

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE *CITRUS* spp. E
GUIGNARDIA spp.

Fernanda Dias Pereira
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE *CITRUS* spp. E
GUIGNARDIA spp.

Fernanda Dias Pereira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana Giuliatti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

P436a Pereira, Fernanda Dias
Análise Filogenética entre *Citrus* spp. e *Guignardia* spp. / Fernanda
Dias Pereira. -- Jaboticabal, 2012
ix, 73 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: Silvana Giuliatti
Banca examinadora: Ana Lilia Alzate Marin, Gabriella Souza Cintra
Bibliografia

1. Patossistema. 2. AFLP. 3. Região ITS1-5.8S-ITS2. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA DIAS PEREIRA - nasceu em Jaboticabal-SP, no dia oito de maio de 1985. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal em 2009. Em março de 2010 iniciou o mestrado, nesta mesma instituição, no Programa de Pós-graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos meus pais, José Roberto e Tania, e aos meus irmãos, Junior e Roberta, pelo apoio, encorajamento, amor e ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.

E especialmente ao meu amor, Diego César, por todo carinho, compreensão e pela companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização de mais um sonho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa oportunidade e vitória concedida.

À Prof^a. Dr^a. Silvana Giuliatti pela orientação, paciência e confiança durante todo o período do desenvolvimento deste trabalho.

Ao doutorando Ronai Ferreira Ramos, por toda contribuição, dedicação e amizade durante esses dois anos. Sem sua ajuda tudo seria mais difícil!

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, por disponibilizar seu laboratório e pelas contribuições valiosas.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lilia Alzte Marin, por me receber em seu laboratório e por toda a colaboração durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes, pelos valiosos ensinamentos, disposição em todo momento e por contribuir para meu crescimento profissional.

À Dr^a. Luciana Rossini Pinto, do IAC - Ribeirão Preto, e a Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni, da UNAERP, pela contribuição na etapa dos marcadores AFLP.

À Dr^a. Marinês Bastinanel, do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, pela disponibilidade e auxílio na coleta das amostras foliares.

À Bruna Souza Gonçalves e Patrícia Calligioni de Mendonça, pela ajuda na execução dos experimentos de AFLP.

Aos amigos, do Laboratório de Bioinformática da FMRP-USP: Iuliana, Gabriela, Fernando, e em especial, o Nilson e Daniel, pela amizade, disponibilidade e

contribuições.

Aos amigos do Laboratório de Genética Vegetal da FMRP-USP: Ronai, Marcela, Juliana e Rômulo, pela ajuda, amizade, carinho e auxílio sempre que precisei.

À FCAV-UNESP e FMRP-USP, pela oportunidade e espaço cedido.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu esposo, Diego César, que sempre acompanha meus passos, e me ajuda a superar cada novo obstáculo.

Aos meus irmãos Junior e Roberta, pelo carinho e incentivo.

A toda minha família, que de perto ou de longe acompanhou meus passos e me deu apoio.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. <i>Citrus</i> spp.....	6
3.2. Mancha Preta dos Citros.....	10
3.3. O Gênero <i>Guignardia</i>	12
3.3.1. <i>Guignardia citricarpa</i>	13
3.3.2. <i>Guignardia mangiferae</i>	15
3.4. Técnicas Moleculares Empregadas.....	16
3.4.1. Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	16
3.4.2. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.....	18
3.5. Análises Filogenéticas.....	19
3.5.1. Máxima Parcimônia.....	20
3.5.2. Análise de Bootstrap.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Isolamento de <i>Guignardia</i> spp. e teste do meio aveia-água.....	22
4.2. Extração do DNA.....	23
4.3. Marcador Molecular do tipo AFLP.....	23
4.4. Amplificação, purificação e sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2.....	29
4.5. Análises Filogenéticas.....	30
4.5.1. Alinhamento das sequências.....	30
4.5.2. Análises Filogenéticas da região ITS1-5.8S-ITS2.....	30
4.5.3. Análise dos fragmentos de AFLP.....	31
4.6. Diagrama das principais etapas realizadas.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

5.1. Isolamento de <i>Guignardia</i> spp. e teste do meio aveia-ágar.....	33
5.2. Comparação entre as metodologias de coloração do gel de poliacrilamida.....	34
5.3. <i>Citrus</i> spp. – Análise da região ITS 1-5.8S-ITS2.....	37
5.4. <i>Citrus</i> spp. – Análise de AFLP.....	38
5.5. <i>Guignardia</i> spp. – Análise da região ITS1-5.8S-ITS-2.....	39
5.6. <i>Guignardia</i> spp. - Análise de AFLP.....	41
5.7. Associação entre as análises filogenéticas.....	43
6. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE *CITRUS* spp. E *GUIGNARDIA* spp.

RESUMO – A citricultura brasileira representa um importante segmento econômico na pauta de produtos agrícolas, não só por seu expressivo valor de produção, como por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos. No mundo, o Brasil destaca-se como maior produtor de citros, e exportador de suco concentrado de laranja. Entretanto, a citricultura ressenete-se de problemas complexos, de natureza diversa, com particular destaque para o de ordem fitossanitária. Dentre esses problemas destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*. A doença deprecia os frutos para o mercado *in natura* e restringe a possibilidade de exportação. Além disso, provoca a queda prematura dos frutos e eleva o custo de produção devido à necessidade de controle. O presente trabalho teve o objetivo de estabelecer relações filogenéticas entre *Citrus* spp. e *Guignardia* spp., entender a origem evolutiva do patossistema *Citrus* – *G. citricarpa*, bem como avaliar a ocorrência de *G. citricarpa* como patógeno em momentos distintos na história evolutiva de *Citrus*. Os dados filogenéticos foram gerados utilizando-se marcadores moleculares do tipo AFLP e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, em ambos os gêneros. As análises filogenéticas foram realizadas no programa PAUP* v.4.0b10. Os resultados das análises filogenéticas utilizando AFLP foram mais informativos que aqueles gerados com base no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, tanto para *Citrus* quanto para *Guignardia*. As análises de AFLP permitem concluir que *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, isoladas de *C. medica*, apresentam maior distância filogenética em relação aos isolados das outras espécies cítricas. A evolução do patossistema *Citrus*/*Guignardia* não pôde ser estabelecida, de forma geral, por meio da associação das filogenias geradas para *Citrus* spp. e *Guignardia* spp., exceto no caso particular dos isolados de *C. medica*, que obedecem a um padrão associativo na relação patógeno/endofítico.

Palavras-Chave: Patossistema, AFLP, região ITS1-5.8S-ITS2 e co-evolução.

PHYLOGENETIC ANALYSIS BETWEEN *CITRUS* spp. AND *GUIGNARDIA* spp.

SUMMARY- The Brazilian citriculture represents an important economic sector in the agenda of agricultural products, not only for its impressive production value, for its importance in generating direct and indirect jobs. In the world, Brazil stands out as the largest citrus producer and exporter of concentrated orange juice. However, the citriculture suffers from complex problems of diverse nature, with particular emphasis on plant health. Among these problems highlight the Black Spot of Citrus (BSC), caused by the fungus *Guignardia citricarpa*. The disease depreciates the fruit for the fresh market and restricts the ability to export. Furthermore, causes the fall premature fruit and raises the cost of production due to need for control. This study aimed to establish phylogenetic relationships between Citrus and Guignardia, understanding the evolutionary origin of pathosystem *Citrus* - *G. citricarpa*, and to evaluate the occurrence of *G. citricarpa* pathogen at different period in evolutionary history of *Citrus*. The phylogenetic data were generate for both genera using AFLP molecular markers and ITS1-5.8S-ITS2 sequencing . Phylogenetic analysis were performed in the PAUP * v.4.0b10 program. The phylogenetic analysis using AFLP were more informative than ITS1-5.8S-ITS2 sequencing in both genera *Citrus* and *Guignardia*. The AFLP analysis conclude that *G. citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *C. medica* presents a larger phylogenetic distance if compared to the other citrus spp. strains. The evolution of the pathosystem *Citrus/Guignardia* could not be established, in general, through the association of phylogenies generated for *Citrus* spp. and *Guignardia* spp. except in the particular case of bo isolated from *C. medica*, which follow a pattern of associations in pathogen/endophyte.

Keywords: Pathosystem, AFLP, ITS1-5.8S-ITS2 region and co-evolution.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro. A cadeia citrícola movimenta, anualmente, quase 15 bilhões de dólares, gerando 230 mil empregos e contribuindo para o desenvolvimento do país e sua inserção na economia internacional (CITRUSBR, 2010). De acordo com o Instituto Brasileiro de Estatísticas e Geografia (IBGE), em 2010, o Brasil foi o maior produtor de laranja do mundo, produzindo mais de 40 bilhões de toneladas da fruta.

O estado de São Paulo é o principal produtor de laranja, responsável por, aproximadamente, 80% da produção nacional. Em 2010, teve uma expressiva participação de 95% no valor das exportações de suco (US\$ 1,68 bilhão). Além disso, o Estado detém 53% do mercado mundial de suco de laranja (TORRES, 2011).

Não obstante, o setor citrícola ressenete-se de problemas complexos, de natureza diversa, com particular destaque para o de ordem fitossanitária. Dentre esses problemas, destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. Essa doença reduz a produtividade dos pomares, deprecia os frutos destinados ao mercado de frutas frescas e onera, de forma considerável, o custo de produção. Como agravante, trata-se de doença classificada como quarentenária A1 pela União Européia, o que vem ocasionando restrições nas exportações de frutos cítricos brasileiros.

Devido aos elevados prejuízos causados pela MPC e à dificuldade de seu controle, torna-se indispensável buscar novas alternativas para o combate dessa doença. Até o presente, não há relatos sobre variedades com características agrônômicas desejáveis, bem aceita no mercado de frutas frescas e que possa ser aproveitada no processo de produção de suco concentrado, aliado à resistência às principais doenças, especialmente à MPC.

Com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e seus híbridos, praticamente todas as demais espécies e variedades de citros são suscetíveis ao

patógeno (KOTZÉ, 1981). As laranjeiras doces (*Citrus sinensis* L.) e os limões verdadeiros [*C. limon* (L.) Burn] são, de modo geral, muito suscetíveis ao fungo. Entretanto, no caso da lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), tem-se observado que, mesmo em áreas de elevada pressão de inóculo, a espécie não tem expressado sintomas aparentes, seja nas folhas, ramos ou nos frutos. Embora a lima ácida 'Tahiti' mostre-se assintomática em relação a *G. citricarpa*, Baldassari et al. (2008) encontrou isolados patogênicos colonizando a planta, concluindo que, mesmo não apresentando sintomas característicos de MPC, em *Citrus latifolia* podem coexistir *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. Além disso, esses autores verificaram que tanto *G. citricarpa* como *G. mangiferae* são capazes de produzir ascósporos viáveis em folhas de lima ácida 'Tahiti' em decomposição, e que, embora esta variedade cítrica não seja sintomaticamente afetada, ela tem um papel representativo na epidemiologia de *G. citricarpa*, cuja magnitude ainda é desconhecida.

Mesmo obtendo-se resultados satisfatórios de controle quando se emprega fungicida, o custo da produção é elevado, e consideráveis danos ao meio ambiente são causados, o que eleva o risco da atividade citrícola no Estado de São Paulo. Além disso, a aplicação regular de fungicidas causa uma pressão de seleção sobre a população de patógenos, alterando a estrutura da população e aumentando a probabilidade de aparecimento de formas resistentes. A seleção de formas resistentes pode ser potencializada pelo aumento da pressão de inóculo e pela existência das formas teleomórfica (*Guignardia citricarpa*) e anamórfica (*Phyllosticta citricarpa*). Assim, observa-se que a citricultura dos dias atuais, praticada de maneira intensiva e extensiva, quando se depara com doenças como a MPC, necessita integrar todos os métodos de controle disponíveis, almejando a maximização de resultados e a consequente sustentação da atividade agrícola.

Do ponto de vista prático, o uso de caracteres morfológicos tem sido suficiente para distinção de ambas as formas do fungo, embora demande uma maior quantidade de tempo. Entretanto, genética e molecularmente existem ainda

muitas dúvidas a serem esclarecidas em relação ao patossistema *Citrus* – *G. citricarpa*.

No âmbito genético, uma questão imprescindível a ser estudada se refere ao fungo *G. citricarpa* e sua interação com o hospedeiro *Citrus* spp., sobretudo para *C. aurantium* (laranja ‘azedo’) e *C. latifolia* (lima ácida ‘Tahiti’), que, segundo Aguilar-Vildoso et al. (2002), têm se mostrado resistentes ao patógeno. Segundo Wickert et al. (2009), *G. citricarpa* foi encontrada unicamente nos citros, enquanto *G. mangiferae* foi encontrada em diversos hospedeiros como: *Eucalyptus* sp., *Psidium guajava* (goiaba), *Plinia cauliflora* (jaboticaba), *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Mangifera indica* (manga).

No caso de genomas eucariotos, as regiões codificadoras do RNA ribossômico (rDNA) e seus espaços internos transcritos (ITS) e, em alguns casos os espaços intergênicos (IGS), têm sido utilizados para estudos de estrutura de populações, estabelecimento de filogenias e processos evolutivos. Outra metodologia bastante substancial está pautada na utilização de marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Essa técnica é uma combinação da PCR com o RFLP, com base na análise de restrição (RFLP) e posterior amplificação via PCR de fragmentos de DNA selecionados do total de fragmentos obtidos da restrição.

Nos últimos anos, grandes conquistas nessa área vêm sendo obtidas com o desenvolvimento da bioinformática e de métodos de sequenciamento automático de DNA, cada vez mais eficientes. Os dados gerados a partir dos diversos Projetos Genomas e disponíveis publicamente acumulam informações biológicas, completas e atualizadas, e de importância vital para a pesquisa. Também é grande o volume e a variedade de proteínas estudadas e que apresentam detalhes quanto à sua estrutura e função disponíveis na literatura científica. Neste sentido, a bioinformática é uma área de extrema importância, sendo hoje impossível pensar em informação biológica sem pensar em organização, acessibilidade e capacidade de análise deste grande volume de dados. Ferramentas que auxiliam nesses processos são cruciais para o sucesso em

todos os passos da era genômica e pós-genômica. A interação de especialistas de diversas áreas reflete o caráter multidisciplinar da bioinformática, e somente o reconhecimento desta interação poderá lidar adequadamente com questões importantes da biologia moderna. O desenvolvimento de métodos computacionais eficientes e sensíveis para a análise de bancos é hoje importante e necessário. A análise de sequências que compreende um largo universo, desde algoritmos simples até os mais complexos, mostra-se como um destaque das ferramentas de bioinformática no auxílio da construção e associação de filogenias.

A filogenia destaca-se como uma importante ferramenta para o estudo e a compreensão das relações evolutivas entre organismos e grupos taxonômicos. As análises filogenéticas têm por objetivo estabelecer a hierarquia evolutiva e o grau de parentesco entre espécies estudadas.

Entretanto, na literatura são encontrados apenas trabalhos que abordam de forma distinta as filogenias de *Citrus* spp., (ARAUJO & MACHADO, 1999; BAYER et al., 2009), e de *Guignardia* spp. (WICKERT et al., 2009). Portanto, ressurte-se a ausência de estudos voltados para o cruzamento destas filogenias avaliando a evolução do patossistema. Neste sentido, o presente estudo é pioneiro nesta proposta.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer, por meio de análises filogenéticas entre *Citrus* spp. e *Guignardia* spp., a origem evolutiva do patossistema *Citrus* – *G. citricarpa*, bem como, avaliar a ocorrência de *G. citricarpa* como patógeno em momentos distintos da história evolutiva de *Citrus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Citrus* spp.

As plantas cítricas como as do gênero *Citrus*, os kunquats (*Fortunella*), o trifoliata (*Poncirus*) e outros gêneros relativos à subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, são nativas do sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do Centro da China ao Japão, e do Leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE & REECE, 1967; SCORA, 1975; SOOST & CAMERON, 1975).

O *Citrus* é representado por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial. Os representantes desse gênero possuem um conjunto básico cromossômico $x = 9$, sendo relatados poucos indivíduos triplóides e tetraplóides na natureza.

Observa-se grande complexidade na classificação desse grupo de plantas. Sendo assim, diferentes sistemas taxonômicos têm sugerido um número variável de espécies, sendo descritas de 11 até mesmo 162 espécies distintas.

Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* deve-se a particularidades de sua biologia reprodutiva e à sua ampla história de cultivo. Seus representantes apresentam grande intercompatibilidade sexual, o que possibilita a origem natural de híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução do grupo. Alguns híbridos são férteis por embriões derivados do zigoto ou podem tornar-se férteis pela formação espontânea de embriões nucelares, que contribuem para manter a estabilidade genética e perpetuar os híbridos como clones apomíticos. Algumas linhagens de híbridos receberam o *status* de espécie.

Um dos sistemas de classificação mais utilizado, proposto por Swingle (1943), reconheceu 16 espécies para *Citrus* e classificou-as entre os seis gêneros que compunham o grupo subtribal denominado “árvores de citros verdadeiros”

(*true citrus fruit trees*), subtribo Citrinae, tribo Citreae, subfamília Aurantioideae da família Rutaceae (SWINGLE & REECE, 1967).

Atualmente, uma reavaliação dos sistemas de classificação tem sido feita com base em estudos filogenéticos, apoiados por dados morfológicos, quimiotaxonômicos e macromoleculares. Alguns desses estudos indicam que *Citrus* é um grupo artificial, uma vez que nem todos os seus representantes naturais, que possuem ancestralidade comum, estão incluídos nesse táxon (MABBERLEY, 1998; ARAÚJO et al., 2003).

Linnaeus em 1753 e, posteriormente, Hooker em 1875, atribuíram três e quatro espécies ao gênero, respectivamente (SWINGLE & REECE, 1967 citado por CORAZZA-NUNES et al., 2005). No sistema clássico de Engler (1931), 11 espécies foram descritas. Atualmente, o sistema mais utilizado para taxonomia de *Citrus* é o de Swingle, que, em 1943, propôs 16 espécies distribuídas em dois subgêneros: *Citrus*, com 10 espécies, e *Papeda*, com seis. Essa subdivisão se baseou em caracteres dos representantes do subgênero *Papeda*, tais como presença de óleo acrídico nos frutos, grande pecíolo alado, inflorescência pequena e frutos contendo vesículas com agregação de gotas de sabor não palatável. Diferindo extremamente desses sistemas, Tanaka (1977) propôs para o gênero a existência de 162 espécies, distribuídas nas seções *papeda*, *limonellus*, *citrophorum*, *cephalocitrus* e *aurantium* do subgênero *Archicitrus* e nas seções *osmocitrus*, *acrumen* e *pseudofortunella* do subgênero *Metacitrus* (CORAZZA-NUNES et al., 2005).

Análises filogenéticas conduzidas mediante a utilização de marcadores RAPDs e SCARs suportaram a divisão de *Citrus* nos subgêneros *Citrus* e *Papeda*, conforme proposto por Swingle, exceto para *C. celebica* e *C. indica* (NICOLOSI et al., 2000). No entanto, as análises conduzidas por cpDNA separaram os genótipos de *Citrus* nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*, de acordo com Tanaka (1977); e, conseqüentemente, não suportaram a divisão *Citrus* e *Papeda*. Semelhantemente, os estudos moleculares de Araújo et al. (2003) também não corroboraram a divisão de subgêneros proposta por Swingle (1943). Nesses dois

estudos, porém, *C. medica* apresentou uma posição isolada no clado *Citrus*, representado pelos demais táxons de *Citrus* e gêneros correlatos, conforme previamente observado por análise de cloroplasto (GREEN et al., 1986; HANDA et al., 1986) e mitocondrial (YAMAMOTO et al., 1993). Considerando a posição isolada de *C. medica*, Araújo et al. (2003) sugeriram uma classificação mais ampla para *Citrus*, incluindo os representantes dos gêneros *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus*. Entretanto, estudos morfológicos (BARRET & RHODES, 1976) e moleculares (HERRERO et al., 1996; FEDERICI et al., 1998; NICOLOSI et al., 2000) sugeriram que *Fortunella* está, filogeneticamente, mais relacionado a *Citrus* do que os demais gêneros correlatos. Corroborando com esses dados, os estudos de Pang et al. (2003), através de marcadores SSR, revelaram que *Microcitrus* está, estritamente, relacionado com *Citrus*, enquanto *Poncirus* está distante dele. Esses autores consideraram que, provavelmente, *Poncirus* não se originou do gênero *Citrus*.

O número variável de espécies observada nos sistemas de classificação de Swingle (1943) e Tanaka (1977) deve-se ao fato de que o primeiro considerou muitos dos representantes do grupo *Citrus* como híbridos, enquanto Tanaka os classificou como espécies verdadeiras. Todavia, estudos posteriores com base em dados bioquímicos, morfológicos e moleculares têm sugerido uma redução ainda maior nesse número de espécies (CORAZZA-NUNES et al., 2005).

O estudo de 146 caracteres morfológicos e bioquímicos propôs a existência de três grupos de importância comercial em *Citrus*: o *Citrus medica* L. (*C. medica* L., *C. aurantifolia* L. e *C. limon* Burm. f.), o grupo de *Citrus reticulata* Blanco (*C. reticulata* Blanco, *C. sinensis* (L.) Osbeck, *C. paradisi* Macf., *C. aurantium* L. e *C. jambhiri* Lush.) e o grupo *C. grandis* L. Osbeck (BARRET & RHODES, 1976). Posteriormente, estudos utilizando isoenzimas (TORRES et al., 1978; HERRERO et al., 1996), marcadores RAPD, SCAR e análises de genoma de organelas (GREEN et al., 1986; YAMAMOTO et al., 1993; NICOLOSI et al., 2000) e microssatélites (FANG et al., 1998) sugeriram que *C. medica* L., *C. reticulata* Blanco e *C. grandis* L. Osbeck são as espécies originais do gênero *Citrus*.

Concomitantemente, Scora et al. (1988) propuseram uma quarta espécie verdadeira de *Citrus*, *C. halimii* Stone. Assim, as demais espécies seriam híbridos naturais, originados do cruzamento entre essas espécies básicas e propagados, vegetativamente, por meio de apomixia (NICOLOSI et al., 2000).

As principais espécies cultivadas de citros, *C. sinensis* (L.) Osbeck (laranjas-doce) e *C. aurantium* L. (laranja-azeda), são originadas predominantemente através da introgressão de genes de *C. grandis* Osbeck (toranja) como parental materno e de *C. reticulata* Blanco, conforme dados confirmados por Nicolosi et al. (2000) mediante marcadores RAPD, SCAR e cpDNA. Já as limas, *C. aurantifolia* Christm., originaram-se, provavelmente, de um cruzamento tri-híbrido intergenérico envolvendo *C. medica* (cidra), *C. grandis* (toranja) e uma espécie de *Microcitrus* (BARRET & RHODES, 1976 citado por CORAZZA-NUNES et al., 2005). Os marcadores RAPD e SCAR detectados em lima ácida Galego estavam também presentes em cidra e *C. micrantha* (Papeda), sugerindo que essas espécies foram os parentais de limas (NICOLOSI et al., 2000). Posteriormente, a confirmação de que cidra é um dos parentais de limas foi feita por estudos envolvendo marcadores RFLP e RAPD (FEDERICI et al., 1998).

De acordo com Barret & Rhodes (1976), os limões, *C. limon* (L.) Burm f., seriam híbridos complexos, apresentando grande proporção de genes de cidra. Já para Nicolosi et al. (2000) os limões se originaram de cidra e laranja-azeda, sendo este último o parental materno. A origem polifilética para limões foi confirmada por meio de isoenzimas (TORRES et al., 1978) e de marcadores ISSRs (FANG et al., 1998). Os estudos de DENG et al. (1996) e de NICOLOSI et al. (2000) apontaram que limão Volkameriano (*C. volkameriana* Tem. & Pasq.) é também um híbrido entre cidra e laranja-azeda. Já o limão Rugoso (*C. jambhiri* Lush.) e limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) seriam originados através do cruzamento entre cidra e tangerinas (NICOLOSI et al., 2000).

Dados morfológicos, históricos e moleculares sugerem que a origem híbrida de pomelos (*C. paradisi* Macf.) seja derivada do cruzamento entre laranja-doce e toranja (GMITTER, 1995; NICOLOSI et al., 2000). Esse grupo apresenta grande

afinidade intra-específica revelada por marcadores isoenzimáticos (TORRES et al., 1978), ISSR (FANG & ROOSE, 1997), RAPD e SSR (CORAZZA-NUNES et al., 2002).

Muitos estudos indicam que a cidra (*C. medica*) fez parte da origem de muitas espécies comerciais de citros (CORAZZA-NUNES et al., 2005). Ainda, de acordo com dados de cpDNA (NICOLosi et al., 2000; ARAÚJO et al., 2003), esse táxon sempre atuou como parental paterno em tais cruzamentos. Os estudos de Araújo et al. (2003) apontaram para uma ampla divergência citoplasmática de cidra dentro do grupo *Citrus*, sugerindo, para sua origem, um padrão de evolução com possível introgressão de representantes de Árvores de Citros Verdadeiros.

3.2. Mancha Preta dos Citros

A mancha preta dos citros (MPC), cujo agente causal é o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, foi relatada pela primeira vez em pomares comerciais no estado de São Paulo em 1992, na região de Limeira (GOES & FEICHTENBERGER, 1993). Os sintomas ocasionados pela doença depreciam os frutos para a comercialização *in natura* no mercado interno, assim como restringem as exportações (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Esta doença também é responsável pela queda prematura dos frutos (TIMMER, 1999), podendo levar a reduções de até 80% na produção (KLOTZ, 1978). Os sintomas da MPC ocorre quase que, exclusivamente, em frutos (KOTZÉ, 1981), onde são descritos cinco tipos designados como: falsa melanose, mancha preta, mancha sardenta e mancha virulenta (HERBERT, 1989) e mancha trincada (GOES et al., 2000). Contudo, estes sintomas ficam restritos ao flavedo dos frutos (CARDOSO FILHO, 2003), não havendo interferência em sua qualidade interna. Frutos doentes podem, portanto, ser utilizados no processamento para produção de suco (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

Os sintomas da MPC, embora possam ser verificados em folhas e no pedúnculo dos frutos, são, excepcionalmente, raros nesses tecidos (KOTZÉ, 1981). Entretanto, em folhas, quando presente, dentre as espécies cítricas, a

lesão é verificada mais frequentemente em limões verdadeiros e em tangerineiras, especialmente na mexerica do 'Rio'. Nesses órgãos, normalmente, os sintomas caracterizam-se pela presença de lesões necróticas pequenas, com centro acinzentado e bordas bem definidas, de coloração marrom-escura. Em plantas debilitadas, no entanto, os sintomas podem ser verificados com mais frequência nas folhas, independente das espécies cítricas. Todavia, as folhas, mesmo que infectadas, raramente exibem sintomas durante o seu tempo de vida útil, de cerca de três anos (McONIE, 1967).

A MPC afeta todas as variedades de laranjeiras doces (ALCOBA et al., 2000; AGUILAR-VILDOSO et al., 2002) e a expressão de seus sintomas está relacionada com a época de maturação dos frutos, sendo tanto maior quanto mais madura estiver a fruta (FEICHTENBERGER, 1996). O período de incubação varia entre quatro e seis meses (TIMMER, 1999). Altas temperaturas e intensa radiação solar são condições ambientais que favorecem a expressão dos sintomas (KOTZÉ, 1963). Com isto, alguns autores atribuem a maior intensidade da doença em variedades tardias, ao maior período de exposição de seus frutos a condições favoráveis para a expressão dos sintomas (FEICHTENBERGER, 1996). Entretanto, outros autores atribuem também a maior expressão de sintomas em variedades tardias à sua maior suscetibilidade (KIELY, 1948; GOES, 1998; TIMMER, 1999).

Essa doença dificulta a comercialização entre os estados da Federação e impõe restrições fitossanitárias dos países importadores de frutas frescas (AGUILAR- VILDOSO et al., 2002), o que implica em prejuízos econômicos importantes para o país. Frutos com sintomas da doença tornam-se depreciados no mercado nacional e restringem as exportações de frutas cítricas brasileiras, principalmente quando destinadas ao mercado europeu. A doença é considerada quarentenária A1 na União Européia (UE), por ainda não estar presente em seus países membros. A detecção de sintomas da doença em um único fruto, acarreta no impedimento do desembarque da mercadoria.

Devido aos elevados prejuízos causados pela MPC e à dificuldade de seu controle, torna-se indispensável buscar novas alternativas para o controle do agente causal. Até o presente, não há relatos sobre variedades com características agronômicas desejáveis, bem aceita no mercado de frutas frescas e que possa ser aproveitada no processo de produção de suco concentrado, aliado à resistência às principais doenças, especialmente à MPC.

Dentro desse contexto, estudos sobre a MPC e seu agente causal, o fungo *Guignardia citricarpa*, são de extrema importância para a citricultura, representando um avanço no entendimento desse patossistema e auxiliando no seu controle, visando a diminuição das perdas para o agronegócio brasileiro.

3.3. O Gênero *Guignardia*

O gênero *Guignardia* foi descrito em 1892 por Viala e Ravaz, (citado por SIVANESAN, 1984), e compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos, geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas. Neste gênero, encontram-se espécies consideradas endofíticas para *Citrus*, como *G. mangiferae*, e também espécies patogênicas, como *G. citricarpa*.

O gênero *Phyllosticta* foi descrito por Van Der Aa (1973) para fungos crescendo em folhas e formando pequenos picnídios, com conídios hialinos e unicelulares no tecido hospedeiro, e possui mais de 2000 espécies que podem ser separadas, principalmente, pelo seu hospedeiro ou nas diferenças características de sintomas e morfologia, picnídios, conídios e micélio (VAN DER AA, 1973). Apenas uma pequena fração de fungos do gênero são realmente hospedeiro-específica. Contudo, experimentos com espécies de *Guignardia* e seus anamorfos, mostraram a especificidade para uma espécie ou espécies de um gênero de planta hospedeira (BISSET & PALM, 1989; LEUCHTMANN et al., 1992). No entanto, há relatos da presença de espécies de *Phyllosticta* semelhantes morfológicamente em plantas não aparentadas, crescendo perto de pomares de citros, onde se avaliou a doença Mancha Preta dos Citros por *G.*

citricarpa (KIELY, 1948; SCHUEPP, 1961). A maioria dos trabalhos de isolamento de fungos desse gênero os classifica como fitopatogênicos, tendo sido descritos em abacate e tomate (BAKER, 1938), citros (McONIE, 1964), eucalipto (CROUS et al., 1993) e cana-de-açúcar (PONS, 1990). Entretanto, alguns autores isolaram espécies de *Phyllosticta*, de material aparentemente sadio, descrevendo-os como endófitos (CARROLL, 1988; PETRINI, 1991; LEUCHTMANN et al., 1992, GLIENKE, 1995).

3.3.1 *Guignardia citricarpa*

O agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC) é *Guignardia citricarpa* Kiely. Primeiramente, a fase anamórfica ou imperfeita do fungo foi denominada como *Phoma citricarpa* (McALP.) Petrak (FAWCETT, 1936 citado por RODRIGUES, 2010). Atualmente, essa fase é referida como *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa.

A *G. citricarpa* é um patógeno específico de citros (PAUL et al., 2005), podendo atingir folhas e frutos pelos seus esporos assexuais (picnidiósporos), que se desenvolvem nas lesões, principalmente em frutos e, menos frequentemente nas folhas, no pedúnculo e também em folhas mortas. Adicionalmente, os esporos sexuais (ascósporos), os quais se desenvolvem, unicamente, em folhas em decomposição no solo, correspondem ao inóculo responsável principalmente às áreas indenens, já que podem ser disseminados pelo vento (FEICHTENBERGER, 1996; KOTZÉ, 1981).

Os esporos de *G. citricarpa*, quando em contato com a superfície dos tecidos suscetíveis e em condições ambientais apropriadas, podem germinar dando origem a um apressório, seguindo-se de uma hifa infectiva que penetra na cutícula e se transforma em uma pequena massa de micélio que permanece quiescente ou em estado latente (McONIE, 1964 e McONIE, 1967 citado por RODRIGUES, 2010).

Os ascocarpos ou pseudotécios são produzidos em folhas em decomposição no solo. Quando as folhas estão quase secas, não quebradiças e

com uma consistência igual a de papel, é a fase de decomposição intermediária onde tais estruturas são produzidas, completando-se o seu ciclo. Já nas etapas iniciais de decomposição e no final desse processo, em que a folha quebra-se ao tato, encontram-se apenas estruturas reprodutivas vazias (ALCOBA et al., 2000 citado por RODRIGUES, 2010).

Os ascocarpos não são encontrados em lesões de frutos e folhas, ficam isolados ou agregados, globosos, imersos, de coloração castanho-escuro a preta com 95-125 μm de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5 μm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes (KOTZÉ, 1981).

Os ascos são cilíndricos clavados (40-64 X 12-15 μm), de parede bitunicada contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado (12,5-16 X 4,5-6,5 μm) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (FEICHTENBERGER et al., 1997; BALDASSARI et al., 2001). O desenvolvimento dos pseudotécios depende de infecções que tenham ocorrido durante o período de susceptibilidade. A formação e consequente disponibilidade de ascósporos esta aliada, dentre outros fatores, ao momento da desfolha e do tempo de decomposição das folhas, estando diretamente relacionada com a temperatura, precipitações (ALCOBA et al., 2000), e sobretudo pela alternância secamento/molhamento das folhas (KOTZÉ, 1981).

A *P. citricarpa* (fase anamórfica) produz picnídios em lesões de frutos e em folhas e, ocasionalmente, no pedúnculo de frutos. Essa estruturas são produzidos em grande número em folhas mortas. Os picnídios são de coloração marrom-escuro ou preta, solitários ou agregados, globosos (115-190 μm de diâmetro), apresentando um ostíolo levemente papilado e circular, de 12-14,5 μm de diâmetro (FEICHTENBERGER et al., 1997). Os conídios apresentam forma ovóide a elíptica (8-10,5 X 5,5-7 μm) ou subglobosos, são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice (5-10 μm) hialino numa das extremidades (FEICHTENBERGER et al., 1997; BALDASSARI et al., 2001). Geralmente, os picnidiósporos ficam agregados devido à substância mucilaginosa que os recobre. Essa mucilagem serve de proteção contra o ressecamento das estruturas do

fungo quando expostas a ambientes adversos (PUNITHALINGAM & WOODHAMS, 1982).

3.3.2. *Guignardia mangiferae*

A espécie *G. mangiferae* é considerada endofítica para as espécies cítricas. Carroll (1986), citado por Rodrigues (2010), utilizou o termo endófito para organismos que causam colonização assintomática em folhas e ramos de plantas saudáveis, sendo encontrados, frequentemente, no interior das plantas. Petrini (1991) propôs uma maior abrangência para o termo endófito, a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Azevedo & Araújo (2007) atribuiu uma nova definição ao termo endofíticos, segundo os quais correspondem os microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultivados ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis. Mendes & Azevedo (2007) acrescentaram à essa definição dois tipos: Tipo I - os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II - os que produzem estruturas externas à planta.

Inicialmente, acreditava-se que uma das principais características do patógeno, com relação à doença, seria o fato de tanto folhas como frutos poderem estar contaminados, sem apresentarem os sintomas típicos da doença. Isolados, morfologicamente, similares a *G. citricarpa* representam um grupo dominante de fungos encontrados em tecidos saudáveis de diferentes espécies de tangerina (GLIENKE, 1995), sendo isolados endofiticamente, como um patógeno facultativo, em plantas de citros (ARAÚJO et al., 2001). Deste modo, considera-se uma espécie avirulenta, hipovirulenta ou virulenta em fase latente (GLIENKE-BLANCO et al., 2002). Entretanto, estudos moleculares e cultivo *in vitro* mostraram que o isolado classificado como avirulento é, na verdade, outra espécie conhecida como *Guignardia mangiferae* (*Phylosticta capitalensis*), geralmente encontrada

endofiticamente em plantas arbóreas (BAAYEN et al., 2002). Resultados congruentes também foram encontrados por Rodrigues (2004) e Rodrigues et al. (2006), que isolaram e caracterizaram *Guignardia mangiferae* (syn. *G. endophyllicola*) de plantas cítricas.

Bonants et al. (2003) e Meyer et al. (2006) desenvolveram *primers* específicos baseado na região ITS do DNA ribossomal para distinguir isolados de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, com grande utilidade na inspeção de produtos de importação na União Européia, mas com pouco sucesso na amplificação de isolados endofíticos.

Após a descrição da espécie endofítica, houve uma reclassificação de diversos isolados de *Guignardia* spp., em especial na Nova Zelândia, onde isolados que eram considerados *G. citricarpa* foram identificados como *G. mangiferae* por meio de análise de sequência ITS (EVERETT & REES-GEORGE, 2006), mostrando a importância de estudos taxonômicas das espécies.

3.4. Técnicas Moleculares Empregadas

3.4.1. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

O marcador molecular AFLP é uma técnica desenvolvida por Zabeau (1993), e é intermediária entre as técnicas de RFLP e PCR (VOS et al., 1995). O marcador AFLP analisa a presença ou ausência de sítios de enzimas de restrição e as sequências polimórficas adjacentes a esses sítios. Os polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados são resultantes do uso combinado de enzimas de restrição e da reação da polimerização em cadeia. Suas principais características são a alta especificidade e resolução e poder de amostragem. Nesta técnica o DNA é digerido por duas enzimas de restrição, uma que corta sítios de seis pares de base e a outra que corta sequências de quatro pares de bases. Este processo de clivagem gera milhões de fragmentos de distintos tamanhos. O DNA utilizado deve ser de alta qualidade. Após a digestão, é realizada a ligação dos adaptadores que permitem que os fragmentos de DNA

cortados se liguem a pequenos oligonucleotídeos de DNA de sequência conhecida. Subsequentemente, é feita a pré-amplificação, que consiste na amplificação dos fragmentos agora ligados aos adaptadores através da reação da polimerização em cadeia com o uso de iniciadores, complementares aos adaptadores com uma base a mais. A amplificação final é feita com uma pequena amostra da primeira amplificação. Neste caso, são utilizados iniciadores compostos de todas as bases dos *primers* da primeira amplificação, mais duas a três bases, dependendo do nível de polimorfismo da espécie ou da população.

De acordo com Vos et al. (1995), o AFLP apresenta as seguintes vantagens: maior número de *loci* pode ser analisado por experimento; número, aproximadamente, dez vezes maior de marcas informativas pode ser obtido por análise; a técnica gera mais informações do que outros marcadores dominantes como RAPD; o AFLP gera padrões de bandejamento altamente reproduzíveis, devido ao pareamento específico dos *primers* aos nucleotídeos adaptadores complementares.

Marcadores AFLP, por sua vez, são considerados mais eficientes que RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD e SSR (*Single Sequence Repeat*), pela sua alta reprodutibilidade e elevada taxa multiplex, ou seja, número de marcadores simultaneamente analisados em um mesmo gel, e vêm sendo utilizados para análise de diversidade genética em muitas espécies vegetais (PEJIC et al., 1998). Em citros, marcadores AFLP foram empregados com sucesso na construção de mapas genéticos (SIMONE et al., 1998; OLIVEIRA, 2003) e na caracterização de híbridos somáticos (GUO et al., 2002). Já em *Guignardia*, esse marcador tem sido empregado em trabalhos de diversidade (BAAYEN et al., 2002).

Esta classe de marcadores também tem apresentado bons resultados para outras aplicações, como caracterização da variação somaclonal decorrente da cultura de tecidos e órgãos vegetais (POPESCU et al., 2002), identificação de mutantes (SCOTT et al., 2000) e análise de quimeras (FRANKS et al., 2002), ratificando a utilidade dessa ferramenta de análise genética.

3.4.2. Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

A região ITS1-5.8S-ITS2 tem sido muito utilizada para fins de filogenia por ser conservada dentre espécies e com baixas variações dentro do gênero (COOKE et al., 2000). A região ITS está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS & DIXON, 1991). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (HILLIS & DIXON, 1991; SCHLOTTERER et al., 1994). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento (GERBI, 1985), sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros (SCHLOTTERER et al., 1994; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002). Tais regiões já foram utilizadas, anteriormente, no estudo de filogenia de *Citrus* (XU et al., 2006).

Em *Guignardia*, Wickert et al. (2009) utilizaram a região ITS1-5.8S-ITS2 para a identificação de diversos isolados a nível de espécies comparando as sequências obtidas com sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Bonnants et al. (2003) desenvolveram um método de identificação de *G. citricarpa* por meio de novos *primers* de PCR desenhados a partir da região ITS. Peres et al. (2007) também propuseram novos *primers* para identificação de *G. citricarpa* proveniente de diversos tipos de lesões em frutos. Stringari (2009) analisou a distância genética e taxonômica de isolados de *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta* sp. utilizando-se das sequências obtidas da região ITS e do gene $\alpha 1$ do EF. Wulandari et al. (2009), utilizando sequenciamento da mesma região e também da sequência parcial do gene da actina, descreveram uma nova espécie diferente geneticamente de outras espécies de *Guignardia*, denominada *Phyllosticta citriasiana*, responsável pela doença mancha Tan (*Citrus maxima*) na Ásia, idêntica a MPC.

3.5. Análises Filogenéticas

A filogenia lida com a identificação e entendimento das relações entre as espécies que resultam da evolução. Sob a premissa que as espécies evoluem de um ancestral comum, as espécies mais próximas têm mais características em comum do que as mais distantes. A sistemática filogenética é utilizada para identificar características similares e definir a relação histórica ou evolucionária com base nessas características – incluindo genes ou fragmentos de DNA. Com base nessas relações, árvores filogenéticas são desenvolvidas mostrando as relações evolucionárias ou agrupamentos de organismos.

Os métodos usados para determinar as diferenças entre as unidades de estudo dependem do número e tipo de características a serem comparadas. Características podem incluir diferenças morfológicas, ou diferenças em sequências de DNA, genes ou seus produtos (proteínas).

Existem dois tipos de análises utilizadas para o desenvolvimento de árvores filogenéticas. Os métodos fenéticos utilizam medidas de distância, que consolidam estatisticamente as diferenças entre os caracteres em um número. Uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo é criada, e árvores são desenvolvidas agrupando aqueles com menor diferença num fenograma.

Os métodos cladísticos calculam árvores para cada caráter e então indicam a melhor árvore através da determinação daquela que requer menor número de mudanças (parcimônia) ou aquela mais provável estatisticamente (máxima verossimilhança). A idéia básica por trás da cladística é que membros do mesmo grupo compartilham uma história evolucionária comum, e são proximamente relacionados, mais com membros do mesmo grupo do que com outros organismos. Estes grupos são reconhecidos por compartilharem características únicas que não estão presentes num ancestral distante.

3.5.1. Máxima Parcimônia

O método de máxima parcimônia é relativamente simples em sua concepção. Seu princípio envolve a identificação de uma topologia que requer o

menor número de mudanças evolutivas para explicar as diferenças observadas entre os táxons estudados. Esse método utiliza apenas os sítios variáveis informativos em suas análises, pois os sítios invariáveis não acrescentam nenhuma mudança na árvore e os sítios variáveis não informativos acrescentam o mesmo número de mudanças em todas as possíveis árvores (GRAUR & LI, 2000; NEI & KUMAR, 2000; MIYAKI et al., 2001). A vantagem desse método em relação aos outros, é o seu conceito simples e é, em geral, computacionalmente mais rápido que os demais. No entanto, deve-se ter cuidado com homoplasias, substituições múltiplas e desvio de composição de bases, que não são corrigidos por esse método (MIYAKI et al. 2001).

Há diferentes algoritmos para análise filogenética. No caso da máxima parcimônia, dois deles são mais utilizados: a busca exaustiva (se o número de táxons for pequeno, até 10) ou a busca heurística (se houver um grande número de táxons). A busca exaustiva analisa todas as possíveis árvores bifurcadas para um grupo de táxons. A busca heurística une inicialmente todos os táxons em um único no interno, formando uma árvore totalmente politômica e em seguida avalia todas as possíveis árvores (GRAUR & LI, 2000; NEI & KUMAR, 2000).

3.5.2. Análise de *Bootstrap*

O *bootstrap* não paramétrico (FELSEINSTEIN, 1985) é muito utilizado em análises filogenéticas, tanto em análises por máxima parcimônia, como nas análises por máxima verossimilhança, para estimar o nível de confiança dos ramos das hipóteses filogenéticas. O teste consiste em uma simples reamostragem aleatória com reposição dos dados. Para cada réplica é obtida uma árvore e no final, é computada uma árvore consenso na qual consta a proporção (porcentagem de vezes) que cada agrupamento foi recuperado nas árvores réplicas (GRAUR & LI, 2000; NEI & KUMAR, 2000; RUSSO et al., 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foliares de *Citrus* foram coletadas no banco de germoplasma do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira (Centro APTA Citros Sylvio Moreira), em Cordeirópolis/SP. Para as análises foram utilizadas folhas dos acessos: *Citrus aurantium* (CV 235), *Citrus latifolia* (CV 302), *Citrus sinensis* (CV 155), *Citrus maxima* (363), *Citrus limon* (CV 262), *Citrus reticulata* (CV 172), *Citrus paradisi* (CV 333), *Citrus deliciosa* (CV 194), *Citrus medica* (CV 365), *Atalantia ceylanica* (CV 413), *Severinia buxifolia* (CV 419) e *Poncirus trifoliata* (CV 382). Os isolamentos foram realizados em nove dos 12 acessos anteriormente citados (CV 235, CV 302, CV 155, CV 363, CV 262, CV 172, CV 333, CV 194 e CV 365).

4.1. Isolamento de *Guignardia* spp. e teste do meio aveia-água.

Os isolamentos de *Guignardia* spp. e teste do meio aveia-água foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, sob coordenação do Professor Doutor Antonio de Goes.

A partir de tecidos de folhas destas espécies foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 mm², retirados da parte central do limbo foliar. Esses fragmentos foram imersos em etanol 70% por um minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio: água esterilizada 1:3 v/v, por 3 minutos, e enxágue em água esterilizada por 30 segundos. Após secagem desse material em papel de filtro estéril, tais fragmentos foram justapostos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados em condição ambiente por sete dias. Após esse período, colônias típicas de *Guignardia* spp. obtidas foram repicadas para obtenção de isolados puros.

Todos os isolados obtidos foram submetidos ao teste do meio de cultura aveia-água (AA), utilizado para distinguir os isolados patogênicos (*Guignardia citricarpa*) e endofíticos (*Guignardia mangiferae*) (BAAYEN et al., 2002; BALDASSARI et al., 2008). Nesse estudo, discos de 0,5 cm² da colônia dos

isolados foram colocados no centro de placas contendo o meio AA. Foram realizadas quatro réplicas para cada isolado, que foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12/12 horas a 25°C , por um período de 7 - 10 dias, quando, então, foram avaliados quanto à formação ou não de halo amarelo característico de isolados de *Guignardia citricarpa*.

4.2. Extração do DNA

As extrações de DNA das amostras foliares e dos isolados de *Guignardia* spp. foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da FMRP-USP, com a colaboração da Professora Doutora Ana Lilia Alzate Marin. As extrações foram efetuadas com base na metodologia de Doyle e Doyle (1987), adaptada por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA foi realizada no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade de DNA, foi utilizada como referência uma unidade de densidade óptica (DO) equivalente a 50 µg de DNA por mL (SAMBROOK et al., 1989) aplicando-se a seguinte equação:

$$[DNA] \mu\text{g} / \mu\text{L} = (A_{260} * DO * f) / 1000$$

onde:

A_{260} = absorbância sob luz UV no comprimento de onda 260 nm;

DO = unidade de densidade óptica (50 µg/mL);

f = 8,33 (fator de diluição).

4.3. Marcador Molecular do tipo AFLP

Os marcadores moleculares AFLP foram utilizados de acordo com o protocolo descrito por Vos et al. (1995) tanto para *Guignardia* spp. quanto para *Citrus* spp. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal do

Departamento de Genética da FMRP-USP, com a colaboração da Professora Doutora Ana Lilia Alzate Marin.

Digestão: O DNA genômico (200 ng) foi digerido conjuntamente com as enzimas de restrição EcoRI e MseI, em uma reação contendo 23,75 µL de H₂O Milli-Q, 0,5 µL de Tampão 100X BSA, 5,0 µL de Tampão 10X OPA, 0,5 µL da enzima MseI (5 unidades) e 0,25 µL da enzima EcoRI (5 unidades). A reação de digestão foi incubada em termociclador modelo PTC™-100 (MJ Research Inc) e submetida a um ciclo de 37°C por 15 horas; 70°C por 15 minutos e 4°C overnight. Posteriormente, os fragmentos gerados foram ligados às sequências adaptadoras específicas complementares às extremidades clivadas pelas duas enzimas.

Preparo dos Adaptadores: As sequências de adaptadores utilizadas para a ligação das enzimas foram:

Primer EcoRI-Forward: CTCGTAGACTGCGTACC

Primer EcoRI- Reverse: AATTGGTACGCAGTCTAC

Primer MseI-Forward: GACGATGAGTCCTGAG

Primer MseI-Reverse: TACTCAGGACTCAT

Para o preparo dos adaptadores citados, os mesmos foram submetidos, em termociclador, a um ciclo de 65°C por 10 minutos; 37°C por 10 minutos e 25°C por 10 minutos, em reações descritas na Tabela 1:

Tabela 1. Mix das reações para o preparo dos adaptadores para ligação das enzimas EcoRI e MseI.

<i>Reagente</i>	<i>MseI</i>	<i>ECORI</i>
Oligo 1 (Forward)	64,0 µL (500ng/µL)	5,6 µL (600ng/µL)
Oligo 2 (Reverse)	56,0 µL (500ng/µL)	4,8 µL (620ng/µL)
Tampão 10X OPA	7,0 µL	6,0 µL
H₂O Milli-Q	13,0 µL	103,6 µL

Ligação dos Adaptadores: em cada amostra após a digestão, foram acrescentados 6,7 µL de H₂O Milli-Q, 1,0 µL do adaptador para o corte da EcoRI, 1,0 µL do adaptador para o corte da MseI, 1,0 µL de tampão T4 DNA ligase e 0,3 µL da enzima T4 DNA ligase. As amostras foram incubadas em termociclador por 3 horas a 23°C.

Após a incubação das amostras, estas foram visualizadas em gel de agarose (1,0%) para verificar a completa digestão e corte dos DNAs.

Amplificação Pré-Seletiva: O DNA clivado e ligado aos adaptadores (50 µl) foi pré-amplificado com iniciadores contendo uma base seletiva, Eco-A/MseI-T. Os produtos da PCR de pré-amplificação seletiva foram utilizados como molde na segunda reação, denominada amplificação seletiva, na qual foram utilizados iniciadores com 2 e 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos iniciadores.

Para a reação de pré-amplificação, foi adicionado 0,5 µl EcoRI + (1 oligo) (25 ng/µl), 0,5 µl MseI + (1 oligo) (25 ng/µl), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 1 µl 10X Buffer Mg Free (Promega), 0,6 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega) e 2,5 µl do DNA ligado. A pré-amplificação foi realizada de acordo com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 25 vezes (94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), e 72°C por 5 minutos. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos 4 vezes e armazenados a -20°C.

Amplificação Seletiva: Na amplificação seletiva AFLP-PCR, foi adicionado 1,0 µl EcoRI + (X oligo) (25 ng/µl), 1,2 µl MseI + (X oligo) (25 ng/µl), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 2,0 µl 10X Buffer Mg Free (Promega), 1,2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega) e 1,5 µl DNA pré-amplificado.

A amplificação seletiva foi realizada de acordo com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos,

72°C por 1 minuto, 11 vezes (94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 22 vezes (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) e 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação foram armazenados a -20°C.

As combinações de *MseI-EcoRI* tanto para *Citrus* quanto para *Guignardia* foram: TAA-ATG, TAA-ATC, TC-AGA, TC-AGT, TAA-AGT, TAA-AGA, TC-ATG, TC-ATC, AAT-ATC, AAT-ATG, AAG-ATC, AAG-ATG, AAT-AGA, AAT-AGT, AAG-AGA e AAG-AGT.

Preparo do gel de poliacrilamida: O gel de poliacrilamida foi preparado de duas maneiras, uma para posterior coloração, segundo Creste et al. (2001), e outro, para posterior coloração, segundo Sanguinetti et al. (1994). O protocolo de coloração do gel de poliacrilamida, inicialmente escolhida, foi adotado seguindo a metodologia de Sanguinetti et al. (1994), devido à sua praticidade e à possibilidade de armazenamento dos géis para possíveis análises futuras. Porém, como esta metodologia não é usualmente utilizada para análises de AFLP, houve a necessidade de comparar essa metodologia de coloração com a metodologia de Creste et al. (2001).

- Gel de poliacrilamida, seguido de coloração segundo Creste et al. (2001): na placa de base, após limpa duas vezes com álcool 95%, foi espalhado 1,5 mL de Repel-silane para o gel não grudar. Na placa de coloração, na qual o gel deve ficar fixado, foi aplicado uma solução contendo 1,0 mL de álcool 95%, 5,0 µL de ácido acético glacial e 5,0 µL de Bind-silane. O gel foi preparado com 120 mL de matriz de poliacrilamida (252 g de uréia, 36 g de acrilamida e 1,8 g de bisacrilamida), 120 µL de TEMED e 800 µL de APS (95 mg/mL). Após a secagem do gel de poliacrilamida, foi realizada uma pré-corrida de 1 hora, à 50°C com uma potência de 80 W.

- Gel de poliacrilamida, seguido de coloração segundo Sanguinetti et al. (1994): as duas placas foram limpas 2 vezes com álcool 95%. O gel foi preparado com 120 mL de matriz de poliacrilamida (432 g de uréia, 36 g de acrilamida e 1,8 g de

bisacrilamida), 90 µL de TEMED e 1800 µL de persulfato de potássio. Após a secagem do gel de poliacrilamida, foi realizada uma pré-corrida de 30 minutos, à 50°C com uma potencia de 80 W.

Eletroforese: Após a amplificação seletiva, o resultante de cada reação foi misturado a 8 µl de “Loading fuffer” (10 ml formamida deionizada, 200 µl de EDTA (0,5 M) pH 8,0, 10 mg de bromofenol blue e 10 mg de xylene cyanol). A seguir, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e, imediatamente, transferidas para gelo. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o “ladder” de 50 bp, desnaturado juntamente com as amostras.

Os produtos de AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, para coloração segundo Creste et al. (2001), com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em potencia de 80 W e temperatura máxima de 50°C por quatro horas. Já para a coloração segundo Sanguinetti et al. (1994), os produtos de AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 8%, com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada nas mesmas condições citadas acima, por cinco horas.

Coloração: O gel foi corado utilizando dois protocolos diferentes. Um mais elaborado e que necessita de maior tempo, descrito por Creste et al. (2001), apresentado na Tabela 2, e outro, mais simples e que utiliza menor tempo, descrito por Sanguinetti et al. (1994), contido na Tabela 3.

Visualização das amostras: a visualização das amostras e resultados, após a eletroforese, foi realizada com leitura visual, seguida de contagem das bandas, e fotografadas para análise.

Análise dos resultados: Após a contagem das bandas produzidas por cada combinação de *primers* utilizado nas análises de AFLP, foi conferido o parâmetro

“1” para a presença de banda e “0” para a ausência de banda, obtendo-se assim, uma matriz binária.

Tabela 2. Procedimento de coloração do gel de poliacrilamida, segundo Creste et al. (2001).

<i>Etapa</i>	<i>Solução</i>	<i>Tempo</i>
Fixação	2670 mL H ₂ O destilada 30 mL ácido acético glacial 300mL etanol absoluto	10 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Pré-tratamento	3000 mL H ₂ O destilada 45 mL ácido nítrico	2 minutos 40 segundos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Impregnação	3000 mL H ₂ O destilada 6g nitrato de prata	25 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	30 segundos
Lavagem	H ₂ O destilada	30 segundos
Revelação	4000 mL H ₂ O destilada 120g sódio carbonato anidro 2160µL formaldeído	Até a visualização das bandas
Bloqueio	2850 mL H ₂ O destilada 150 mL ácido acético glacial	5 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto

Tabela 3. Procedimento de coloração do gel de poliacrilamida, segundo Sanguinetti et al. (1994).

<i>Etapa</i>	<i>Solução</i>	<i>Tempo</i>
Fixação com prata	2670mL H ₂ O destilada 30 mL ácido acético glacial 300mL etanol absoluto 3 mL AgNO ₃ 20%	5 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	40 segundos
Revelação	3000 mL H ₂ O destilada 88g NaOH 1500 µL formaldeído	Até a visualização das bandas
Bloqueio	2850 mL H ₂ O destilada 150 mL ácido acético glacial	5 minutos

4.4. Amplificação, purificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

A amplificação e purificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada no Laboratório de Sistemática de Fanerógamas da FFCLRP-USP, com a colaboração do Professor Dr. Milton Groppo Júnior.

A região ITS1-5.8S-ITS2 dos *Citrus* spp. e de *Guignardia* spp. foram amplificadas com a utilização dos iniciadores descritos em Hillis e Dixon (1991) e White et al. (1990), respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, com desnaturação inicial de 99°C (10 min), 80°C (10 s), seguida de 30 ciclos de 95°C (15 s), 56°C (30 s), 72°C (90 s) e terminando com 72°C (3 min) para permitir completa extensão dos produtos de reação.

Os produtos de PCR foram purificados com a utilização de colunas de purificação QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, USA) seguindo protocolo do fabricante.

Para as reações de sequenciamento utilizou-se 50 ng de produto de PCR purificado, 3,0 mL de tampão de sequenciamento (*Save money* 2,5X), 1,0 mL de BigDye v3.1 (*Applied Biosystems*), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bi-destilada estéril que completou 10 mL. Em seguida, 80 mL de isopropanol 75% foram adicionados a cada reação. Após 15 min. a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 3040g, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), por 30 minutos a 20°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3040g por 10 minutos a 20°C. As amostras foram secas a vácuo, ressuspendidas em 10 mL de formamida, desnaturadas por 5 min. a 95°C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL conforme recomendações sugeridas pelo fabricante do equipamento (*Applied Biosystems*, Foster City, California (CA)).

Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e analisados por meio do *software* ABI Analysis Data Collection e, posteriormente, convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do *software* DNA Sequencing Analysis Software Versão 3.3. Os eletroferogramas gerados pelo processo de

sequenciamento foram submetidos aos programas Phred (EWING & GREEN, 1998) e Cap3 (HUANG & MADAN, 1999), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades. As duas sequências obtidas destas regiões para cada amostra foram alinhadas e a sequência consenso exportada para um arquivo de sequências destinadas às análises posteriores.

As sequências de nucleotídeos obtidas para cada espécie foram comparadas com sequências do banco de dados GenBank (acessado através do NCBI-National Center for Biotechnology Information- www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o *software* BLAST (ALTSCHUL, 1997). Uma vez que a sequência de DNA apresentou similaridade maior ou igual a 96% com as sequências da mesma região depositadas no GenBank, realizou-se a montagem do arquivo de sequências para as futuras análises filogenéticas.

4.5. Análises Filogenéticas

4.5.1. Alinhamento das sequências

As sequências da região ITS1-5.8S-ITS2, tanto para os cítricos quanto para os fungos foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e depois, manualmente, editadas. Inserções e deleções (“indels”) foram assinaladas com traços (“-”). Regiões com elevada homoplasia e séries longas de “A”s e “T”s (variáveis entre espécies e/ou causadas por erros de leitura no sequenciamento, ver (KELCHNER & WENDEL, 1996) foram excluídas dos alinhamentos.

4.5.2. Análises Filogenéticas da região ITS1-5.8S-ITS2

Utilizou-se o programa PAUP* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002) para todas as análises. Os dados de sequências foram analisados com Máxima Parcimônia como critério de otimização, com o algoritmo “*Branch and Bound*”, (um algoritmo de busca exata) implementado no caso das análises de *Citrus*, dado o pequeno número de terminais e busca heurística para as análises das espécies de

Guignardia. Na busca heurística foi utilizado o algoritmo “tree-bisection-reconnection” (TBR) para permutação dos ramos, com as opções “steepest descent” e “multrees” selecionadas, com 100 replicatas de adição aleatória e 10 árvores retidas em cada replicata. Todas as análises foram programadas para reter apenas as primeiras 10.000 árvores, valor atingido nas análises de *Guignardia*. Em todas as análises, os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças (“Parcimônia de Fitch”, FITCH 1971). Os intervalos (“gaps”) foram tratados como dados ausentes, não tendo sido utilizada qualquer codificação para eles. Análises de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) foram implementadas para verificar a robustez dos ramos em cada conjunto de dados, com 1.000 replicatas (10 árvores retidas por replicata), adição simples de sequências e “subtree-pruning-regrafting” (SPR) como algoritmo de troca de ramos. Para reduzir o tempo computacional foi escolhida a opção “amb-” (ramos colapsarem se o seu comprimento mínimo for zero).

Espécies de *Atalantia*, *Poncirus* e *Severia* foram adicionadas ao alinhamento de *Citrus*, dada à sua proximidade filogenética com este gênero, segundo estudos moleculares (ARAÚJO et al., 1999; BAYER et al., 2009), tendo sido escolhida *Atalantia ceylanica* como grupo externo. Em *Guignardia* espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Cyttaria*, *Fusarium* e *Metarhizium*, também foram adicionadas à matriz, dada a proximidade filogenética com *Guignardia* apontada em estudos anteriores (WICKERT et al., 2009). A espécie *Colletotrichum gloesporioides* foi escolhida como grupo-externo nesta análise.

4.5.3. Análise dos fragmentos de AFLP

Para os fragmentos de AFLP foi analisada a semelhança total com o uso do algoritmo de distância UPGMA – (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”), também implementado no PAUP* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002) para as análises de *Guignardia*. Este procedimento foi necessário pela ausência de grupo externo nas análises de AFLP neste grupo. Depois de verificados os agrupamentos produzidos escolheu-se para a análise das espécies de *G.*

citricarpa um grupo de *G. mangiferae* e vice-versa, e seguiu-se a análise descrita para as sequências de ITS1-5.8S-ITS2. No caso dos *Citrus* a análise pôde ser feita como àquela descrita para as sequências de ITS1-5.8S-ITS2.

4.6. Diagrama das principais etapas realizadas

As etapas descritas anteriormente podem ser visualizadas, de um modo geral, na Figura 1.

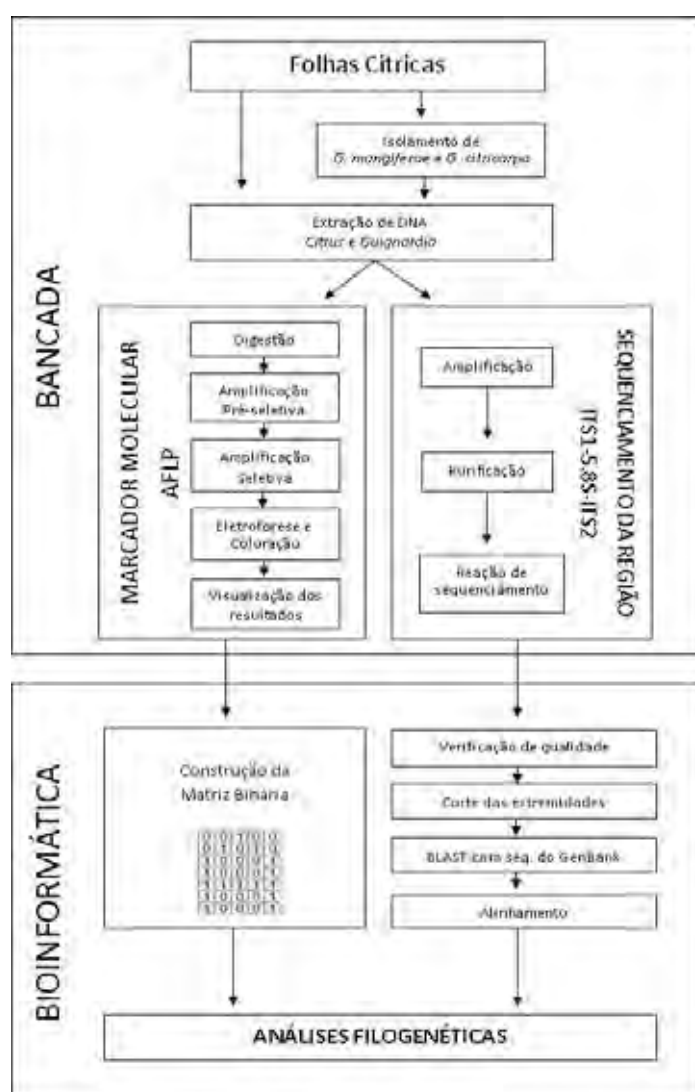


Figura 1. Diagrama das principais etapas desenvolvidas neste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de *Guignardia* spp. e teste do meio aveia-ágar

No presente estudo foram obtidos isolados de *Guignardia* spp. de todos os hospedeiros cítricos amostrados. O teste do meio aveia-ágar permitiu discriminar *G. citricarpa* visualmente, pela formação do halo amarelo no bordo das colônias em meio de cultura aveia-ágar, e *G. mangiferae*, por não apresentar halo (Figura 2). O resultado obtido constatou a presença das duas espécies de *Guignardia* associadas a todas as espécies cítricas em estudo. Deste modo, para facilitar a compreensão das análises foram formados dois grupos, onde os fungos receberam uma classificação alfanumérica de acordo com os hospedeiros (números) e a espécie de *Guignardia* identificada, sendo *G. citricarpa* (P) e *G. mangifera* (E) (Tabela 4).

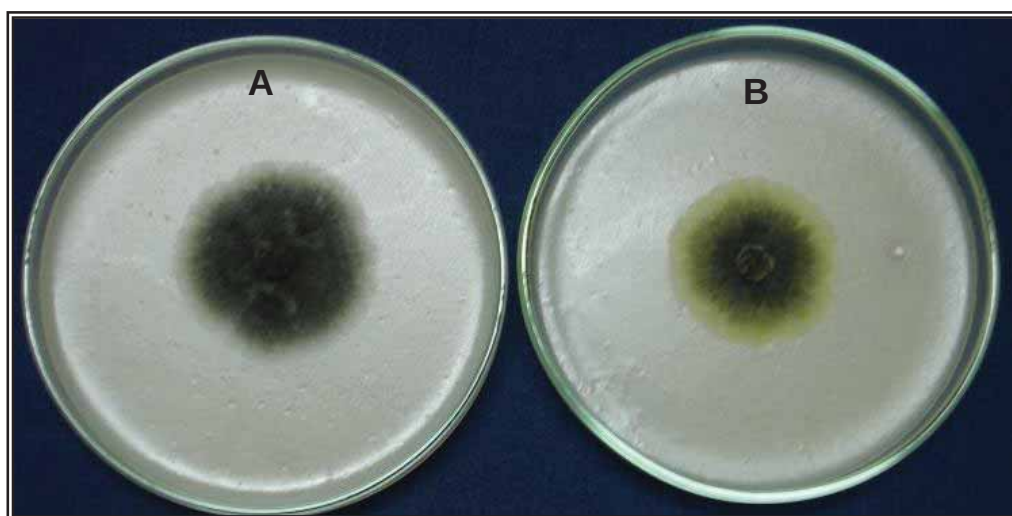


Figura 2. A: isolado de *Guignardia mangiferae*, em meio aveia-ágar, sem a presença do halo amarelo no bordo da colônia. B: colônia de *Guignardia citricarpa* com presença halo amarelo típico no bordo em meio aveia-ágar.

Tabela 4. Hospedeiros, isolados de *Guignardia citricarpa* e *Guignardia mangiferae* e respectiva designação.

Hospedeiros	Isolados	
	<i>G. citricarpa</i>	<i>G. mangiferae</i>
<i>Citrus. latifolia</i>	1P	1E
<i>C. aurantium</i>	3P	3E
<i>C. limon</i>	4P	4E
<i>C. deliciosa</i>	5P	5E
<i>C. reticulata</i>	6P	6E
<i>C. sinensis</i>	7P	7E
<i>C. medica</i>	8P	8E
<i>C. maxima</i>	9P	9E
<i>C. paradisi</i>	10P	10E

5.2. Comparação entre as metodologias de coloração do gel de poliacrilamida

As combinações de *primers* (*EcoRI/MseI*) submetidas à coloração utilizando os protocolos de Sanguinetti et al. (1994) e Crestes et al. (2001) foram: ATC/TAA, AGA/TC, AGT/TC e AGA/TAA. Os números totais de fragmentos amplificados e polimórficos avaliados nas espécies cítricas, de acordo com o método de coloração utilizado, encontram-se apresentados na Tabela 5.

A porcentagem de polimorfismo entre as metodologias de coloração avaliadas foram muito próximas. Entretanto, o número total de bandas avaliadas apresentou diferença significativa. Em média, obteve-se uma diferença de 26 bandas, com exceção da combinação AGA/TAA, onde a diferença foi de 101 bandas. Essa diferença pode ser explicada devido a concentração de poliacrilamida utilizada no preparo do gel, que para a coloração segundo o protocolo de Crestes et al. (2001) é de 6%, enquanto que na outra (Sanguinetti et al., 1994) essa é de 8%. O gel mais concentrado (8%) possui a malha mais fechada, dificultando a passagem dos fragmentos de DNA, obtendo-se bandas mais espessas, porém em menor número (Figura 3).

Tabela 5. Número de bandas total, polimórficas e porcentagem de polimorfismo avaliado de acordo com o protocolo de coloração utilizado.

Combinações (<i>EcoRI/MseI</i>)	n.º total de bandas		n.º de bandas polimórficas		Porcentagem de polimorfismo (%)	
	Sanguinetti et al. (1994)	Crestes et al. (2001)	Sanguinetti et al. (1994)	Crestes et al. (2001)	Sanguinetti et al. (1994)	Crestes et al. (2001)
ATC/TAA	97	128	93	121	95,9	95,2
AGA/TC	37	60	35	57	94,6	95,0
AGT/TC	47	73	39	65	83	89,0
AGA/TAA	46	147	43	135	93,5	93,9

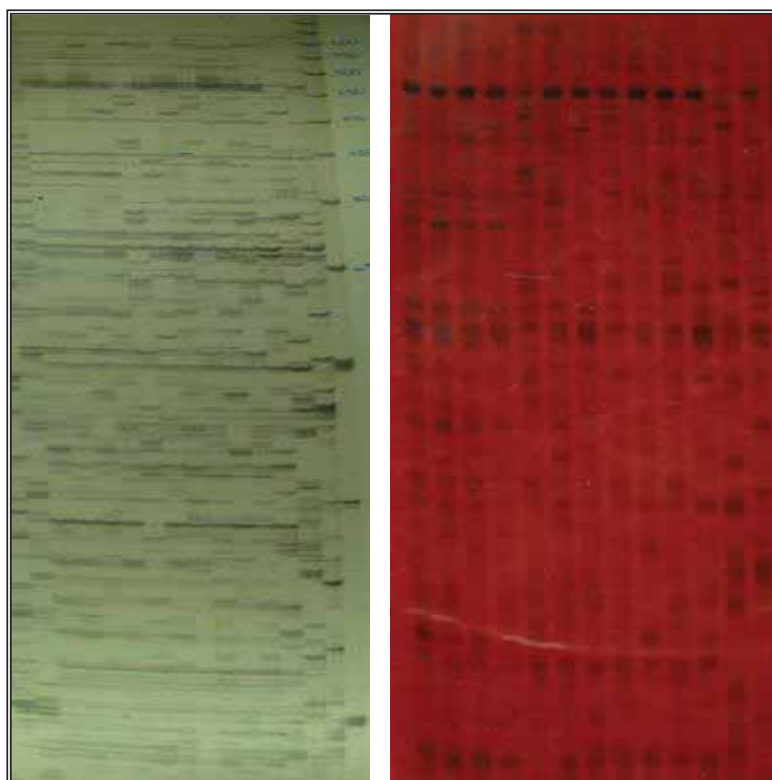


Figura 3. Eletforese dos géis de poliacrilamida com a combinação dos *primers* AGA/TAA (*EcoRI/MseI*) para AFLP. À esquerda, tem-se o gel de poliacrilamida após a coloração conforme Crestes et al. (2001), e à direita tem-se o gel de poliacrilamida após a coloração conforme Sanguinetti et al. (1994).

A árvore gerada a partir dos dados provenientes da metodologia de coloração segundo Creste et al. (2001) mostrou-se mais resolvida, apresentado menos politomias. As espécies cítricas aparecem como um grupo monofilético com uma porcentagem de *Bootstrap* (PB) de 87%. *Citrus medica*, *C. latifolia* e *C. limon* apresentaram-se como grupo-irmão as demais espécies cítricas. Outro grupo de forte sustentação é o formado por *C. reticulata* e *C. deliciosa* com uma PB = 98% (Figura 4). Por outro lado, a árvore gerada de acordo com a metodologia de coloração de Sanguinetti et al. (1994) foi menos informativa devido a grande politomia. *Citrus* também se apresentou como um grupo monofilético, porém com PB = 59%. *Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. deliciosa* e *Citrus medica* agruparam-se com PB = 66%, e um grupo interno composto por *C. reticulata* e *C. deliciosa* foi formado com PB = 66% (Figura 5).

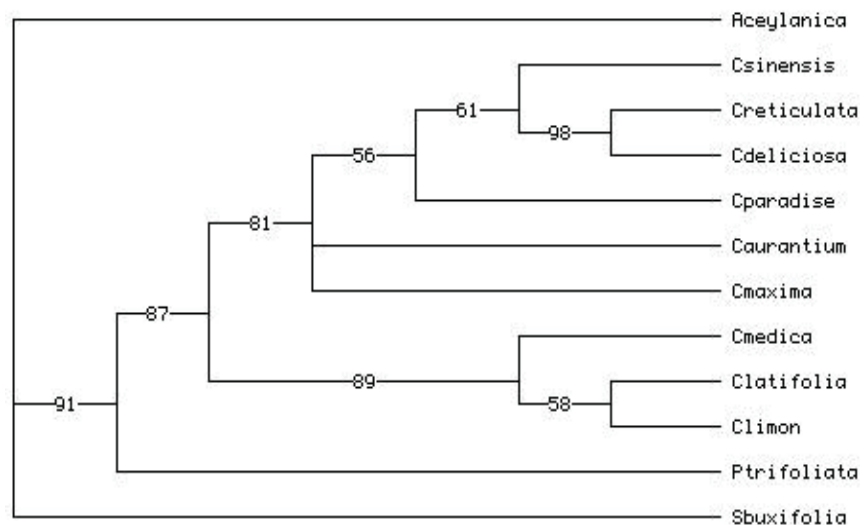


Figura 4. Árvore gerada a partir dos dados de AFLP segundo a metodologia de coloração de Creste et al. (2001). O número entre os ramos representa a porcentagem de *Bootstrap*.

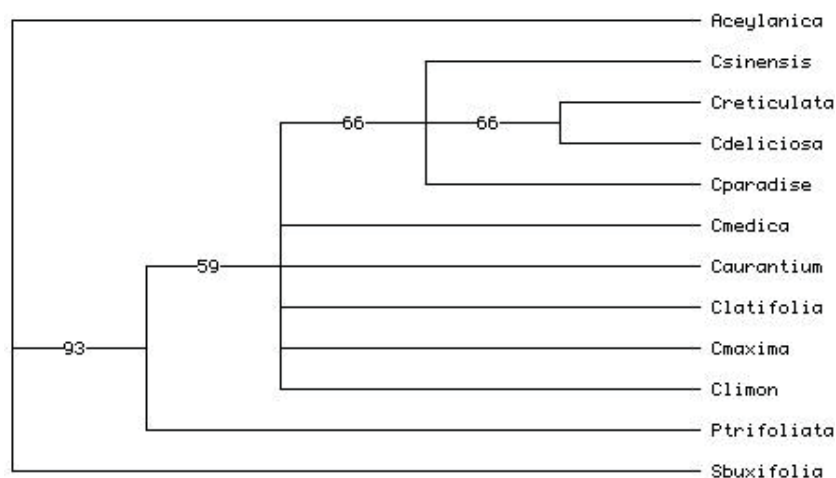


Figura 5. Árvore gerada a partir dos dados de AFLP segundo a metodologia de coloração de Sanguinetti et al. (1994). O número entre os ramos representa a porcentagem de *Bootstrap*.

5.3. *Citrus* spp. – Análise da região ITS 1-5.8S-ITS2

A matriz de dados da região ITS1-5.8S-ITS2 para as espécies de *Citrus* conteve 11 terminais (8 espécies de *Citrus*), com um total de 657 caracteres, sendo 563 constantes, 56 variáveis, porém não informativos para a parcimônia e 38 caracteres informativos. Foram retidas 36 árvores mais parcimoniosas, com 122 passos, com índice de consistência (IC) de 0.83 (0.68 excluindo os caracteres não informativos) e índice de retenção (IR) de 0.68.

Citrus aparece como grupo monofilético (PB = 83%), com um grupo interno com fraca sustentação de PB=52% formado por cinco espécies de *Citrus*. *Cirtus medica* e *C. limon* aparecem com 100% de PB dentro deste grupo (Figura 6). De acordo com Araújo et al. (2003), *Poncirus* aparece mais próximo de *Citrus* que os outros gêneros do grupo externo (*Atalantia* e *Severinia*). Entretanto, os estudos de PANG et al. (2003), através de marcadores SSR, revelaram que *Poncirus* está distante de *Citrus*. *Severinia* e *Atalantia* agruparam-se, inicialmente, por Engler (1931) em um único gênero. No entanto, Swingle & Reece (1967) agruparam-nos, em *Atalantia*, espécies com caracteres apomórficos (flores grandes e vesículas cônicas de suco) e em *Severinia* as espécies com caracteres plesiomórficos.

Estudos filogenéticos com base na análise de dados macromoleculares sugerem que *Severinia* e *Atalantia* apresentam grande afinidade (ARAÚJO et al., 2003).

De maneira geral os dados de sequência de ITS 1-5.8S e ITS-2 não foram suficientemente informativos para os cítricos.

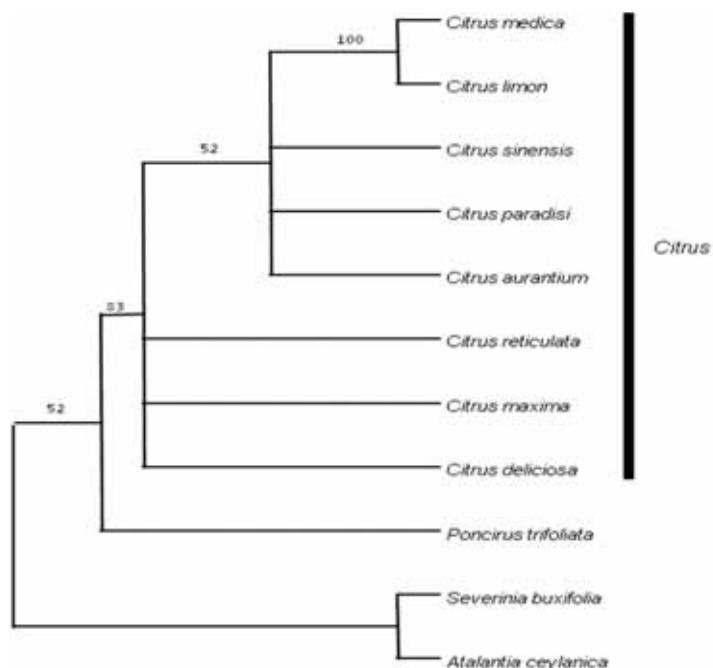


Figura 6. Árvore de consenso estrito da análise da região ITS1-5.8S-ITS2 para as espécies de *Citrus*. Os números acima dos ramos constituem-se em porcentagens de *Bootstrap*.

5.4. *Citrus* spp.– Análise de AFLP

A matriz de dados de AFLP para as espécies de *Citrus* conteve 12 terminais (9 de espécies de *Citrus*), com um total de 1093 caracteres, sendo 59 constantes, 322 variáveis, porém não informativos para a parcimônia e 712 caracteres informativos. Foi retida apenas uma árvore mais parcimoniosa, com 2044 passos, com índice de consistência (IC) de 0.50 (0.49 excluindo os caracteres não informativos) e índice de retenção (IR) de 0.46.

A árvore de AFLP para *Citrus* mostrou-se totalmente resolvida (sem politomias). *Citrus* aparece como grupo monofilético (PB = 99%), com *C. latifolia*, *C. limon* e *C. medica* como grupo-irmão aos demais *Citrus* (Figura 7). Tais dados mostram-se convergentes aos obtidos por Barret & Rhodes (1976), os quais, analisando dados morfológicos, e Potvin et al. (1983), utilizando dados bioquímicos, sugeriram a existência de dois grupos dentro de *Citrus*. Um maior, correspondendo às laranjas-tangerinas, formado por *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. maxima* e *C. paradisi*, e outro, representando o complexo cidra-lima-limão, formado por *C. medica*, *C. aurantifolia* e *C. limon*.

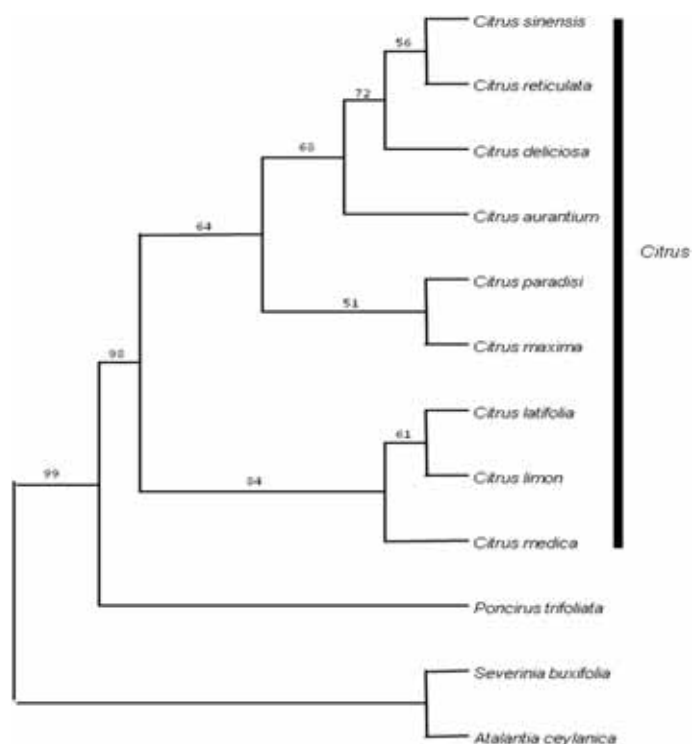


Figura 7. Árvore de consenso estrito da análise de AFLP para as espécies de *Citrus*. Os números acima dos ramos constituem-se em porcentagens de *Bootstrap*.

5.5. *Guignardia* spp. – Análise da região ITS1-5.8S-ITS-2

A matriz de dados da região ITS-5.8S-ITS-2 para as espécies de *Guignardia* conteve 24 terminais (18 de *Guignardia*, sendo nove de *G. mangiferae* e nove de *G. citricarpa*) com um total de 622 caracteres, sendo 355 constantes, 186 variáveis, porém não informativos para a parcimônia e 186 caracteres informativos. Foram retidas as 10.000 árvores mais parcimoniosas, com 371 passos, cujo índice de consistência (IC) foi de 0.92 (0.90 excluindo os caracteres não informativos) e índice de retenção (IR) de 0.97.

As espécies de *Guignardia* agruparam-se em um clado com 100% PB, com similaridade das sequências de mais 96%. Internamente a este clado as espécies de *G. citricarpa* (indicadas por números seguidos da letra P – patógeno) e *G. mangiferae* (indicadas por números seguidos da letra E – endofítico) agruparam em dois clados, ambos com 100% de PB (Figura 8).

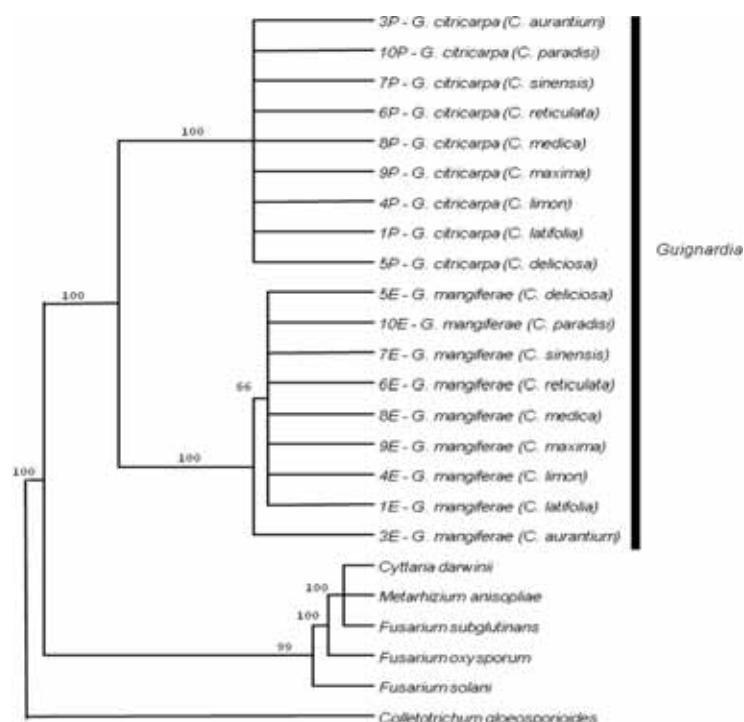


Figura 8. Árvore de consenso estrito da análise da região ITS1-5.8S-ITS2 para as espécies de *Guignardia*. Espécies hospedeiras de *Citrus* entre parênteses. Os números acima dos ramos constituem-se em porcentagens de *Bootstrap*.

De acordo com os resultados, *G. citricarpa* e *G. mangiferae* isoladas de *Citrus medica* mostraram-se como basais a todos os outros no fenograma.

Outra estratégia de busca de árvores foi montada, utilizando-se os isolados de *G. citricarpa* provindos de *C. medica* como grupo-externo das *G. mangiferae*, como relatado anteriormente no item material e métodos. O procedimento oposto foi feito para a inferência de filogenia em *G. citricarpa*.

Na análise dos fungos *G. citricarpa* foram obtidas sete árvores igualmente mais parcimoniosas de 231 passos. A árvore de consenso de maioria revela os isolados de *C. medica* (8P) como irmão a todas as outras linhagens (Figura 10). Já na análise dos isolados de *G. mangiferae*, foram obtidas 24 árvores mais parcimoniosas, de 264 passos. Novamente, o isolado de *C. medica* (8E) aparece como grupo-irmão de todos os outros isolados de *Citrus* (Figura 11).

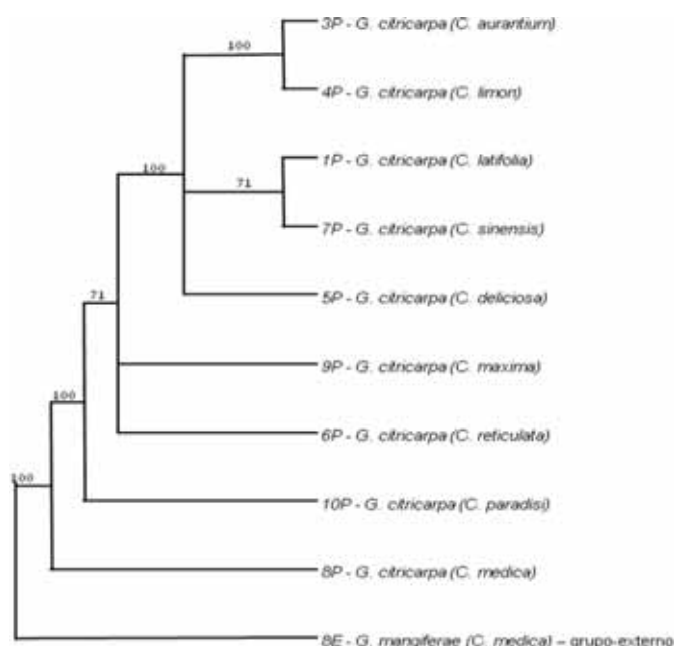


Figura 10. Árvore de consenso de *bootstrap* da análise de AFLP para as espécies de *Guignardia citricarpa*. Os hospedeiros estão indicados entre parênteses. Os números acima dos ramos constituem-se em porcentagens de *Bootstrap*.

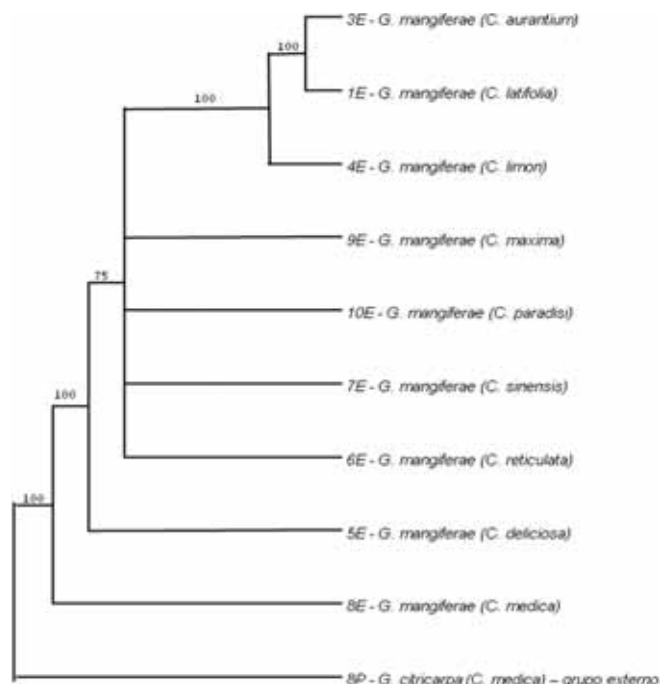


Figura 11. Árvore de consenso de *bootstrap* da análise de AFLP para as espécies de *Guignardia mangiferae*. Os hospedeiros estão indicados entre parênteses. Os números acima dos ramos constituem-se em porcentagens de *Bootstrap*.

5.7. Associação entre as análises filogenéticas

Nas análises de comparação entre as filogenias geradas foram utilizados somente os resultados provenientes de dados de AFLP. Essa estratégia deu-se em razão de que os resultados de AFLP foram mais informativos que os resultados provenientes do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. Isso pode ter ocorrido devido ao fato das análises de AFLP utilizar DNA genômico, enquanto que o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 utiliza somente uma pequena parte do genoma.

As relações entre os grupos remanescentes de *G. mangiferae* e *G. citricarpa*, entretanto, não são tão congruentes (Figura 12), com formação de clados diferentes, dependendo da espécie de *Guignardia* analisada.

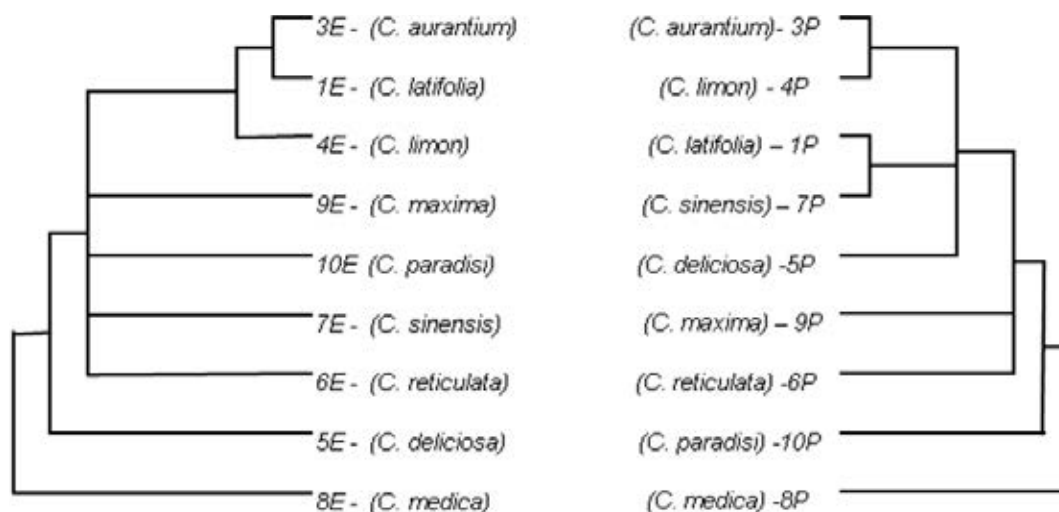


Figura 12. Comparação entre as árvores de consenso obtida para *G. mangiferae* (à esquerda) e *G. citricarpa* (à direita) nas análises de AFLP. Os hospedeiros estão indicados entre parênteses.

A comparação das filogenias de AFLP produzidas para *Citrus* spp. com cada uma das filogenias de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* (Figuras 13 e 14, respectivamente) permite afirmar que os isolados das duas espécies de *Guignardia*, cujo hospedeiro é *C. medica*, diferem em relação à todas as outras analisadas. *Citrus medica* é uma espécie bem definida, morfologicamente, no grupo, e distante, filogeneticamente, das outras espécies de *Citrus* analisadas (ARAÚJO et al., 2003 e BAYER et al., 2009), o que pode justificar a diferenciação encontrada para os isolados de *Guignardia* em *C. medica*.

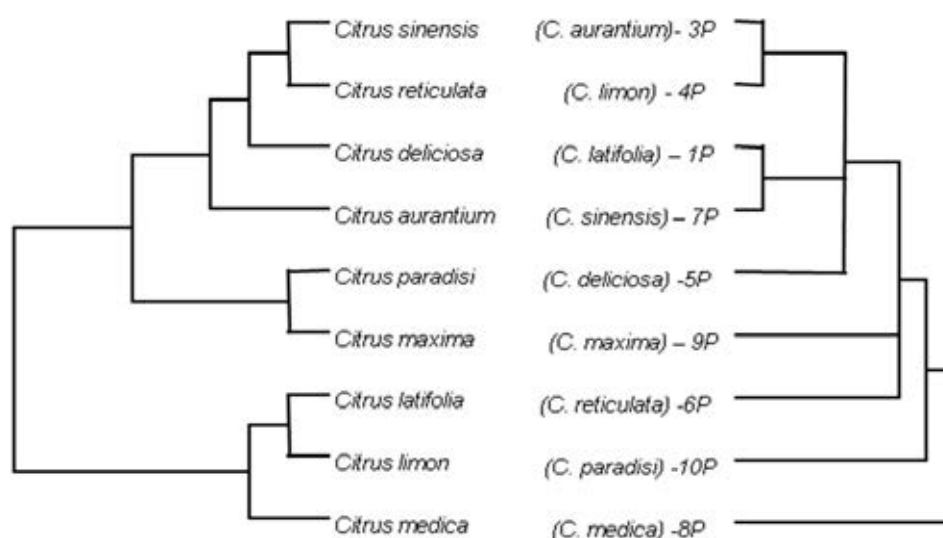


Figura 13. Comparação entre as árvores de consenso obtidas para espécies de *Citrus* (à esquerda) e *Guignardia citricarpa* (à direita) nas análises de AFLP. Os hospedeiros estão indicados entre parênteses.

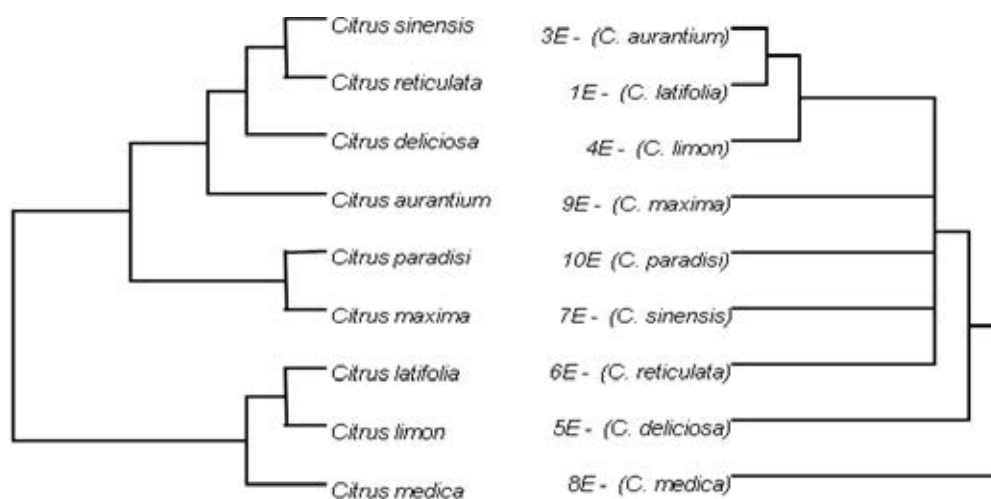


Figura 14. Comparação entre as árvores de consenso obtidas para espécies de *Citrus* (à esquerda) e *Guignardia mangiferae* (à direita) nas análises de AFLP. Os hospedeiros estão indicados entre parênteses.

Aparte os isolados de *C. medica*, os agrupamentos não congruentes, entre as espécies de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* presentes nas outras espécies de *Citrus* analisadas, mostram que as duas espécies do fungo pode colonizar diferentes hospedeiros cítricos, ou seja, estas espécies não apresentam especificidade quanto aos citros em estudo. Isso pode ser advindo da grande proximidade filogenética das espécies de *Citrus*, além de semelhanças no número cromossômico básico, química de metabólitos secundários e semelhanças morfológicas (GROPPO et al., 2008), reflexo, talvez, do tempo de divergência do grupo, relativamente curto (Mioceno, 12,1 - 28,2 milhões de anos; PFEIL & CRISP, 2008). Este curto tempo de divergência faria com que as espécies de *Citrus* fossem, geneticamente próximas, o que explicaria a possibilidade de formação de híbridos, mas dificultaria as inferências filogenéticas e o entendimento da taxonomia do grupo (BAYER et al., 2009). As espécies de *Guignardia* estudadas, então, não apresentariam barreiras para a dispersão conforme a espécie de *Citrus*, talvez com exceção de *C. medica*, onde uma diferenciação ocorre. Estudos utilizando *software* que estabelece relações evolutivas, comparando a filogenia do hospedeiro com a filogenia do patógeno, não foi necessário, uma vez que nos estudos, aqui realizados, não foi possível instituir um padrão associativo entre as filogenias geradas.

Contudo, estudos mais aprofundados sobre a interação entre as espécies de *Guignardia* e *Citrus* são necessários para se entender a história evolutiva dos dois grupos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados das análises filogenéticas utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP foram mais informativos que os resultados gerados com base no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, tanto para *Citrus* spp. quanto para *Guignardia* spp.

Os resultados obtidos pelas análises de AFLP permitem concluir que *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, isoladas de *C. medica*, apresentam maior distância filogenética em relação aos isolados das outras espécies cítricas.

A evolução do patossistema *Citrus/Guignardia* não pôde ser estabelecida, de forma geral, por meio da associação das filogenias geradas para *Citrus* e *Guignardia*, exceto no caso particular dos isolados de *C. medica*, que obedecem a um padrão associativo, tanto na relação patógeno/endofítico, quanto *Citrus/Guignardia*.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. **Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros**. Brasília DF. MAPA/SDA/DDIV, 2002.

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; BEJARANO, N.V.; ALVAREZ, S.E.; SERRANO, M.A.; BONILLO, M. C. Mancha negra de los citricos. **Epidemiologia y control**. San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 56p, 2000.

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. A DNA miniprep procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 52: 1217-1224, 2009.

ANTONIOLLI, Z.I.; SCHACHTMAN, D.; OPHELKELLER, D.; SMITH, S.E. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, Amsterdam, v.104, n.1, p.708-715, 2000.

ARAÚJO, E. F. de & MACHADO, M. A. Inferência filogenética de *Citrus* e gêneros relacionados por análises das regiões trnL(UAA)-trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA). **Gen. Molec. Biol.** 22 (3), Suppl.: 382, 1999.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR. W.; AGUILAR-VILDOSO C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO E.F; QUEIROZ, L.P.; MACHADO, M.A. What is Citrus? Taxonomic

implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Org. Divers. Ev.**, v.3, p.55-62, 2003.

ASTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ALTSCHUL, S.F.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25:3389-402, 1997.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**, Boca Raton: CRC Press, cap. 6, p. 189-207, 2007.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER Aa, H.A.; WEERDT, M. de; BROUWERSHAVEN, I.R. van; SCHUTTLE, G.C.; MACCHERONI JR, W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Washington, v. 92, p. 464-477, 2002.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections in developing fruits. **Annals of Botany**, Oxford, v. 2, p. 919-931, 1938.

BALDASSARI, R.B.; GOES, A.; SANTOS, J.M.; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from

Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 120, p. 103-110, 2008.

BARRET, H.C. & RHODES, M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematics Botany**, v.1, p.105-136, 1976.

BAYER, R.J; MABBERLEY, D.J.; MORTON, C.; MILLER, C.H.; SHARMA, I.K.; PFEIL, B.E.; RICH, S.; HITCHCOCK, R.; SYKES, S.. A Molecular Phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. In: **American Journal of Botany** 96(3): 668–685, 2009.

BISSET, J. & PALM, M.E. Species of *Phyllosticta* on conifers. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 67, p. 3378-3385, 1989.

BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, I.R. van; BAAYEN, R.P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht , v. 109, p. 503-513, 2003.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to a mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CITRUSBR - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. A Indústria Brasileira do Suco de Laranja. CitrusBR/Apex-Brasil, 2011.

COOKE, D.E.L., DRENTH, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G.; BRASIER, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 30, n.1, p. 17-32, 2000.

CORAZZA-NUNES, M. J.; MACHADO, M. A.; NUNES, W. M. C.; CRISTOFANI, M.; TARGON, M. L. P. N. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos [*C. maxima* (Burm.) Merr. using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, v.126, p.169-176, 2002.

CORAZZA-NUNES, M. J.; NOVELLI, V. M.; NUNES, W. M. C.; MOREIRA, A. L.O. R.; CARVALHO, S. A; MACHADO, M. A. Aurantioideae: Uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.26, n.2, p.359-374, 2005.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19, 229-306, 2001.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 582-584, 1993.

DENG, Z.; GENTILE, A.; NICOLSI, E.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. **Proceedings of the International Society of Citriculture** v.2, p. 2: 849-854, 1996.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.** 19: 11-15, 1987.

ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). **Die Naturlichen Pflanzenfamilien**, 2 ed. Leipzig: Engelmann. v.19a: 187-359, 1931.

EVERETT ,K.R.; REES-GEORGE, J. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 55, p. 194-199, 2006.

EWING, B; GREEN, P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8:186-194, 1998.

FANG, D.Q. & ROOSE, M.L. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.408-417, 1997.

FANG, D.Q.; KRUEGER, R.R.; ROOSE, M.L. Phylogenetics relationships among select *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat markers. **Journal of American Science**, v.123, p. 612-617, 1998.

FAWCETT, H.S. **Citrus disease and control**. New York: McGraw Hill Book, 656p, 1936.

FEDERICI, C.T.; FAN, D.Q.; SCORA, R.W. & ROOSE, M.L. Phylogenetics relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p. 812-822, 1998.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos Citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3rd.Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, v. 2:, cap. 25, p. 261-296, 1997.

FELSENSTEIN, J. Os limites de confiança em filogenias: uma abordagem utilizando o *bootstrap*. **Evolução**, 39:783-791, 1985.

FITCH, W.M. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**, 20:406-416, 1971.

FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M.R. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.2/3, p.192-199, 2002.

GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum, p.419-517, 1985.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 1995. 115p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO,C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GMITTER, F.G. Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. In: JANICK, J. (Ed). **Plant Breeding Reviews**. New York John Wiley and Sons. v.13 p.345-363, 1995.

GOES, A. & FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 15:73-75. 1993.

GOES, A. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 305-320, 1998.

GOES, A.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRICULTURE**, 2000, Orlando. Anais. Orlando: International Society of Citriculture, p.145, 2000.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.25, n.4, p.477-483, 2002.

GRAUR, D. & LI, W. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2ª edição, Sinauer Associates, Sunderland, 2000.

GREEN, R.M.; VARDI, A.; GALUN, E. The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among Citrus cultivars and species, and comparison with related genera. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p.170-177, 1986.

GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; DENG, X.X. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.829- 834, 2002.

HANDA, T.; ISHIZAWA, Y. & OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. **Japanese Journal of Genetics**, v.61, p.15-24, 1986.

HERBERT, J.A. Citrus black spot. **Citrus and Subtropical Fruit Research Institute**, Nelspruit. *Citrus* H.30, 1989.

HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1327-1334, 1996.

HILLIS, D.M. & DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, Ithaca, v.66, n.4, p.411- 453, 1991.

HUANG, X. and MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, 9, 868-877, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanente. v. 37, Brasil. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf. Acesso em: 25 jan. 2012.

KELCHNER, S.A.; WENDEL, J.F. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. **Curr. Genet** 30: 259-262, 1996.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings Linneage Society**, Sidney, v. 73, p. 249-292, 1948.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: Reuther, W., Calavan, E.C. & Carman, G.E. (Eds.) **The Citrus Industry** v. 4. Davis. University of California. pp.1-66. 1978.

KOTZÉ, J.M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely with particular reference to its epiphytology and control at Lebata.** (PhD Thesis). Pretoria. University of Pretoria, 1963.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v.65, n.12, p.945-950, 1981.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological research**, Ottawa, p. 287-295, 1992.

MABBERLEY, D.J. **Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae).** Telopea, v.7, p.333-344, 1998.

McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology**, Washington, v. 54, n. 12, p. 1448-1453, 1964.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to the control of black spot. **Phytopathology**, Washington, v. 57, p. 743-746, 1967.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, p. 129-140, 2007.

MEYER, L.; SANDERS, R.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant Disease**, Saint Paulo, v. 90, n. 1, p. 97- 101, 2006.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. D.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, cap. 9, p. 97-107, 2001.

NEI, M. & KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press. New York, 2000.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1155-1166, 2000.

OLIVEIRA, A.C. **Clorose variegada dos citros: quantificação molecular do agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de lócus de resistência quantitativa de citros à Wells (1997) com fAFLPs**. 281p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PANG, X.M.; HU, C.G.; DENG, X.X. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers. **Acta Genetica Sinica**, v.30, p.81-87, 2003.

PAUL, I.; JAARSVELD, A.S. Van; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 297-308, 2005.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York:Spring-Verlag, p. 179–197, 1991.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia**, Venezuela, Maracay, v. 48, p. 367-372, 1990.

POPESCU, C.F.; FALK, A.; GLIMELIUS, K. Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines. **Vitis**, Siebeldingen, v.41, n.4, p.177-182, 2002.

POTVIN, C; BERGERON, Y; SIMON, J.P. A numerical taxonomic study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biomechanical characters. **Syst. Bot.**, v.8, p.127-133, 1983.

PUNITHALINGAM, E.; WOODHAMS, J.E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp. **Nova Hedwigia**, Sttutgard, v. 36, p. 151-175, 1982.

RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRUNIG, C.R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, issr-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological research**, Cambridge, v. 108, p. 45-52, 2004.

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros**. 2006. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RODRIGUES, M.B.C. **Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa***. 2010. 125p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C. Y. E PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: Mاتيoli, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Brasil. Pp. 108-116, 2001.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2^a ed. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, 1989.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.915-919, 1994.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; HUESLER, A.;TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.11, n.3, p.513-522, 1994.

SCHUEPP, H. Untersuchungen uber *Guignardia citricarpa* Kiely, den erregder der schwarsfleckenkrankheit auf citrus. **Phytopathology Z.**, Stuttgard, v. 40, p. 258-271, 1961.

SCORA, R.W. On the history and origin of Citrus. Bull. Torrey Bot. Club, v.102. p.369-375, 1975.

SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; ESEN, A. & STONE, B. A phitochemical investigation of *Citrus halimii*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.4, p.255-258, 1988.

SCOTT, K.D.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. **Euphytica**, Wageningen, v.113, n.3, p.245-249, 2000.

SIMONE, M.D.; RUSSO, M.P.; PULEO, G.; MARSAN, P.A.; LORENZONI, C.; MAROCCO, A.; RECUPERO, G.R. Construction of genetic maps for Citrus aurantium and C. latipes based on AFLP, RAPD and RFLP markers. **Fruits**, v.53, p.383-390, 1998.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. J. Cramer., Germany. 701p, 1984.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, p.507-540, 1975.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. nos estados do Paraná e São Paulo**. Curitiba. 207p. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D.

(Ed.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, v.1, p.129-474. 1943.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, v.1, p.190-430. 1967.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic analyses using parsimony (and other methods)**, version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 2002.

TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. **Study in Citrologia**, v.14, p.1-6, 1977.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. CLUSTAL_X A interface do Windows: estratégias flexíveis para o alinhamento de sequência múltipla auxiliado por ferramentas de análise de qualidade. **Res. ácidos nucléicos**. 25: 4876 – 4882, 1997.

TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L.W. & Duncan, L.W. (Eds.) **Citrus Health Management**. Saint Paul. APS Press. pp.107-115, 1999.

TORRES, A. J. Estimativa Preliminar Safra de Laranja Estado de São Paulo. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 6, n. 5, 2011.

TORRES, A. M.; SOOST, R. K. & DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. **American Journal of Botany**, v.65, p.869-881, 1978.

VAN DER AA, H.A. Studies in Phyllosticta I. **Studies in Mycology**, Stanford, n. 5, 1973.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; RIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WICKERT, E.; GOES, A.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.; SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, F.D.; RINALDO, D. Relações Filogenéticas e Diversidade de Isolados de *Guignardia* spp oriundos de diferentes Hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 2, p. 360- 380, 2009.

WULANDARI, N.F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K.D.; DUONG, L.M.; GRUYTER, DE J.; MEFFERT, J.P.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of *Citrus* tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**. Harbin, v.34, p.23-39, 2009.

XU, C. J.; BAO, L.; ZHANG, B.; BEI, Z. M.; YE, X. Y.; ZHANG, S. L.; CHEN, K. S. Parentage analysis of huyou (*Citrus changshanensis*) based on internal transcribed spacer sequences. **Plant Breeding**, v. 125, Issue 5, p. 519–522, October, 2006.

YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y. & YAMADA, Y. Phylogenetic relationships of Citrus revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In: HAYASHI, T.; OMURA, M. & SCOTT, N. S. (Ed.). **Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees**. Okitsu, Japan: Fruit Trees Research Station, p.39-46, 1993.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprint. **European Patent Application n. 92402629.7.** (Publication n. 0534858 A1), 1993.