9	24,6	
FV11	82,7	75,8	83,9	87,0	78,2	82,9	77,6	86,0	80,0	86,8

* Primers utilizados na determinação da distância genética: OP-A02; OP-A03; OP-A04; OP-A05; OP-A07; OP-A09; OP-A10; OP-A11; OP-A12; OP-A13; OP-D01; OP-D02; OP-D04; OP-D05; OP-D07; OP-D08; OP-E01; OP-F01; OP-F10; OP-G02; OP-G04; OP-G05; OP-G06; OP-G07 e OP-G08.

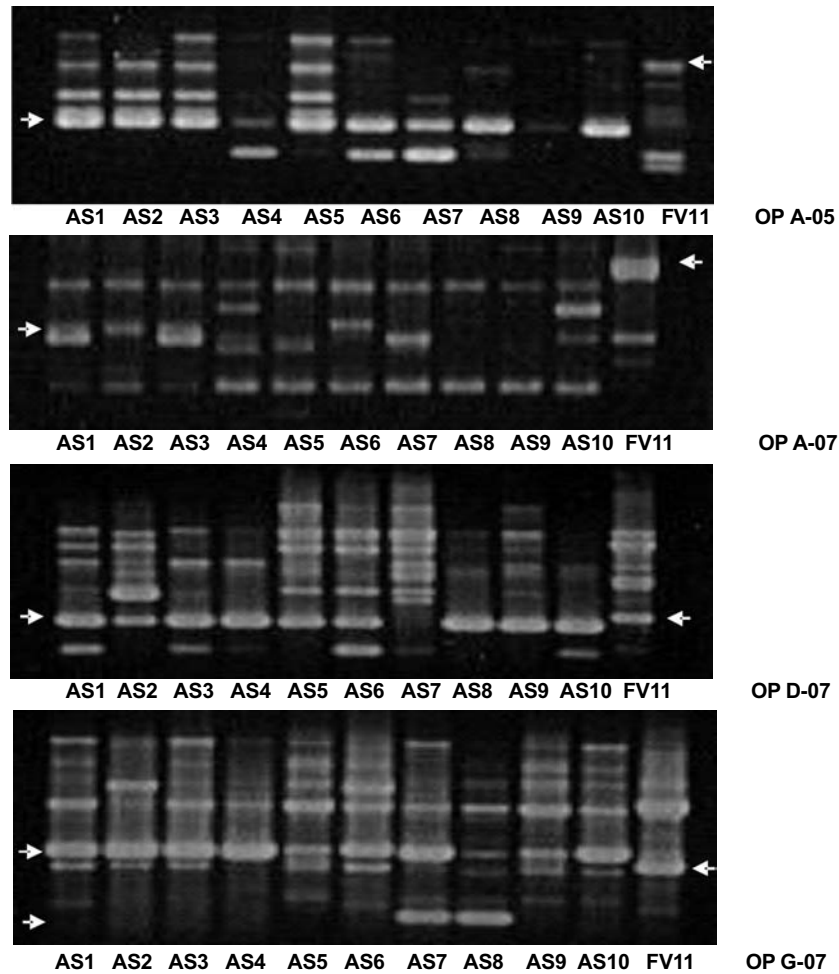


FIG. 1 - Produtos de amplificação do DNA genômico de isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e *Fusarium verticillioides* (FV11), utilizando os Primers Operon A-05, A-07, D-07 e G-07. As setas brancas exemplificam polimorfismos.

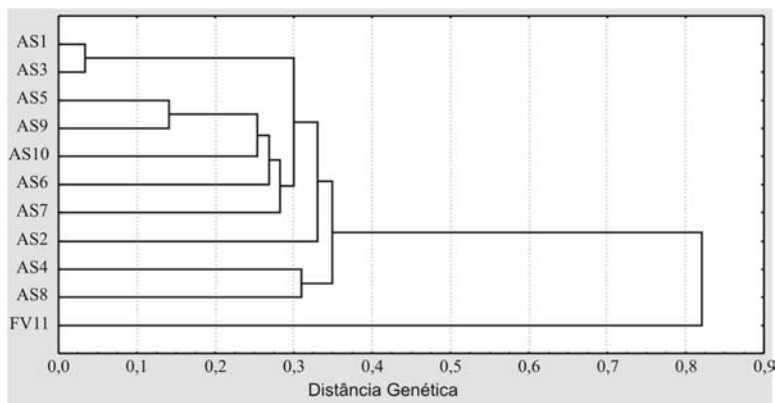


FIG. 2 - Agrupamento de isolados de *Acremonium strictum* (AS1 a AS10) e de *Fusarium verticillioides* (FV11), baseado nas distâncias genéticas (%) entre os indivíduos. Dados obtidos pela análise do DNA genômico por meio da técnica de RAPD. Primers utilizados na determinação da distância genética: OP-A02; OP-A03; OP-A04; OP-A05; OP-A07; OP-A09; OP-A10; OP-A11; OP-A12; OP-A13; OP-D01; OP-D02; OP-D04; OP-D05; OP-D07; OP-D08; OP-E01; OP-F01; OP-F10; OP-G02; OP-G04; OP-G05; OP-G06; OP-G07 e OP-G08.

de *A. strictum* provenientes de um mesmo estado (AS1 e AS2, ambos de Minas Gerais; AS3 e AS4, ambos de São Paulo) apresentaram perfis genotípicos 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. O agrupamento de isolados afins de *A. strictum*, baseando-se tão somente em marcadores genotípicos do tipo RAPD, não permitiu estabelecer um padrão específico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- CODDINGTON, A. & GOULD, D.S. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: Duncan, J.M. & Torrance, L. (Eds.). *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Cambridge University Press. 1992. pp.162-176.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J. de, MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus*, utilizando marcadores moleculares RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 23:386-390. 1998.
- FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento* 3:12-16. 2000.
- GRAJAL-MARTIN, M.J., SIMON, C.J. & MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology* 83:612-614. 1993.
- GUTHRIE, P.A.I., MAGILL, W.W., FREDERIKSEN, R.A. & ODVOODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 82:832-835. 1992.
- LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 72:319-321. 1966.
- MACHADO, M.A., BARROS, E.G. de, VASCONCELOS, M.J.V., GOMES, J.L.L. & MOREIRA, M.A. RAPD analysis for the characterization of *Cercospora sojina* isolates. *Fitopatologia Brasileira* 22:366-369. 1997.
- MESQUITA, A.G.G., FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J. de, RAFAGNIN, V.A., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. de. Use of molecular markers to differentiate *Colletotrichum lindemuthianum* races 89 and 69. *Fitopatologia Brasileira* 23:58-61. 1998.
- SALGADO, K.C.C., VIEIRA, M.G.G.C., SILVA-MANN, R. & MACHADO, J.C. Detecção e identificação de fungos transmitidos por sementes de algodoeiro através de marcadores RAPD, isoenzimas e proteína total. *Fitopatologia Brasileira* 22:303. 1997 (Resumo).
- SANTOS, B.A., ZAMBOLIM, L., BARROS, E.G. & VENTURA, J.A. Análise de DNA de isolados de *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas* resistentes ou não a benomyl. *Fitopatologia Brasileira* 22:305. 1997 (Resumo).
- SCHAFER, C. & WOSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *Journal of Phytopathology* 136:124-136. 1992.
- SCHILLING, A.G., MÖLLER, E.M. & GEIGER, H.H. RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*: application for genotyping and species identification. In: Schots, A., Dewey, F.M. & Oliver, R. (Eds.). *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification*. Cambridge. CAB International. 1994. pp.47-56.
- SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. *The preservation and maintenance of living fungi*. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1983.
- 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).
- 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.
- WEIR, T.L., HUFF, D.R., CHRIST, B.J. & ROMAINE, C.P. RAPD-PCR analysis of genetics variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* 90:813-821. 1998.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, J.K., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535. 1990.