

Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino com base em marcadores isoenzimáticos

Patrícia R.P. Rios³; Elineide B. Silveira¹; Luíza S.S. Martins²; Edson B. Silva Neto^{4*}; Andréa M.A. Gomes¹
UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE; ¹Depto. Biologia/Microbiologia, ²Depto. Biologia/Genética; ³Estudante bacharelado em Ciências Biológicas; ⁴Estudante Agronomia. E-mail: elineidebs@yahoo.com.br; * Bolsista Iniciação Científica CNPq/UFRPE.

RESUMO

O conhecimento da variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum lagenarium* é de grande importância para o sucesso de programas de melhoramento genético visando resistência à antracnose do pepino. Dezenove isolados de *C. lagenarium* oriundos de plantios comerciais de pepino da Zona da Mata e do Agreste de Pernambuco foram comparados por análise eletroforética de isoenzimas em gel de poliácridamida a 7%, utilizando os sistemas esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e malato desidrogenase. A avaliação foi realizada pelo número e pela posição das bandas reveladas nos géis, calculando-se a mobilidade relativa. As distâncias genéticas e similaridades foram sumarizadas em análises de agrupamento, utilizando-se o software NTSYS. A análise mostrou variação no número e posição das bandas no gel, dentro de cada sistema estudado, revelando diferenças fenotípicas dentro da população. As enzimas malato desidrogenase e fosfatase alcalina mostraram menor polimorfismo, enquanto, a esterase e fosfatase ácida apresentaram-se mais polimórficas. A análise de agrupamento permitiu separar os genótipos em cinco grupos distintos: 1 (CL1, CL3 e CL22), 2 (CL14), 3 (CL4, CL38, CL15, CL17, CL5, CL8, e CL10), 4 (CL28) e 5 (CL23, CL20, CL34, CL36, CL35, CL37, e CL16). O menor índice de similaridade genética (27,3%) foi observado entre o isolado CL1 e os isolados CL20, CL35, CL37 e CL16. O maior índice de similaridade (100%) foi observado entre os isolados CL5 e CL8; CL5 e CL10; CL8 e CL10; CL35 e CL37; CL35 e CL16; e entre CL37 e CL16.

Palavras-chave: *Cucumis sativus*, antracnose, isoenzimas, variabilidade.

ABSTRACT

Characterization of *Colletotrichum lagenarium* isolates of cucumber based on isoenzymatic markers

The knowledge of genetic variability of *Colletotrichum lagenarium* isolates is highly important for the success of the breeding programs for resistance to cucumber anthracnose. Nineteen isolates of *C. lagenarium* obtained from commercial fields of cucumber in Zona da Mata and Agreste of Pernambuco State, Brazil, were compared by isoenzyme electrophoretic analysis in polyacrylamide gel at 7%, using the systems esterase, acid phosphatase, alkaline phosphatase and malic dehydrogenase. The evaluation was based on the number and position of observed bands, calculating the relative motility. The genetic distances and similarities were summarized by grouping analysis, using the software NTSYS. The analysis showed variation in number and position of the bands on gel, for each studied system, revealing phenotypic differences in the population. The enzymes malic dehydrogenase and alkaline phosphatase showed lower polymorphism, while esterase and acid phosphatase were more polymorphic. The grouping analysis allowed to separate the genotypes in five different groups: 1 (CL1, CL3 and CL22), 2 (CL14), 3 (CL4, CL38, CL15, CL17, CL5, CL8, and CL10), 4 (CL28) and 5 (CL23, CL20, CL34, CL36, CL35, CL37, and CL16). The lower genetic similarity index (27.3%) was observed among isolates CL1 and CL20, CL35, CL37 and CL16 and the higher (100%), was observed among isolates CL5 and CL8; CL5 and CL10; CL8 and CL10; CL35 and CL37; CL35 and CL16 and, CL37 and CL16.

Keywords: *Cucumis sativus*, anthracnosis, isoenzymes, electrophoresis.

(Recebido para publicação em 5 de fevereiro de 2004 e aceito em 2 de setembro de 2004)

Colletotrichum lagenarium (Pass.) Penz. & Sacc. (Sin. *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx.), agente causal da antracnose, é um dos patógenos mais agressivos do pepino, contribuindo significativamente para perdas e redução da qualidade de frutos destinados ao mercado (Ferreira e Bolley, 2001). Aplicação de fungicidas sistêmicos e cultivares resistentes destacam-se como as medidas de controle mais eficientes da doença (Kurozawa e Pavan, 1997). Entretanto, por levar a seleção de populações resistentes o uso rotineiro de químicos deve ser evitado sempre que possível (Cardoso *et al.*, 1995), principal-

mente se a população do patógeno for muito variável. Desta forma, o conhecimento da extensão da diversidade genética dentro de uma população de fitopatógeno torna-se indispensável para o sucesso de programas de melhoramento, visando resistência a doenças (Brown, 1998) e de maneira geral, para o emprego eficiente de medidas de manejo de doenças de plantas.

Vários métodos são utilizados para identificar de forma rápida e precisa a variação genética dentro de uma mesma espécie, como o uso de marcadores moleculares e, dentre estes, os isoenzimáticos (Guzmán *et al.*, 1995).

Padrões de isoenzimas fúngicas utilizadas como caracteres de diagnóstico, apresentam variação diretamente relacionada à diversidade genética, mostrando diferenças ou similaridades específicas e expressando diretamente o genoma de um organismo (Rosendahl e Banke, 1998; Boshoff *et al.*, 1996). Expressões fenotípicas diferentes, reveladas através de padrões de isoenzimas entre isolados do gênero *Colletotrichum* de uma mesma população, já foram relatadas na literatura (Assis, 2001; Lima e Menezes, 2002; Couto, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar, através de padrões

Tabela 1. Mobilidade relativa das bandas de isoenzimas apresentadas pelos isolados de *Colletotrichum lagenarium* coletados de plantios comerciais de pepino oriundos das regiões da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco. Recife, UFRPE, 2001.

Isolados	Mobilidade relativa (Rf)											
	Esterase			Fosfatase alcalina		Fosfatase ácida					Malato desidrogenase	
	EST1	EST2	EST3	AKP1	AKP2	ACP1	ACP2	ACP3	ACP4	ACP5	MDH1	MDH2
CL1	-	-	97,7	4,2	21,4	-	-	-	21,4	37,1	25,7	35,7
CL3	-	-	97,7	4,2	21,4	-	-	-	21,4	-	25,7	35,7
CL4	30	74,4	97,7	4,2	21,4	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	35,7
CL5	-	74,4	97,7	4,2	21,4	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	35,7
CL7	-	-	-	4,2	21,4	37,1	-	-	21,4	-	25,7	-
CL8	-	-	97,7	4,2	21,4	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	-
CL10	-	-	97,7	4,2	21,4	37,1	21,4	2,8	21,4	-	25,7	35,7
CL14	-	-	97,7	4,2	-	-	21,4	-	21,4	-	25,7	35,7
CL15	30	74,4	97,7	4,2	21,4	37,1	-	-	21,4	-	25,7	35,7
CL28	30	74,4	97,7	-	21,4	-	-	-	21,4	-	25,7	35,7
CL22	-	-	97,7	-	21,4	-	-	-	21,4	-	25,7	35,7
CL23	30	74,4	97,7	-	-	37,1	21,4	-	21,4	-	25,7	35,7
CL38	30	74,4	97,7	4,2	21,4	37,1	21,4	-	21,4	-	25,7	35,7
CL20	30	74,4	97,7	-	-	-	21,4	-	21,4	-	25,7	-
CL34	30	74,4	97,7	-	-	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	35,7
CL35	30	74,4	97,7	-	-	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	35,7
CL36	30	74,4	97,7	-	21,4	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	-
CL37	30	74,4	97,7	-	-	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	-
CL16	30	74,4	97,7	-	-	37,1	-	2,8	21,4	-	25,7	-

eletroforéticos de isoenzimas, dezenove isolados de *C. lagenarium* oriundos de diferentes localidades do estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezenove isolados de *C. lagenarium*, oriundos de plantios comerciais de pepino com sintomas de antracnose, cultivados em diferentes regiões da Zona da Mata (CL1, CL3, CL4, CL5, CL8, CL22, CL23, CL28, CL34, CL35 e CL36) e do Agreste (CL7, CL10, CL14, CL15, CL16, CL20, CL37 e CL38) de Pernambuco, foram estudados quanto às atividades enzimáticas de esterase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida e malato desidrogenase. Os isolados foram cultivados em 50 ml de meio líquido batata-dextrose (BD), durante oito dias, a 28°C, sob luz contínua. Após o período de incubação, o crescimento fúngico foi filtrado, lavado com água destilada esterilizada e o excesso de umidade retirado com auxílio de papel de filtro. Para a obtenção dos extratos protéicos, 1 g de micélio fresco de cada um dos isolados foi individualmente macerado em almofariz mantido em

banho de gelo, adicionando-se 1 ml de solução tampão Tris-glicina (0,125 M, pH 8,2), 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP) e 300 mg de sacarose. Em seguida, os isolados foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga a frio de tubos (Eppendorf®) à temperatura de 4°C.

Em geral, para as análises eletroforéticas foi seguida a metodologia descrita por Alfenas *et al.* (1998). O gel de poli(acrilamida) a 5% foi preparado através da mistura de bis-acrilamida e acrilamida em solução tampão tris-glicina (0,125 M, pH 8,2) com adição de 0,1 ml de tetrametildiamina (TEMED) e 2,8 ml de persulfato de amônia a 1%. Após a polimerização do gel, 10 µL do extrato micelial dos isolados foram colocados em cada cavidade do gel. A eletroforese foi conduzida à temperatura de 4°C, mantendo-se a corrente constante de 10 mA, em cuba horizontal, contendo tampão Tris-glicina a 0,125 M e pH 8,2. Como marcador da corrida foi utilizado o azul de bromofenol.

Para detecção das bandas de esterase, o gel foi imerso na solução corante composta de 3,0 ml α e β -naftil

acetato a 1% em acetona 50%; 40 mg de fast blue RR salt; 50 ml de tampão fosfato de sódio monobásico 0,2 M, pH 4,3; 10 ml de tampão fosfato de sódio dibásico 0,2 M, pH 9,2 e 40 ml de água destilada, sendo em seguida incubado por duas horas no escuro a 37°C.

A fosfatase ácida foi detectada em gel imerso na solução corante de 100 mg de α -naftil fosfato ácido de sódio; 100 mg de fast garnet GBC salt; 1,0 ml de MgCl₂ a 1% e; 100 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. Em seguida, o gel foi incubado a 37°C por 60 minutos, no escuro.

Bandas de fosfatase alcalina, foram detectadas em gel corado em uma solução contendo 3 ml de α -naftil fosfato de sódio 1%, em acetona 50%; 100 mg de fast blue RR salt; 1,0 ml de MgCl₂ (1%); 1,0 ml de MnCl₂ (1%) e; 100 ml de tampão tris-HCl 0,05 M. Em seguida, foi incubado no escuro a 37°C, por duas horas.

Para detecção de malato desidrogenase, o gel foi imerso em solução de revelação contendo 100 ml de tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,5; 4,0 ml de tampão ácido málico 0,5 M, pH 8,0 (DL-ácido málico -10 g e água destila-

Tabela 2. Estimativas de similaridade genética entre 19 isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino para as enzimas esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e malato desidrogenase, estimados através do Software NTSYS. Recife, UFRPE, 2001.

	CL1	CL3	CL4	CL5	CL7	CL8	CL10	CL14	CL15	CL28	CL22	CL23	CL38	CL20	CL34	CL35	CL36	CL37	CL16	
CL1	1.000																			
CL3	0.857	1.000																		
CL4	0.545	0.600	1.000																	
CL5	0.667	0.750	0.800	1.000																
CL7	0.667	0.750	0.800	0.778	1.000															
CL8	0.667	0.750	0.800	1.000	0.778	1.000														
CL10	0.667	0.750	0.800	1.00	0.778	1.00	1.000													
CL14	0.625	0.714	0.455	0.556	0.556	0.556	0.556	1.000												
CL15	0.545	0.600	0.818	0.636	0.800	0.636	0.636	0.600	1.000											
CL28	0.556	0.625	0.700	0.500	0.667	0.500	0.500	0.444	0.700	1.000										
CL22	0.714	0.833	0.500	0.625	0.625	0.625	0.625	0.571	0.500	0.714	1.000									
CL23	0.364	0.400	0.636	0.445	0.600	0.455	0.455	0.556	0.800	0.667	0.444	1.000								
CL38	0.600	0.667	0.900	0.700	0.889	0.700	0.700	0.500	0.900	0.778	0.556	0.700	1.000							
CL20	0.274	0.300	0.545	0.364	0.364	0.364	0.364	0.444	0.545	0.556	0.333	0.667	0.455	1.000						
CL34	0.364	0.400	0.800	0.600	0.600	0.600	0.600	0.400	0.636	0.667	0.444	0.778	0.700	0.667	1.000					
CL35	0.273	0.300	0.700	0.500	0.500	0.500	0.500	0.300	0.545	0.556	0.333	0.667	0.600	0.750	0.875	1.000				
CL36	0.455	0.500	0.900	0.700	0.700	0.700	0.700	0.364	0.727	0.778	0.556	0.700	0.800	0.600	0.889	0.778	1.000			
CL37	0.273	0.300	0.700	0.500	0.500	0.500	0.500	0.300	0.545	0.556	0.333	0.667	0.600	0.750	0.875	1.000	0.778	1.000		
CL16	0.273	0.300	0.700	0.500	0.500	0.500	0.500	0.300	0.545	0.556	0.333	0.667	0.600	0.750	0.875	1.000	0.778	1.000	1.000	

da - 80 ml); 2 ml de NAD⁺ (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo); 2 ml de MTT (dimetil tiazol-difenil tetrazólio bromide) e; PMS (fenazina metossulfato). Em seguida, foi incubado no escuro a 30°C, por 3 horas.

As avaliações foram realizadas observando-se o número e posição das bandas formadas nos géis de poliacrilamida. O cálculo da mobilidade relativa (Rf) das bandas foi feito pela fórmula descrita por Alfenas *et al.* (1998): $Rf = (d/D) \times 100$, onde: d= distância percorrida pela molécula; D= distância percorrida pelo corante. Os isolados foram agrupados a partir dos fenótipos encontrados, utilizando-se o software NTSYS (Numerical Taxonomy System). Na análise, considerou-se cada fenótipo como uma variável, com valores 0= ausência e 1= presença do fenótipo por enzima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível caracterizar e agrupar os 19 isolados de *C. lagenarium* a partir dos quatro sistemas empregados. Os sistemas malato desidrogenase e fosfatase alcalina apresentaram menor polimorfismo, enquanto que nos sistemas esterase e fosfatase ácida foi verificado maior número de bandas (Tabela 1). De

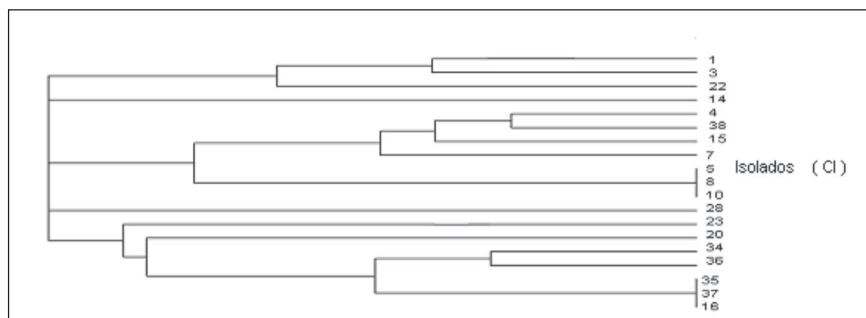


Figura 1. Dendrograma revelando a similaridade genética entre 19 isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino para as enzimas esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e malato desidrogenase, baseado no Software NTSYS (Numerical Taxonomy System). Recife, UFRPE, 2001.

acordo com Gottlieb (1981), essas duas últimas enzimas podem apresentar 10, 15 ou mais número de bandas, por possuírem locos gênicos que codificam diferentes formas moleculares.

Para o sistema esterase, foram observadas três regiões anódicas, designadas EST-1, EST-2 e EST-3, com mobilidades relativas 30; 74,4 e 97,7, respectivamente (Tabela 1). O sistema permitiu o agrupamento dos 19 genótipos em três fenótipos distintos. O primeiro fenótipo englobou os genótipos: CL1, CL3, CL7, CL8, CL10, CL14 e CL22, com apenas uma banda de esterase na região EST-3. O segundo fenótipo foi formado apenas pelo genótipo CL5, o

qual apresentou atividade enzimática nas regiões EST-2 e EST-3. Os demais genótipos, formaram o terceiro fenótipo, onde apresentaram atividade para esterase nas três regiões (EST-1, EST-2 e EST-3). É interessante ressaltar que todos os isolados formaram uma banda comum correspondente a EST-3 ($Rf=97,7$), sugerindo alta atividade da enzima nessa região do gel. Em geral, os isolados de *C. lagenarium* mostraram variabilidade genética, indicada pelo número e posições de bandas de esterase, porém guardando certa afinidade entre eles, mesmo sendo oriundos de áreas de cultivo e regiões geográficas distintas, indicando uma origem co-

mum dos mesmos. Do mesmo modo, Newton (1987) relata que, em fungos fitopatogênicos, o nível de variação intraespecífica para isoenzimas tem sido relativamente baixo. Contudo, Stasz *et al.* (1989) observaram alto nível de variação intraespecífica em isoenzimas, dentre elas esterase, em vários fungos, como por exemplo, *Trichoderma*.

No sistema fosfatase alcalina (Tabela 1) foram observadas duas regiões anódicas, designadas AKP-1 e AKP-2, com mobilidades relativas de 4,2 e 21,4 respectivamente. Os 19 genótipos foram agrupados em quatro fenótipos. O primeiro fenótipo foi constituído dos genótipos: CL1, CL3, CL4, CL5, CL7, CL8, CL10, CL15 e CL38, com duas bandas de atividade para fosfatase alcalina, na mesma posição da Rf do gel. O segundo fenótipo foi formado pelos genótipos CL28, CL22, e CL36, sendo observada bandas, apenas na região AKP-2. O terceiro fenótipo apresentou apenas o genótipo CL14, tendo atividade isoenzimática apenas na região AKP-1. Os demais isolados CL23, CL20, CL34, CL35, CL37 e CL19 não revelaram expressão gênica, ou seja, não tiveram atividade enzimática, para fosfatase alcalina, desse modo, formando o quarto grupo fenotípico.

Em relação a fosfatase ácida (Tabela 1), foram detectadas um total de duas regiões anódicas, designadas ACP-4 e ACP-5, com mobilidades relativas de 21,4 e 37,1, respectivamente, e três regiões catódicas, ACP-1, ACP-2 e ACP-3, com mobilidades relativas de 37,1; 21,4 e 2,8, respectivamente. O sistema apresentou cinco diferentes grupos fenotípicos. O primeiro grupo, foi formado pelos genótipos CL4, CL5, CL8, CL10, CL34, CL35, CL36, CL37 e CL16, com uma banda anódica na região ACP-4 e duas bandas catódicas nas regiões ACP-1 e ACP-3, apresentando a mesma mobilidade relativa no gel. Do mesmo modo os genótipos CL15, CL23 e CL38, mostraram serem idênticos, com uma banda anódica na região ACP-4 e duas bandas catódicas nas regiões ACP-1 e ACP-2, formando o segundo grupo fenotípico. O terceiro, quarto e quinto fenótipos, foram formados pelos genótipos CL1, CL14 e CL20, respectivamente. Vale ressaltar que apenas o

genótipo CL1 apresentou atividade na região ACP-5. Estes resultados sugerem a presença de tipos fisiológicos ou raças dentro da espécie *C. lagenarium*, analisada com base nos dados dos padrões para o sistema fosfatase ácida. Este sistema mostrou-se como o mais polimórfico. Geralmente, o número de fenótipos eletroforéticos detectados dentro do mesmo grupo de hospedeiros é pouco polimórfico, mesmo que os isolados apresentem variação de virulência e sejam de localidades geográficas diferentes, estes serão relativamente uniformes (Bonde *et al.*, 1991). No entanto, Kaufmann e Weidemann (1996) observaram um alto polimorfismo isoenzimático em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. de diferentes hospedeiros e de diferentes localidades geográficas. Esses resultados podem indicar a ocorrência da reprodução sexual ou algum outro mecanismo de recombinação gênica.

Para o sistema malato desidrogenase (Tabela 1), foram observadas duas regiões anódicas, designadas MDH-1 e MDH-2, com mobilidades relativas de 25,7 e 35,7, respectivamente. Foram observados dois fenótipos entre os 19 genótipos analisados. Os genótipos CL7, CL8, CL20, CL37 e CL16, apresentaram apenas uma banda de malato desidrogenase na região MDH-1, formando o primeiro fenótipo. Os demais genótipos, com duas bandas na mesma posição do gel formaram o segundo fenótipo para este sistema. Todos genótipos revelaram bandas comuns na região MDH-1, com forte coloração, demonstrando alta atividade enzimática nessa região.

Na análise de agrupamento foi observada a distribuição dos 19 genótipos em grupos de maior e menor proximidade genética. De acordo com o dendograma os genes expressos pelas isoenzimas analisadas permitiram separar os genótipos em cinco grupos distintos. O primeiro formado pelos genótipos CL1, CL3 e CL22; o segundo formado apenas pelo genótipo CL14; o terceiro formado pelos genótipos CL4, CL38, CL15, CL17, CL5, CL8, e CL10; o genótipo CL28 formou o quarto grupo e os genótipos CL23, CL20, CL34, CL36, CL35, CL37, e CL16 formaram

o quinto grupo (Figura 1). A análise permitiu verificar que dentro de um mesmo grupo encontram-se isolados originários de diferentes regiões de Pernambuco, como, por exemplo, o grupo três, representado por isolados da Zona da Mata (CL4, CL38 e CL5) e do Agreste (CL15, CL17, CL8 e CL10), indicando haver similaridade entre isolados de regiões geográficas distintas.

Os índices de similaridade genética entre os 19 isolados de *C. lagenarium*, expressos pela percentagem de variantes idênticas em cada par comparado, em relação ao número total encontrados são mostrados na Tabela 2. O menor índice de similaridade genética (27,3%) foi observado entre o isolado CL1 e os isolados CL20, CL35, CL37 e CL16. o maior índice de similaridade (100%) foi observado entre os isolados CL5 e CL8; CL5 e CL10; CL8 e CL10; CL35 e CL37; CL35 e CL16; e entre CL37 e CL16.

É sabido que a mobilidade das bandas isoenzimáticas reveladas no gel está condicionada ao tamanho da molécula, constituindo os Rfs obtidos pela distância percorrida, através da eletroforese, um critério importante para identificação de diferenças e similaridades de isolados dentro de uma mesma espécie (Alfenas, 1998). Entretanto, este critério não significa igualdade genética entre os isolados, pois existem outros fatores a serem considerados, como a densidade de concentração da enzima, condições nucleares, nível de ploidia e da constituição genética do organismo, além de outros fatores. Embora, cada genótipo some peculiaridades representadas por biótipos, acredita-se que a separação dos isolados em cinco grupos seja explicada pelo somatório de outras características, tais como características patogênicas, fisiológicas, morfológicas ou possivelmente da existência de raças diferentes de *C. lagenarium*, apesar de serem oriundos da mesma espécie botânica, porém de localidades geográficas diferentes. Couto (2002), observou expressões fenotípicas diferentes entre isolados de *Colletotrichum musae* (Berk. e Curtis) von Arx., reforçando a hipótese da existência de raças fisiológicas dentro da população estudada. A provável existência de raças fisiológi-

cas de *C. lagenarium* na Zona da Mata e do Agreste de Pernambuco indica a necessidade da utilização de um grande número de isolados do patógeno no estudo de medidas de controle integrado da antracnose em pepino.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam os seus agradecimentos à FACEPE e ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro e por bolsa de Iniciação Científica PIBIC/UFRPE, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins - fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.
- ASSIS, T.C. *Variabilidade de isolados de Colletotrichum gloeosporioides, agente da antracnose em frutos de mangueira, quanto à utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD*. 2001, 67 p. (Tese mestrado), UFRPE, Recife.
- BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; MAAS, J.L. Isozyme comparisons for identification of *colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*, v.81, p.1523-1528, 1991.
- BOSHOF, W.H.P.; SWART, W.J.; PETRORIUS, Z.A.; LIEBENBERG, M.M.; CRONS, P.W. Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in sothern Africa. *Plant Pathology*, n.45, p.344-349, 1996.
- BROWN, J.K.M. Surveys of variation in pathogen population and their application to disease control. In: JONES, G., ed. *The epidemiology of plant diseases*. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.73-102.
- CARDOSO, A.I.I.; DELLA VECCHIA, P.T.; FARIA, L.P. Herança de coloração de bulbos em cebola (*Allium cepa* L.) com resistência a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Scientia Agricola*, v.52, p.384-386, 1995.
- COUTO, E.F. *Estudo Comparativo de Isolados de Colletotrichum musae através de caracteres patogênicos, enzimáticos, fisiomorfológicos e molecular*. 2002, 87 p. (Tese mestrado). UFRPE, Recife.
- FERREIRA, S.A.; BOLLEY, R.A. *Colletotrichum lagenarium*. Department of plant Pathology. University of Hawaii at Manoa. Disponível em: <<http://www.exfento.hawaii.edu/rbase>>. Acesso em: 10 fev. 2001.
- GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, S.R.; MANDELA, D.; MANKANDAEIRE, A.B.C.; GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*, v.85, n.5, p.600-607. 1995.
- GOTTLIEB, L.D. Gene number in species of asterase that have different chromosome numbers. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, v.78, n.6, p.3726-3729, 1981.
- KAUFMANN, P.J.; WEIDEMANN, G.J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. *Plant Disease*, v.80, n.11, p.1289-1293, 1996.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças das curcubitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M (Eds.). *Manual de fitopatologia*. 3ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997.v.2. p.325-327.
- LIMA, M.L.F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, n.1, p.12-16, 2002.
- NEWTON, A.C. Markers in pathogen populations. In: DAY, P.R.; JELLIS, G.J. (Eds.). *Genetics and Plant Pathogenesis*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. p.187-194.
- ROSENDHAL, S.; BANKE, S. Use of isozymes in fungal taxonomy and population studies. In: FRISVAD, I.C.; BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K. (Eds.) *Chemical fungal taxonomy*. New York: Marcel Dekker, 1998. p.107-120.
- STASZ, T.E.; NIXON, K.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F.; KUTER, J.A. Evaluation on phonetic species and phylogenetic relationships in the genus *Tricoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. *Micologia*, v.81, p.391-403. 1989.