

DIORVANIA CARDOSO RIBEIRO

**RELAÇÃO FILOGENÉTICA, POR ITS-rDNA, DE *Colletotrichum* spp., AGENTE
CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA GALA EM MACIEIRA**

LAGES – SC

2007

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

DIORVANIA CARDOSO RIBEIRO

**RELAÇÃO FILOGENÉTICA, POR ITS-rDNA, DE *Colletotrichum* spp., AGENTE
CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA GALA EM MACIEIRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina - UDESC, para à obtenção do
Título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Altamir Frederico Guidolin

Co-orientador: Ph.D. Amauri Bogo

LAGES – SC

2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Ribeiro, Diorvania Cardoso
Relação Filogenética, por ITS-rDNA, de
Colletotrichum spp, agente causal da mancha foliar da gala
em macieira./Diorvania Cardoso Ribeiro – Lages, 2007.
72 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1.Maçã. 2. *Colletotrichum* spp. 3. Filogenia.4. rDNA. I.Título.

CDD – 634.11

DIORVANIA CARDOSO RIBEIRO
Engenheira Agrônoma-UDESC/LAGES -CAV

RELAÇÃO FILOGENÉTICA POR ITS-rDNA DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR DA GALA EM MACIEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em: 26/02/2007
Pela banca examinadora

Homologado em:
Por

Dr. Altamir Frederico Guidolin
Orientador – UDESC/Lages-SC

Dr. Ricardo Trezzi Casa
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado em
Produção Vegetal

PhD. Amauri Bogo
Co-Orientador – UDESC/Lages-SC

Dr. Osmar Klauberg Filho
Coordenador do Programa de Mestrado em
Agronomia

Dra. Eliane Aparecida Gomes
Embrapa Milho e Sorgo CNPMS - MG

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages-SC

**Dra. Adriana Cibele de Mesquita
Dantas**
UFSC/SC

Lages, Santa Catarina
26 de Fevereiro de 2007

Aos meus pais, Ocir e Giovania, por tudo que me proporcionaram em toda a minha vida, com amor,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca ter me abandonado, nem nos momentos mais difíceis, nos quais eu achava que Ele havia me esquecido. Entretanto, era nesses momentos que Ele estava mais presente em minha vida, nunca me deixando desistir.

A minha mãe, por ser a minha melhor amiga e também por nunca ter medido esforços para que eu realizasse os meus sonhos.

Ao meu pai, por estar sempre perto me ajudando nos trabalhos mais difíceis. Ele sempre me surpreendeu com seu enorme conhecimento e dedicação. Também, por se preocupar muito comigo, de um jeito que muitas vezes eu não compreendia, mas era o jeito dele.

Ao meu irmão, que apesar das nossas brigas, eu não saberia viver sem ele.

Aos meus avós, que sempre me deram muito apoio. Agradeço em especial as orações sempre bem vindas da minha Avó Terezinha.

Ao meu noivo André, uma pessoa muito especial em minha vida, que esteve presente em todos os momentos desta etapa, sendo sempre compreensivo na minha ausência e me apoiando em tudo. Eu o amo muito!

A minha prima Juliana, que sempre foi a minha psicóloga de plantão, me aconselhando, me ouvindo e sendo sempre uma amiga maravilhosa.

A minha amigona Bia, pois foi e sempre será a minha melhor amiga, ou melhor, minha mãezinha como eu costumo chamá-la. Ela será sempre muito especial em minha vida.

As grandes amigas que fiz durante o mestrado, Tamara e Carla, vocês tem um lugar especial em meu coração. Sentirei saudades....

A amigona Cláudia Appio, pela amizade, dedicação, ajuda... enfim ela foi peça chave do meu trabalho, meu braço direito.

A todos os meus amigos de A a Z, pois se fosse citar nomes, poderia esquecer de alguém. Obrigada pelas festas, pela companhia, pelo carinho e amizade.

Aos meus orientadores Altamir Frederico Guidolin, Amauri Bogo, Adriana Dantas pela atenção e carinho que sempre tiveram comigo.

A professora e grande amiga Cileide Arruda Coelho, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos professores Jefferson Coimbra e Adelar Mantovani, por terem me agüentado durante a minha análise estatística, sempre foram muito prestativos e atenciosos. E também pelos momentos de descontração, especialidade do professor Jefferson.

Ao professor Carlos André e Ricardo Casa pela amizade e ensinamentos repassados.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade em cursar o mestrado e também pela concessão da bolsa, sem a qual não teria sido possível cursar o mestrado.

A Embrapa Milho e Sorgo, na pessoa da Dra. Eliane Gomes e do técnico Ubiraci Lana, pelo carinho e atenção.

Ao CNPq e a Fapesc pelo financiamento do meu projeto.

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para minha formação.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

RESUMO

A maçã é a fruta de clima temperado de maior dispersão, consumo e a mais comercializada como fruta fresca em todo o mundo. A produção de maçã no Brasil tem sido comprometida pela incidência de várias doenças, das quais a Mancha Foliar da Gala (MFG), cujo agente causal são espécies de *Colletotrichum* spp., tem sido, atualmente, uma das maiores preocupações dos produtores e pesquisadores. A origem desta doença em macieira ainda não está bem esclarecida e a utilização de estudos baseados na filogenia permitem relacionar os organismos evolutivamente, caracterizando possíveis mecanismos de divergência evolutiva e a origem do patógeno, contribuindo na adoção de medidas de controle e prevenção quanto ao surgimento de novas raças. O presente trabalho objetivou estudar a variação do DNA ribossomal, (rDNA) entre isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos em macieira, em citros e goiaba serrana. Todos os isolados foram cultivados em meio BDA, por uma semana a 24°C. A amplificação do rDNA foi realizada utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4, seguida pela digestão da região ITS (espaçador interno transcrito) com enzimas de restrição (*Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I). Os produtos obtidos na amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA revelaram um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb), para todos os isolados analisados. Todos os fragmentos amplificados foram clivados, obtendo uma grande variação, a qual foi de 90 a 500 pb. Utilizando a técnica de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) foi possível separar e agrupar os isolados em haplótipos, a qual foi eficiente para a correlação entre haplótipo e hospedeiros, agrupando em um mesmo haplótipo isolados do mesmo hospedeiro. O fragmento amplificado foi purificado com kit QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Qiagen, Hilden, Germany) e as amostras foram seqüenciadas na região ITS do rDNA de todos os isolados. As seqüências foram alinhadas no software ClustalW e a árvore filogenética foi construída no software Mega 3.1. Com o seqüenciamento de DNA foi possível inferir sobre a possível espécie de fungo que pertence o segmento de DNA analisado. A região ITS do rDNA mostrou-se muito eficaz para estudos de filogenia. A partir da árvore filogenética foi possível agrupar os isolados de *Colletotrichum* por espécies, independente do seu hospedeiro. Todas as seqüências obtidas apresentaram valores superiores a 93% de similaridade, fato esse, que reforça que o *Colletotrichum* spp., causador da MFG, possui relações de parentesco com o isolados de *Colletotrichum* spp. isolados de citros e de goiaba serrana.

Palavras chaves: macieira, *Colletotrichum* spp., filogenia molecular, ITS, rDNA

ABSTRACT

The apple is a temperate climate fruit with larger dispersion, consumption and the more marketed all over the world as fresh fruit. The apple production has been committed by the incidence of diseases, in which Apple Leaf Spot (ALS), whose causal agent is the *Colletotrichum* spp. Nowadays this disease is one of the largest concerns of the producers and researchers. The origin of this disease in apple tree plants is not still well known. Studies based on the phylogeny allow to relate evolutionarily the organisms and characterize possible divergence mechanisms origin. This will contribute in disease control and prevention of new races sprout. The objective of this work was to study the variation of the ITSs rDNA among apple tree pathogenic isolates of *Colletotrichum* spp. from apple, citrus and feijoa. All isolates were first cultivated on PDA, for one week at 24°C. In the PCR amplification of the rDNA was used initiators ITS1 and ITS4. The amplified fragment was digested with restriction enzymes (*Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI and *Taq* I). The revelation was in 2% agarose gel. It was obtained a great variation with products of the cleaved PCR products, from 90 to 500 pb. The amplified fragment was purified (QIAquick Gel Extraction Kit 250 - Uniscience of Brazil) and the fragment (ITS of the rDNA) was sequenced for all isolates. The sequences were aligned with the ClustalW software and the phylogenetic tree was constructed in the Mega 3.1 software. The products obtained in the PCR amplification of the rDNA region (ITS1-5,8S-ITS2), with the initiators pair ITS1 and ITS4 revealed a fragment with approximately 600 pb, for all the isolated analyzed. Through the analysis for the ARDRA was possible to separate isolates groups in haplotypes, which was efficient for the correlation between haplotypes and hosts, containing in a same haplotypes of the same host. It was possible to group the isolates of *Colletotrichum* in species, using the phylogenetic tree, independent of his host. All of the obtained sequences presented more than 93% of similarity, fact that reinforces the hypothesis that the *Colletotrichum* spp., causal agent of ALS, is nearly related with citrus and feijoa *Colletotrichum*.

Key words: apple, *Colletotrichum* spp., phylogeny, ITS, rDNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossômico. As setas indicam as regiões flanqueadas pelos iniciadores ITS1 e ITS4..... 18
- Figura 2.** Produto do PCR resultante da utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4, em gel de agarose 2%, mostrando o fragmento (aproximadamente 600 pb) obtidos dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros (M – ladder 100 pb e CN – controle negativo, demais números se referem aos isolados)..... 26
- Figura 3.** Perfis eletroforéticos obtidos com as enzimas de restrições da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, com endonucleases de restrição (M-Ladder 100 pb; P-fragmento padrão sem clivagem com enzima de restrição, os demais números se referem aos isolados)..... 30
- Figura 4.** Frequência dos sete padrões de ARDRA obtidos pela análise de restrição do fragmento amplificado da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, com as endonucleases de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I 31
- Figura 5.** Árvore filogenética construída pelo software Mega 3.1 a partir de seqüências da região ITS do rDNA de 39 isolados de *Colletotrichum* spp. de maçã, 2 isolados de citros, 10 isolados de goiaba serrana e seqüências de isolados de *Colletotrichum* spp. de citros e macieira do *GenBank*, utilizando o método *Neighbor-Joining*. A seqüência do isolado *Pestalotia* obtida no *GenBank* foi utilizado como *outgroup*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 10.000 repetições 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Acesso, hospedeiro, espécie e procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp. ... 20
- Tabela 2.** Componentes da reação de amplificação do DNA dos *Colletotrichum* spp. e respectivas concentrações utilizadas em uma reação de ITS 23
- Tabela 3.** Fragmentos de restrição da região ITS do rDNA amplificado dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, produzidos pelas enzimas de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Hha* I, *Eco* RI (NC – não clivou), em pares de base (pb)..... 26
- Tabela 4.** Fragmentos de restrição da região ITS do rDNA amplificado dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, produzidos pelas enzimas de restrição *Hinf* I, *Acc* I, *Taq* I, *Hpa* II (NC – não clivou), em pares de base (pb) 28
- Tabela 5.** Distribuição dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros nos diferentes haplótipos obtidos..... 30
- Tabela 6.** Análise de confrontação das seqüências obtidas com as do banco de dados do *GenBank*, por meio do *Blast_n* com a espécie de maior score 32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 A CULTURA DA MACIEIRA	14
2.2 A MANCHA FOLIAR DA GALA.....	15
2.3 O GÊNERO <i>Colletotrichum</i> spp.....	17
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA POR SEQÜENCIAMENTO DO DNA RIBOSSOMAL E ARDRA	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	20
3.2 OBTENÇÃO DO MICÉLIO UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO DO DNA.....	21
3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	21
3.4 LIMPEZA E DILUIÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	22
3.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA.....	23
3.6 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO rDNA (ARDRA)	24
3.7 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS PARA O SEQÜENCIAMENTO	24
3.8 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA	24

3.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) destaca-se no cenário nacional pela quantidade de maçã produzida, chegando na safra 2003/2004 a produzir quase um milhão de toneladas da fruta (IBGE, 2005). A expansão do cultivo no Sul do Brasil deve-se aos constantes investimentos em pesquisa científica e tecnológica, tanto por parte de instituições públicas quanto privadas. Muitos fatores limitantes atuam na redução da expansão da cultura, entre eles, a incidência de doenças. A Mancha Foliar da Gala (MFG), cujo agente causal é o fungo do gênero *Colletotrichum*, pode ocasionar até 75% de desfolhamento na planta, reduzindo drasticamente a produção de frutos (BONETTI et al., 1998). Este fitopatógeno pode causar também prejuízos em várias outras culturas, tais como citros, goiabeira, mangueira, morangueiro, feijoeiro, tomateiro, entre outras (FREEMAN et al., 1999). A origem e disseminação da MFG ainda não estão bem esclarecidas (KATSURAYAMA, 2001). Há relatos de que esta doença tenha chegado às macieiras cultivadas em São Paulo e Paraná, a partir das culturas tropicais ou subtropicais como o citros, pois algumas espécies de *Colletotrichum*, devido à grande variabilidade deste fungo, podem estabelecer relações parasíticas com vários hospedeiros (FREEMAN, et al., 1999 e KATSURAYAMA, et al., 2001). Esta doença foi detectada concomitantemente com a implantação de alguns pomares de maçã em regiões mais quentes, como os Estados do Paraná, e São Paulo, em substituição a pomares de citros (*Citrus sinensis* L.) ou em locais próximos a pomares de citros, os quais já apresentavam problemas com o gênero *Colletotrichum*. Outro fator importante são os pomares de macieira implantados em regiões próxima a mata nativa, onde o gênero *Colletotrichum* tem também causado problemas em goiaba serrana (*Feijoa sellowiana*), espécie nativa da região Sul do Brasil.

Em razão da grande variabilidade genética existente entre os isolados associados a esta doença, características morfológicas (PERES et al., 2003 e HAMADA, 2005) são utilizadas para descrever o agente causal, porém com a possibilidade do surgimento de novas raças na população do patógeno, é necessário um estudo que permita o esclarecimento da origem da MFG, de forma mais eficiente e precisa. Marcadores moleculares de DNA têm auxiliado

nestes estudos (HAMADA, 2005). O estudo do rDNA (DNA ribossomal), onde são encontradas regiões conservadas do genoma, como os ITSs, proporcionam estudos para a análise filogenética das espécies, permitindo assim, a separação dos isolados em espécies distintas e conseqüentemente, diferenciação dos isolados dentro de cada espécie (FREEMAN, et al., 1999). A construção de uma árvore filogenética indica a história evolutiva de um organismo, indicando as relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (NAHUM, 2001). Assim, é possível conhecer as relações filogenéticas existentes entre indivíduos da mesma espécie obtidos de diferentes hospedeiros, a fim de melhorar as condições de manejo das culturas, buscando alternativas mais eficazes para o controle dos patógenos.

Este trabalho objetivou investigar a relação filogenética entre isolados do gênero *Colletotrichum* spp., agente causal da MFG em macieira, da podridão floral e antracnose dos citros e da antracnose em goiaba serrana, na região Sul do Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

A maçã é a fruta de clima temperada de maior dispersão e a mais consumida e comercializada como fruta fresca em todo o mundo, sendo a quarta fruta de maior produção no mundo, perdendo somente para citros, uva e banana (HAUAGGE e BRUCKNER, 2002). Pertencente à família Rosaceae tem suas origens nas montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático. Já bastante cultivada na Ásia e Europa desde os tempos mais antigos, hoje é cultivada em várias regiões do mundo, desde a Sibéria até as regiões altas nos trópicos (BLEICHER, 2006).

O cultivo da macieira é recente no Brasil e se estabeleceu por meio de grandes empresas atraídas por incentivos de políticas públicas, as quais instalaram pomares e montaram toda a infra-estrutura de câmaras frigoríficas, transporte a frio e estrutura de comercialização (HAMADA, 2005). A cadeia produtiva da maçã tem, hoje, uma característica própria, pois o país passou da posição de importador à condição de exportador. Em 1975, a área plantada com a macieira no Brasil era de 3.150 ha (MELLO, 2004). A partir desta data a quantidade produzida evoluiu de 1.528 toneladas a 973.300 toneladas na safra 2003/2004,

onde Santa Catarina contribuiu com 583.205 toneladas, correspondendo a 52% da produção nacional (VIEIRA, 2005). As empresas nacionais líderes no setor contam com 78% na produção das variedades Gala, Fuji e variedades oriundas de suas mutações (Royal Gala, Imperial Gala, Galaxy, Fuji Suprema), as quais são produtos de classe internacional com permanente atualização tecnológica e de controle ambiental (ABPM, 2005).

A cultivar Gala corresponde a 55% da área plantada no Estado de Santa Catarina, sendo responsável por 95% da exportação. É a cultivar mais precoce dentre as plantadas no Sul do Brasil, assim, geralmente alcança bom preço no mercado, exercendo importante papel econômico. Entretanto, por ser altamente suscetível à Mancha Foliar da Gala, sério problema fitossanitário no Sul do Brasil (CAMILO et al., 2002), há importância de um estudo mais detalhado, a fim de melhorar as condições de manejo da cultura da macieira, buscando alternativas mais eficazes para o controle deste patógeno, ou ainda, obter clones desta cultivar que sejam resistentes à doença.

2.2 A MANCHA FOLIAR DA GALA

A Mancha Foliar da Gala (MFG) é uma das doenças mais importantes no Sul do Brasil, principalmente em altitude inferior a 1.200m (KATSURAYAMA et al., 2000). Relatada pela primeira vez em 1983 (LEITE et al., 1988), no Paraná, vem causando severo desfolhamento das plantas da cultivar Gala. Mais tarde, esta doença disseminou-se pelos pomares de Fraiburgo, SC (ciclo 1989/90) e Vacaria, RS. Na cidade de São Joaquim, SC, a MFG se estabeleceu em 1993, na Comunidade de Luizinho (± 1.000 m de altitude), porém, a doença só se manifestou na região mais alta de São Joaquim (1.300 a 1.400 m), no ciclo 1997/98, após longo período de chuvas abundantes e temperaturas altas provocadas pelo El Niño, demonstrando, claramente, a influência do ambiente na epidemiologia desta doença (KATSURAYAMA et al., 1999).

A MFG é causada por fungos de gênero *Colletotrichum*, principalmente *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz., forma imperfeita de *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauling & Von Schreenk (SANHUEZA et al., 1998). De acordo com sua morfologia e características culturais, os isolados obtidos a partir de lesões em folha e fruto podem ser divididos em três grupos (BONETTI et al., 1999). No gênero *Colletotrichum* existe uma grande variação quanto à morfologia, hospedeiro, patogenicidade e fisiologia, o que torna difícil o estudo da sua taxonomia (BROOKER et al., 1991).

Esta doença manifesta-se a partir da primavera-verão e reduz a produção de frutos quantitativa e qualitativamente (BONETTI et al., 1999). Os danos mais comuns observados são a desfolha da planta (50 a 75%) e a formação de cancrios em mais de 50% dos frutos (CEREZINE et al., 1992). Tradicionalmente, a doença ocorria nas regiões mais quentes, com altitudes de até 1000 m (BERGAMIN et al., 1995). A disseminação deste patógeno é eficiente, sendo os conídios o principal inóculo da doença. Nos pomares novos, a disseminação ocorre através de mudas infectadas, no entanto nos pomares em produção, a disseminação se dá através de ‘bins’ contaminados, que contêm folhas e ramos infectados. Esta hipótese é reforçada pelo fato, que o primeiro ‘foco’ da doença surgiu próximo aos pátios de manobra de veículos, ou nas plantas localizadas junto às rodovias (KATSURAYAMA et al, 2001). Uma vez o patógeno esteja estabelecido na planta, este se dissemina por meio dos esporos levados pelo respingo ou escorrimento d’água da chuva.

O controle da MFG tem sido realizado com a aplicação dos fungicidas Mancozeb e Dithianon. Em anos de verão quente e chuvoso, requer até 20 aplicações destes fungicidas, aliado a doses altas, que são efetuadas de novembro até após a colheita, resultando em maior risco de contaminação da fruta. Por outro lado, as normas de Produção Integrada de maçã no Brasil, limitam o uso de fungicidas em até cinco aplicações anuais, podendo em casos excepcionais, atingir oito aplicações, com período de carência de 21 dias. Considerando-se que o período que antecede a colheita é o mais crítico em relação ao ataque da doença, pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas (SANHUEZA et al., 2002).

O aumento no uso de fungicidas para o controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint), tem reduzido a aplicação dos fungicidas protetores utilizados para o controle da MFG, facilitando a ocorrência da doença (HAUAGGE e BRUCKNER, 2002). Diante deste fato, é necessária a obtenção de cultivares resistentes à Mancha Foliar da Gala e o manejo adequado de pomares. As práticas de controle mais importantes estão relacionadas com o manejo das plantas (poda e condução) e o constante monitoramento dos pomares, visando reduzir as fontes de inóculo para que, na primavera seguinte, haja a menor quantidade possível da doença.

2.3 O GÊNERO *Colletotrichum* spp.

O gênero *Colletotrichum* engloba diversas espécies de fungos imperfeitos pertencentes à ordem Melanconiales da classe Coelomycetes, incluindo saprófitas e fitopatógenos, os quais apresentam uma associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* (LOPES, 2001). O patógeno ocorre em diferentes hospedeiros, desde culturas agrícolas e plantas medicinais, aos arbustos e árvores silvestres, causando lesões como podridões de colmo, caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnoses (LOPES, 2001).

O gênero *Colletotrichum* produz acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, dispostos em círculos, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que podem ser ovalados ou oblongos. Na fase perfeita (teleomorfa) são denominados como sendo do gênero *Glomerella* (BARNETT et al., 1998). Os conídios são liberados dos acérvulos através de uma massa viscosa gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002).

A forma e tamanho dos conídios de *Colletotrichum* podem variar entre as espécies. Conídios de *C. gloeosporioides*, por exemplo, são uninucleados, apresentam um comprimento de 12-19 μm e uma largura de 1-6 μm , são arredondados nas extremidades e levemente curvos. Os ascósporos são unicelulares e curvados, medindo 12-24 x 4-6 μm (RIBEIRO, 1997). A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa do ar (100% URA). No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES, 2002). Os conídios são disseminados na planta pela água da chuva e produzidos durante todo o ano. O micélio pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes, não mostrando as plantas sintomas das doenças (RIBEIRO, 1997).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, geralmente ocorrendo em ambientes úmidos e quentes dos trópicos. Os prejuízos causados por este patógeno, principalmente em países de clima tropical, resultam tanto na redução

direta da quantidade e da qualidade dos produtos, bem como no aumento dos custos de produção e de pós-colheita (LOPES, 2001). Devido à versatilidade epidemiológica causada pelo *Colletotrichum*, especialmente em culturas perenes, e a deficiência existente no controle deste patógeno, se requer mais pesquisas para que sejam adotadas outras práticas que visam o melhor controle das doenças causadas pelos fungos deste gênero (LOPES, 2001).

2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO DO DNA RIBOSSOMAL E ARDRA

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para os estudos de diversidade genética, seus genes, os rDNAs, são universalmente distribuídos entre os grupos de seres vivos, sendo a molécula com maior grau de conservação existente (JUNIOR et al., 2002). O rDNA proporciona meios para a análise filogenética, de acordo com os níveis taxonômicos das espécies, permitindo assim a separação dos isolados em espécies distintas e, conseqüentemente, diferenciação dos isolados dentro de cada espécie (FUNGARO, 2000). A unidade de DNA ribossomal consiste de uma série repetitiva em *tandem*, de três regiões gênicas (18S, 5,8S e 28S) e duas regiões espaçadoras (ITS). Os ITS1 e ITS2 são encontrados entre as subunidades pequena (18S) e grande (28S) do ribossomo, onde ocorre variabilidade a um nível intra-específica e a 5,8S que se encontra entre o ITS1 e o ITS2 (HSIANG e WU, 2000 e FREEMAN et al, 2001) (Figura 1).

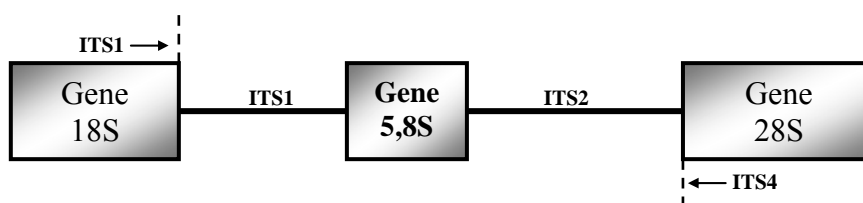


Figura 1. Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossômico. As setas indicam as regiões flanqueadas pelos iniciadores ITS1 e ITS4. (Fonte: White et al., 1990-modificado)

Atualmente a região ITS tem sido muito utilizada para fins de filogenia, por ser, muitas vezes, uma região específica para cada espécie e com baixas variações dentro do gênero (COOKE et al., 2000) e na detecção e identificação de novas espécies de fungos (PAUL, 2001). Para a análise de diversidade genética e filogenia é apropriado o uso de genes do rDNA, os quais normalmente são encontrados em múltiplas cópias, com regiões altamente

conservadas e unidas por regiões que podem ser altamente variáveis. As regiões ITS conservada carregam informações sobre a filogenia e o nível taxonômico.

As regiões ITS de diversos organismos já foram seqüenciadas (TORRES et al., 1990 e NAVAJAS et al., 1999) e vem sendo utilizadas para fazer a distinção entre isolados de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. cocodes*, *C. fragariae*, *C. kahawae*, *C. lindemuthianum*, *C. orbiculare* entre outros (BROWN et al., 1996; CORREL, et al., 1993, FREEMAN et al., 1993; SHERRIFF et al., 1994). As regiões ITS são relativamente curtas (500-800 pb) e aparecem em grande número de cópias no genoma. Em consequência disto, é grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos que estão disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (MARTINS, 2005). Os programas computacionais que permitem a comparação destas seqüências auxiliam nos estudos filogenéticos, permitindo que seja possível a reconstrução da história evolutiva de um organismo.

Outra metodologia utilizada no estudo da diversidade genética de fungos é a técnica ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”), que consiste na amplificação e posterior clivagem do rDNA com o uso de enzimas de restrição. Cada enzima possui um padrão específico de corte da molécula de DNA, o que resulta em uma série de fragmentos genômicos que podem ser isolados, clonados e seqüenciados (CANDEIAS, 1991). O uso de enzimas de restrição é indicado para estudos de diversidade com fins taxonômicos, devido à especificidade destas enzimas de restrição em clivar o DNA de qualquer organismo (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999). As endonucleases de restrição geram alto polimorfismo da região possibilitando assim utilizar estas regiões espaçadoras como marcadores moleculares em estudos de discriminação de diferentes espécies de fungos (DESTÉFANO, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) e o seqüenciamento direto tornaram possível a comparação de ITS de muitos isolados, bem mais do que pela clonagem tradicional (WHITE et al., 1990), permitindo assim estimar as relações de ancestralidade entre organismos. Desta forma o estudo filogenético permite a caracterização dos possíveis mecanismos de divergência evolutiva, bem como a origem do patógeno, contribuindo para a adoção de medidas de controle e prevenção no que se refere ao surgimento de novas raças do patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados 39 isolados de *Colletotrichum* provenientes de folhas de macieira e obtidos da micoteca da Estação Experimental da Epagri de São Joaquim-SC, dois isolados provenientes de folhas de laranja doce e lima ácida, pertencentes a Fundecitros-SP e 10 isolados provenientes de frutos de goiaba serrana (Tabela 1).

Os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata Agar Dextrose, Anexo 1.1) e mantidos em câmara BOD a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por sete dias.

TABELA 1. Acesso, hospedeiro, espécie e procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Acesso	Hospedeiro	Espécie	Procedência
M1	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Caçador/ SC
M2	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Caçador/ SC
M3	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Caçador/ SC
M4	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Vacaria/ RS
M5	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Vacaria/ RS
M6	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M7	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M8	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M9	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Frei Rogério/ SC
M10	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Curitibanos/ SC
M11	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M12	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M13	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	São Joaquim/ SC
M14	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmas/ PR
M15	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Fraiburgo/ SC
M16	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Fraiburgo/ SC
M17	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M18	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M19	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M20	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M21	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Campo Tenente/ PR
M22	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M24	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M25	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M26	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M27	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M28	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M29	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M30	Macieira	<i>C. gloeosporioides</i>	Palmeira/ PR
M31	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC

Acesso	Hospedeiro	Espécie	Procedência
M32	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M33	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/SC
M34	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Fraiburgo/ SC
M35	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M36	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M37	Macieira	<i>C. acutatum</i>	Palmas/ PR
M38	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
M39	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
M40	Macieira	<i>C. acutatum</i>	São Joaquim/ SC
G1	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G2	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G3	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Nova Prata/ RS
G4	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G5	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G6	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	São Joaquim/ SC
G7	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Vacaria/ RS
G8	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Lages/ SC
G9	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anita Garibaldi/ SC
G10	Goiaba Serrana	<i>Colletotrichum</i> sp.	Anita Garibaldi/ SC
C1	Citros	<i>C. gloeosporioides</i>	Pardinho/ SP
C2	Citros	<i>C. acutatum</i>	Cordeirópolis/ SP

3.2 OBTENÇÃO DO MICÉLIO UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO DO DNA

Os 51 isolados foram cultivados em meio líquido de Batata Sacarose (BS, Anexo 1.2), mantidos sob agitação constante de 75 rpm, no escuro à temperatura de 25°C por sete dias. Após este período, a massa micelial de cada isolado foi filtrada em papel filtro com auxílio de bomba a vácuo, lavados com água ultra pura e liofilizado por 24 horas. O micélio de todos os isolados foi armazenado em micro tubos de 2 mL e mantidos à temperatura de 4°C para a extração do DNA.

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com SCHÄFER e WÖSTEMEYER (1992) modificado por JUNGHANS et al. (1998), no Laboratório de Análises Genéticas do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC Lages (IMEGEM UDESC). Em almofariz, 0,5 g de micélio liofilizado de cada isolado foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para micro tubo de 1,5 mL que recebeu 500 μ L do tampão

de lise (Tris-HCl 50mM pH 7,2; EDTA 50mM pH 8,0; SDS 3%; β -Mercaptoetanol 1%; Anexo 2.6). Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 65°C em banho-maria por 1 hora e após, foi adicionando 500 μ L de fenol:clorofórmio (1:1), misturando suavemente as fases e centrifugando as amostras a 12.000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo adicionando-se 500 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizada e centrifugada na mesma condição anterior. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tubo, adicionando-se 500 μ L de isopropanol, homogeneizado e mantido por uma hora a -20°C. Após a precipitação do DNA, procedeu-se uma centrifugação a 12.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi totalmente descartado e o DNA lavado com 100 μ L de etanol 70% e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O etanol foi descartado e as amostras foram mantidas invertidas na bancada por 20 minutos para secagem do DNA. O DNA foi ressuscitado com 100 μ L de água ultrapura. Foram adicionados 4 μ L de RNase (10 mg.mL⁻¹) em cada amostra e incubado por 30 minutos a 37°C e armazenados a -20°C.

A estimativa da concentração do DNA extraído foi realizada em géis de agarose 0,8% (Anexo 3.1) contendo 0,5 μ g.mL⁻¹ de brometo de etídeo, utilizando-se como padrão o DNA Fago Lambda, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng. μ L⁻¹.

3.4 LIMPEZA E DILUIÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

A 50 μ L de cada DNA extraído foram adicionados 500 μ L de TE (Tris-HCl 50mM pH 7,2; EDTA 50mM pH 8,0; Anexo 2.6) e 500 μ L fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 50 μ L de NaCl 5M e homogeneizado por 5 minutos. E após foi acrescentado 1 mL de etanol absoluto gelado e deixado no freezer a -20°C durante a noite. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos, descartado o sobrenadante e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% que foi descartado e as amostras invertidas na bancada por 20 minutos para secagem dos DNAs. As amostras dos DNAs foram ressuscitadas em 100 μ L de água ultrapura. Para a utilização dos DNAs, nas reações de PCR, as amostras foram diluídas com água ultrapura para uma concentração final de 20 ng. μ L⁻¹ e armazenados a -20°C.

3.5 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA

As regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (*Invitrogen*) (WHITE et al., 1990). As amplificações foram realizadas em um Termociclador Hybaid PCR Express e GeneAmp® PCR System 9700, programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (30 segundos a 94°C), uma etapa de anelamento (60 segundos a 55°C) e uma etapa de extensão (90 segundos a 72°C) e por fim uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a amplificação das amostras foram utilizados os componentes conforme estão descritos na Tabela 2. Após a amplificação, 4 μ L da reação de PCR, mais 4 μ L de tampão de corrida, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2% (Anexo 3.1), em tampão TBE 1X (Tris – HCl 0,89M; Ácido Bórico 0,89M; EDTA 0,02M), juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (pares de base). Após a corrida, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

TABELA 2. Componentes da reação de amplificação do DNA dos isolados de *Colletotrichum* spp. e respectivas concentrações utilizadas em reação de ITS.

Componentes	Concentração Estoque	Volume na Reação (μ L)	Concentração/Quantidade Final
H ₂ O Ultra Pura	—	28,25	—
Tampão	10X	5,0	1X
dNTPs	25 mM	0,5	0,25 mM
Iniciador ITS1	10 μ M	5,0	1,0 μ M
Iniciador ITS4	10 μ M	5,0	1,0 μ M
MgCl ₂	50 mM	3,0	3 mM
<i>Taq</i> polimerase	5 U/ μ L	0,25	1,25 U
DNA	20 ng/ μ L	3,0	60 ng
TOTAL	—	50 μ L	—

3.6 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO rDNA (ARDRA)

Após a amplificação do fragmento da região ITS dos rDNAs, descrito no item 2.5, estes foram submetidos a análise de restrição pela técnica de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Os produtos de PCR (5 μ L) foram digeridos com as endonucleases de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante e incubados à noite.

O perfil de restrição foi visualizado em gel de agarose 2% (Anexo 3.1), utilizando-se nas linhas de extremidade dos géis um marcador de fragmentos de tamanho de DNA Ladder (*Invitrogen*) com 100 pb e uma amostra do fragmento amplificado não digerido, como padrões. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado. Para algumas enzimas foi necessário utilizar gel de poliacrilamida 6% (Anexo 3.2), para separar fragmentos com tamanhos muito similares. Após foi realizada a análise dos géis para o agrupamento das amostras em haplótipos (Anexo 7).

3.7 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Os produtos de amplificação correspondentes à região ITS do rDNA de todos os isolados de *Colletotrichum* spp. foram purificados utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior seqüenciamento.

3.8 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA

Para o seqüenciamento da região ITS do rDNA foi utilizado o kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 (*Applied Biosystems*). Foram feitas 2 reações, uma utilizando o iniciador ITS1 e outra o iniciador ITS4 para seqüenciamento da fita complementar.

O volume total da reação por amostra foi de 10 μ L, contendo 5 μ L do fragmento DNA purificado, 2 μ L de Big Dye v3.1, 2 μ L de Tampão de diluição 5X e 1 μ L de um dos iniciadores (ITS1 e ITS4 - 10 μ M). A reação foi incubada em termociclador PTC-200TM (MJ Research, Watertown, MA, USA), utilizando o programa de 20 segundos a 96°C para

desnaturação do DNA, 15 segundos a 50°C para anelamento dos iniciadores e 4 minutos a 60°C para extensão da fita de DNA, sendo repetido por 30 vezes. Para precipitar e limpar os nucleotídeos marcados com fluorescência, que não foram incorporados na reação, foi utilizado 40 μ L de isopropanol 75% (*Merck*) e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro e centrifugado por 45 minutos a 1.900 g. O isopropanol foi descartado e 100 μ L de etanol 70% (*Merck*) foi adicionado. Procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 1.900 g e todo o líquido foi removido. Depois de secas, as amostras receberam 10 μ L de formamida e as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C. As reações foram processadas no seqüenciador automático de DNA ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (*Applied Biosystems – Hitachi*).

3.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Na análise filogenética foram utilizadas seqüências dos isolados de *Colletotrichum* (Tabela 1) e seqüências obtidas no *GenBank*. As seqüências obtidas através do seqüenciamento foram editadas pelo software SeqScape 2.5 da Applied Biosystems e utilizadas para busca de seqüências similares usando o software *Blast_n* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Anexo 5). Após o alinhamento pelo software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Anexo 4) as seqüências foram processadas no Software Mega 3.1 (Anexo 6), para construção da árvore filogenética dos isolados de *Colletotrichum* spp. Foi utilizado o método de TAMURA-NEI (1993) para a construção da matriz de distâncias, e o método de *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987) para a construção da árvore com um “bootstrap” de 10.000 replicações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos de PCR obtidos na amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal de todos os isolados de *Colletotrichum* spp., apresentaram aproximadamente 600 pares de base (pb) (Figura 2) e corroboram com os dados obtidos por BUDDIE (1999), FREEMAN et al. (2001) e CULEBRAS et al. (2003) com isolados de *Colletotrichum* de macieira, abacateiro, pessegueiro e morangueiro.

Após a digestão com as endonucleases de restrição, obteve-se uma variação de fragmentos de 90 a 500 pb, com as enzimas *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Xho* I, *Acc* I,

Eco RI e *Taq* I (Figura 3). Nas Tabelas 3 e 4 podem ser observados os fragmentos com mais de 90 pb resultantes da digestão com as enzimas de restrição. A enzima *Xho* I não clivou nenhuma das amostras.

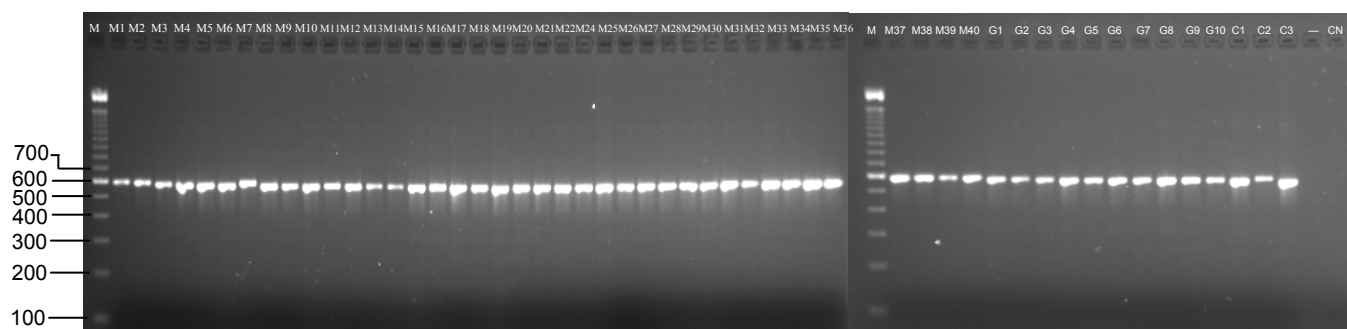


Figura 2. Produto do PCR resultante da utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4, em gel de agarose 2%, mostrando fragmentos (aproximadamente 600 pb) obtidos dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros (M – ladder 100 pb, CN – controle negativo, demais números se referem aos isolados).

TABELA 3. Fragmentos de restrição da região ITS do rDNA amplificado dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, gerados pelas enzimas de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Hha* I, *Eco* RI (NC – não clivou), em pares de base (pb).

	<i>Rsa</i> I		<i>Alu</i> I		<i>Hha</i> I			<i>Eco</i> RI	
	--- pb ---		--- pb ---		----- pb -----			--- pb ---	
M1	NC		NC		270	185	125	320	290
M2	NC		NC		270	185	125	320	290
M3	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M4	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M5	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M6	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M7	NC		385	200	270	185	155	320	300
M8	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M9	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M10	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M11	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M12	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M13	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M14	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M15	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M16	390	190	365	175	270	185	145	290	330

	<i>Rsa</i> I		<i>Alu</i> I		<i>Hha</i> I			<i>Eco</i> RI	
	--- pb ---		--- pb ---		----- pb -----			--- pb ---	
M17	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M18	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M19	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M20	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M21	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M22	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M24	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M25	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M26	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M27	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M28	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M29	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M30	390	190	365	175	270	185	145	290	330
M31	NC		NC		270	185	125	320	290
M32	NC		NC		270	185	125	320	290
M33	NC		NC		270	185	125	320	290
M34	NC		NC		270	185	125	320	290
M35	NC		NC		270	185	125	320	290
M36	NC		NC		270	185	125	320	290
M37	NC		NC		270	185	125	320	290
M38	NC		NC		270	185	145	320	290
M39	NC		NC		270	185	145	320	290
M40	NC		NC		270	185	145	320	290
G1	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G2	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G3	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G4	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G5	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G6	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G7	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G8	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G9	380	180	365	175	270	185	145	290	330
G10	380	180	365	175	270	185	145	290	330
C1	380	180	360	195	270	185	145	290	330
C2	500		NC		185	280	135	315	295

TABELA 4. Fragmentos de restrição da região ITS do rDNA amplificado dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, gerados pelas enzimas de restrição *Hinf* I, *Acc* I, *Taq* I, *Hpa* II (NC – não clivou), em pares de base (pb).

	<i>Hinf</i> I			<i>Acc</i> I		<i>Taq</i> I		<i>Hpa</i> II		
	----- pb -----			--- pb ---		--- pb ---		----- pb -----		
M1	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M2	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M3	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M4	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M5	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M6	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M7	90	315	190	400	160	255	135	120	290	130
M8	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M9	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M10	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M11	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M12	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M13	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M14	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M15	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M16	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M17	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M18	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M19	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M20	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M21	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M22	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M24	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M25	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M26	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M27	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M28	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M29	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M30	90	295	190	NC		250	240	125	280	120
M31	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M32	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M33	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M34	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M35	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M36	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M37	300	185	90	NC		250	250	280	145	125
M38	90	295	190	NC		240	245	120	290	130

	<i>Hinf I</i>			<i>Acc I</i>	<i>Taq I</i>		<i>Hpa II</i>		
	----- pb -----			--- pb ---	--- pb ---		----- pb -----		
M39	90	295	190	NC	240	245	120	290	130
M40	90	295	190	NC	240	245	120	290	130
G1	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G2	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G3	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G4	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G5	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G6	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G7	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G8	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G9	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
G10	90	295	190	NC	250	240	125	280	120
C1	300	90	190	NC	250	240	125	280	120
C2	90	295	190	NC	240	245	120	290	130

A digestão da região ITS do rDNA resultou de 1 a 3 fragmentos por enzima de restrição, sendo 2 perfis para a enzima *Acc I*, 3 para *Hpa II*, 4 para a *Eco RI*, *Hinf I*, *Rsa I*, *Alu I*, *Taq I* e *Hha I* (Tabelas 3 e 4).

A combinação dos padrões de restrição permitiu a diferenciação dos 51 isolados em 7 padrões de ARDRA (haplótipos) (Tabela 5). Estes resultados podem ser comparados, em nível de eficiência, com os dados de MARTINS (2005), que analisou isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium spp.*, obtendo a distinção de 83 isolados em 19 padrões de ARDRA (haplótipos).

A frequência dos 7 haplótipos observados pela análise de restrição do rDNA dos isolados de *Colletotrichum spp.* pode ser observada na Figura 4, sendo que em torno 25% dos isolados se mantiveram no haplótipo B, 9% no E, 8% no A, 3% no D e 1% no C, F e G.

Tabela 5. Distribuição dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros nos diferentes haplótipos obtidos.

ISOLADOS	HAPLÓTIPOS	ESPÉCIE
M1, M2, M31, M32, M33, M34, M35, M36 e M37	A	<i>C. acutatum</i>
M3, M4, M5, M6, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M24, M25, M26, M27, M28, M29 e M30	B	<i>C. gloeosporioides</i>
M7	C	<i>C. gloeosporioides</i>
M38, M39 e M40	D	<i>C. acutatum</i>
G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9 e G10	E	<i>Colletotrichum</i> sp.
C1	F	<i>C. gloeosporioides</i>
C2	G	<i>C. acutatum</i>

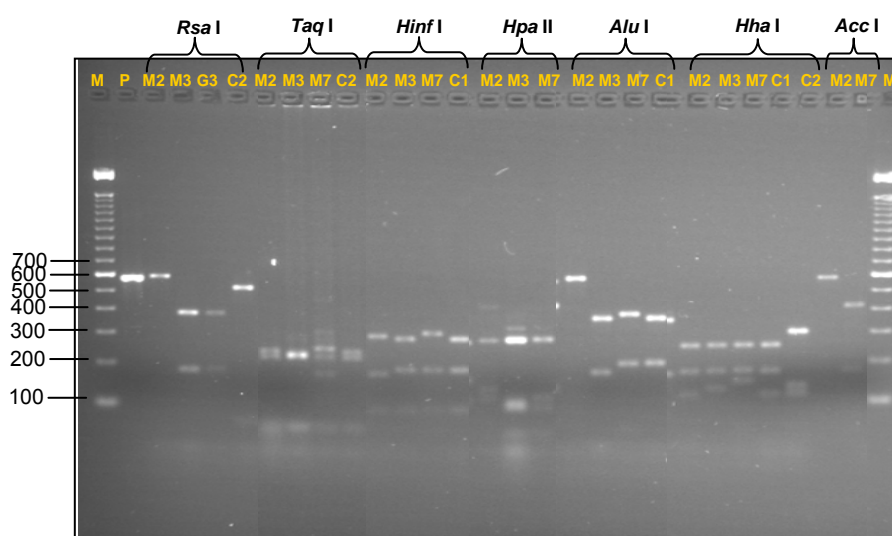


Figura 3. Perfis eletroforéticos obtidos com as enzimas de restrições da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, com endonucleases de restrição (M-Ladder 100 pb; P-fragmento padrão sem clivagem com enzima de restrição, os demais números se referem aos isolados).

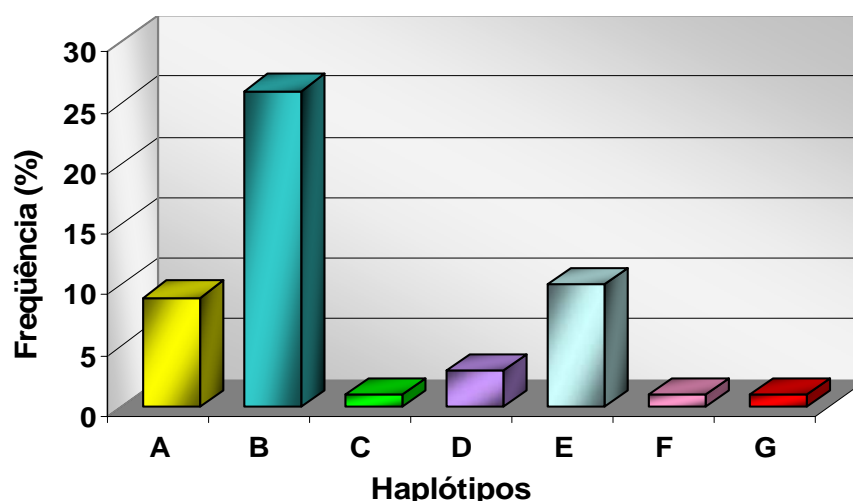


Figura 4. Frequência dos sete padrões de ARDRA obtidos pela análise de restrição do fragmento amplificado da região ITS do rDNA dos isolados de *Colletotrichum* de maçã, goiaba serrana e citros, com as endonucleases de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Acc* I, *Eco* RI e *Taq* I.

Na análise dos haplótipos, observou-se diversidade entre eles, entretanto, não foi possível relacionar geneticamente os isolados aos diferentes hospedeiros analisados, pois em cada haplótipo os isolados agrupados são do mesmo hospedeiro.

Foi possível observar que, dentro de cada haplótipo, foram agrupados isolados de *Colletotrichum* do mesmo gênero, espécie e hospedeiro, ao contrário do encontrado por MAKI (2006), em um estudo de diversidade genética entre fungos endofíticos de cacau. Ele observou que, dentro de cada haplótipo havia agrupado isolados de diferentes gêneros. GOMES et al. (2002), utilizaram as endonucleases de restrição *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Hpa* II, separando isolados de fungos ectomicorrizicos por gênero e por espécie.

As 51 seqüências obtidas dos isolados de *Colletotrichum* spp. de maçã, goiaba serrana e citros, foram confrontadas com o banco de dados do *GenBank*, por meio do *Blast_n* (Tabela 6; Anexo 5), possibilitando estabelecer relações filogenéticas entre os isolados obtidos com os do banco de dados através da análise da seqüência da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal. Através da pesquisa no *Blast_n* encontrou-se organismos cujas seqüências se assemelham com as seqüências confrontadas. A porcentagem de bases semelhantes entre as seqüências obtidas neste estudo com as do *GenBank* foram superiores a 93%, o que segundo

ALTSCHUL et al. (1997) indica confiabilidade de correlação entre o isolado confrontado com aquele semelhante depositado no banco de dados.

A árvore filogenética (Figura 5) foi construída no software Mega 3.1 (Anexo 6) a partir das seqüências obtidas e alinhadas no ClustalW (Anexo 4). Os resultados variaram de 93 a 100% de similaridade de bases entre as seqüências pesquisadas, inferindo boa confiabilidade (Anexo 5). Esta alta porcentagem de similaridade nos permite, com precisão, identificar a identidade dos isolados utilizados neste trabalho, permitindo relacionar as seqüências dos isolados utilizados neste estudo com as do *GenBank*, através de relações filogenéticas. Esta variação de 93 a 100% pode ser comparada com os dados de KUMAR e SHUKLA (2005), que sequenciaram a região ITS do rRNA de isolados de diferentes fungos e compararam estas seqüências com as armazenadas do *GenBank*, onde a variação obtida foi entre 90-100% de similaridade de bases das seqüências analisadas.

As seqüências de DNA obtidas para os isolados foram comparadas com seqüências correspondentes à região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal de isolados de *Colleotrichum* depositadas na base de dados do *GenBank*. As seqüências do banco de dados utilizadas para a construção da árvore filogenética foram de *Colleotrichum gloeosporioides* (AJ536229/Citros), *Colleotrichum* sp. (AJ300559/Citros e AJ313178/Citros), *Glomerella cingulata* (AF272779/Macieira, AY188926/Citros, AY188927/Citros, AY188928/Citros, AY188929/Citros, AY188930/Citros, AY188931/Citros e DQ868499/Citros), *Glomerella acutata* (AF272787/Macieira, AY770557/Citros e DQ286123/Macieira). A seqüência do isolado Pestalotia (DQ812938) foram utilizadas como *outgroup*.

Tabela 6. Análise de confrontação das seqüências obtidas com as do banco de dados do *GenBank*, por meio do *Blast_n* com a espécie de maior score.

ACESSO	BLAST	ESPÉCIE	SCORE	E-VALUE	INDICE SIMIL.
M1	AM404289.1	<i>Glomerella acutata</i>	922	0.0	100%
M2	AB219041.1	<i>G. acutata</i> (*)	1007	0.0	100%
M3	AB219012.1	<i>G. cingulata</i> (**)	1082	0.0	100%
M4	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1084	0.0	100%
M5	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1112	0.0	100%
M6	AB255249.1	<i>Colleotrichum</i> sp.	1106	0.0	99%
M7	DQ780420.1	<i>Colleotrichum</i> sp.	833	0.0	100%
M8	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1007	0.0	100%
M9	DQ780452.1	<i>Colleotrichum</i> sp.	1021	0.0	99%
M10	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1124	0.0	100%
M11	AB255249.1	<i>Colleotrichum</i> sp.	1106	0.0	99%

ACESSO	BLAST	ESPECIE	SCORE	E-VALUE	INDICE SIMIL.
M12	DQ780452.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	942	0.0	100%
M13	AB255249.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	1008	0.0	99%
M14	DQ780452.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	942	0.0	100%
M15	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1090	0.0	100%
M16	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	993	0.0	100%
M17	AJ301986.1	<i>C. gloeosporioides</i>	1088	0.0	99%
M18	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1088	0.0	100%
M19	AB255249.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	1098	0.0	99%
M20	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1088	0.0	100%
M21	AB255249.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	1106	0.0	99%
M22	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1090	0.0	100%
M24	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1088	0.0	100%
M25	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1088	0.0	100%
M26	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1090	0.0	100%
M27	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1092	0.0	100%
M28	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1092	0.0	100%
M29	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1092	0.0	100%
M30	AB219012.1	<i>G. cingulata</i>	1088	0.0	100%
M31	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1120	0.0	99%
M32	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1108	0.0	100%
M33	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1112	0.0	99%
M34	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1057	0.0	99%
M35	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1108	0.0	100%
M36	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1108	0.0	100%
M37	AM404289.1	<i>G. acutata</i>	1098	0.0	100%
M38	DQ286119.1	<i>C. acutatum</i>	1088	0.0	99%
M39	DQ286119.1	<i>C. acutatum</i>	1090	0.0	99%
M40	AB219041.1	<i>G. acutata</i>	1106	0.0	99%
G1	AJ301912.1	<i>C. fragariae</i>	1047	0.0	99%
G2	DQ003092.1	<i>C. fragariae</i>	1053	0.0	100%
G3	DQ003092.1	<i>C. fragariae</i>	1055	0.0	100%
G4	DQ780417.1	<i>Colletotrichum</i> sp.	878	0.0	99%
G5	AJ301912.1	<i>C. fragariae</i>	981	0.0	99%
G6	AJ301912.1	<i>C. fragariae</i>	1057	0.0	99%
G7	DQ003092.1	<i>C. fragariae</i>	942	0.0	100%
G8	DQ003092.1	<i>C. fragariae</i>	1049	0.0	100%
G9	AJ301912.1	<i>C. fragariae</i>	1063	0.0	99%
G10	DQ003092.1	<i>C. fragariae</i>	1015	0.0	100%
C1	AJ301988.1	<i>C. gloeosporioides</i>	1086	0.0	100%
C2	DQ286119.1	<i>C. acutatum</i>	1080	0.0	99%

(*) Forma anamórfica – *Colletotrichum acutatum*

(**) Forma anamórfica – *Colletotrichum gloeosporioides*

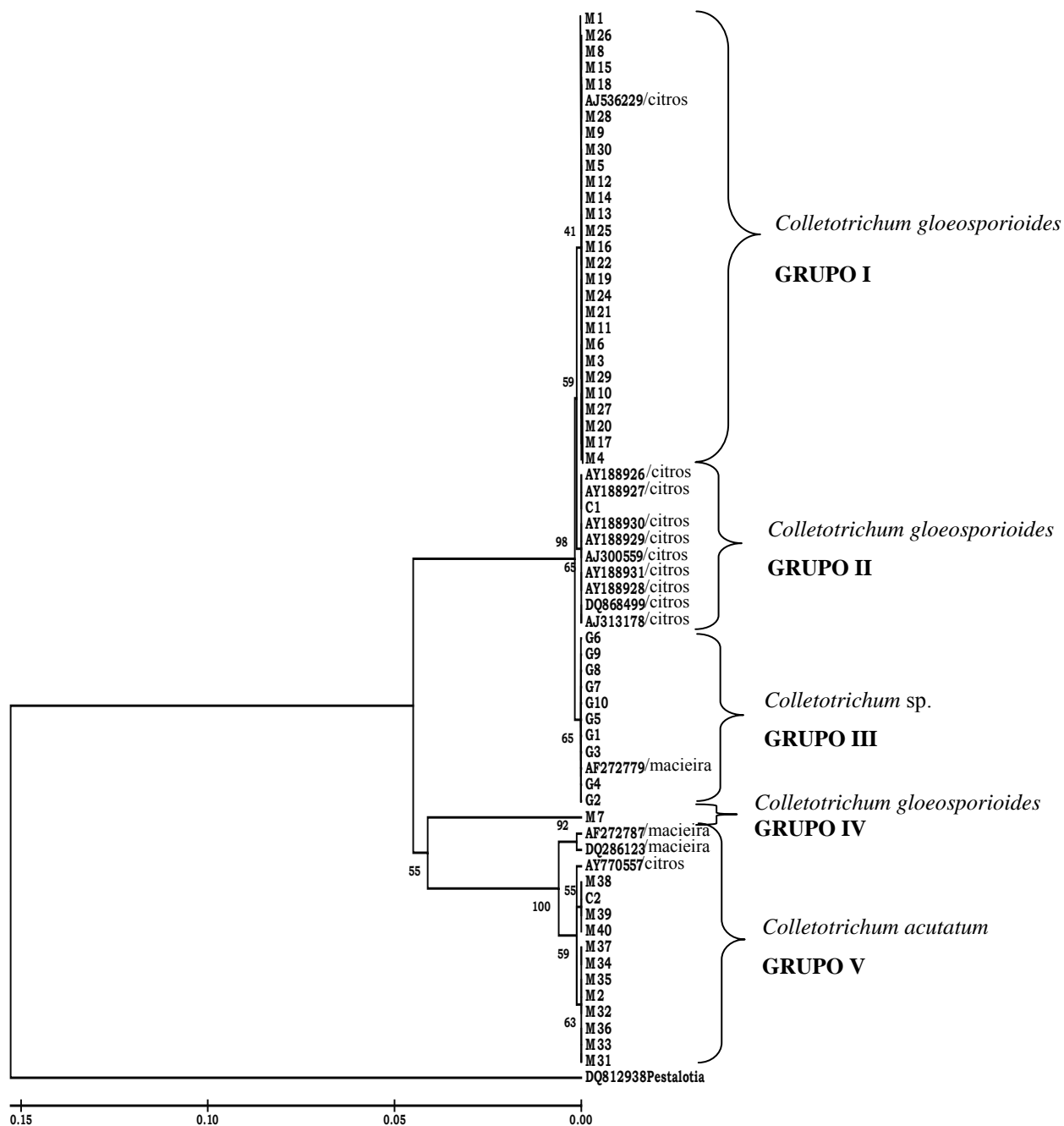


Figura 5. Árvore filogenética construída pelo software Mega 3.1 a partir de seqüências da região ITS do rDNA de 39 isolados de *Colletotrichum* spp. de maçã, 2 isolados de citros, 10 isolados de goiaba serrana e seqüências de isolados de *Colletotrichum* spp. de citros e macieira do *GenBank*, utilizando o método *Neighbor-Joining*. A seqüência do isolado *Pestalotia* obtidas no *GenBank* foram utilizadas como *outgroup*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 10.000 repetições.

As seqüências de DNA obtidas da região ITS dos isolados de *Colletotrichum* mostraram que todos os isolados foram agrupados de acordo com a sua espécie, independente do seu hospedeiro (Figura 5). FUNGARO (2000), verificou que, através do rDNA, é possível a separação dos isolados em espécies distintas e conseqüentemente a diferenciação dos isolados dentro de cada espécie.

O isolado M7 não agrupou com os demais isolados da mesma espécie. Isto pode ser explicado pelo fato de que o teste de patogenicidade, para este isolado, não ocasionou nenhum tipo de sintoma nas folhas e nem nos frutos de macieira quando inoculado em frutos com ferimentos, apenas produziu micélio sob os tecidos inoculados, não ocasionando quaisquer tipos de lesões nestes frutos, sendo esse um saprófito (HAMADA, 2005). A seqüência da região ITS do isolado M7, quando confrontado com as demais seqüências do *GenBank* apresentou valores menores de similaridade entre as seqüências, variando de 93 a 100%, enquanto para os outros isolados, os valores ficaram entre 97 a 100%. O “bootstrap” realizado apresentou valores médios de 70%, indicando confiabilidade nos resultados obtidos.

Os isolados *C. gloeosporioides* de macieira do Grupo I, aparecem na mesma ramificação do isolado de citros do Grupo II, o qual se encontra também no ramo do grupo dos isolados de goiaba serrana do Grupo III, sugerindo que estes isolados de macieira possuem características de ancestralidade com *Colletotrichum* spp. causador de doenças em citros e em goiaba serrana. Estes dados corroboram os de KATSURAYAMA (2001) e FREEMAN et al. (1999), os quais sugerem que esta doença chegou às macieiras cultivadas nos Estados de São Paulo e Paraná, a partir das culturas tropicais ou subtropicais, como o citros.

Estas informações salientam a importância de um adequado manejo da cultura no que se refere à utilização de produtos químicos, pois o excesso de uso de fungicidas para o controle da MFG, como de outras doenças, bem como o cultivo sobre restos culturais, pode atuar no processo de pressão de seleção deste fungo, ocasionando o surgimento de novas raças de *Colletotrichum* spp. De acordo com HAUAGGE e BRUCKNER (2002) houve uma mudança radical no tipo de defensivos utilizados na cultura da macieira no Brasil, reduzindo-se os fungicidas protetores, que têm ação sobre a Mancha Foliar da Gala e uma aumento significativo de fungicidas específicos para o controle da Sarna da Macieira (*Venturia inaequalis* (Cooke)Wint), doença que é difícil de ser controlada com fungicidas protetores. Assim o controle químico utilizado em pomares de macieira para o combate de outras doenças tem interferido na sintomatologia, dificultando o isolamento e o controle do

Colletotrichum spp., possibilitando que este fungo se torne resistente aos defensivos utilizados (SUTTON e SANHUEZA, 1998).

Para aumentar as evidências de que o *Colletotrichum* spp., causador da MFG, possui relações de parentesco com o *Colletotrichum* spp. de citros ou da goiaba serrana, foi realizada uma comparação *in silico*, ou seja, de seqüências de *Colletotrichum* spp. disponíveis no *GenBank* em conjunto com as seqüências dos isolados em questão. A partir dessa comparação verificou-se que a semelhança variou de 93 a 100% de similaridade entre as seqüências estudadas com as do *Genbank*, comprovando estar correto o gênero e a espécie dos isolados de fungos em estudo e também comprovando que o agente causal da Mancha Foliar da Gala está relacionado filogeneticamente com o fungo causador de fitomoléstias em culturas tropicais ou subtropicais, como o citros, e até mesmo em a goiaba serrana, pois algumas espécies deste fungo, como o *C. gloeosporioides* e o *C. acutatum*, podem estabelecer relações parasíticas com vários hospedeiros (FREEMAN et al., 1999).

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- a) A técnica ARDRA foi eficiente na distinção dos haplótipos e para a correlação entre haplótipo e hospedeiro;
- b) A seqüência de bases da região ITS1-5,8S-ITS2 permite inferir sobre a possível espécie de fungo que pertence o segmento de DNA analisado, constituindo uma ferramenta útil em estudos de diversidade genética;
- c) A região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal é eficiente para estudos de filogenia;
- d) A região ITS do rDNA do *Colletotrichum* spp. agente causal da MFG está relacionado filogeneticamente com a região ITS do rDNA de *Colletotrichum* spp. obtidos de citros e goiaba serrana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPM - Associação Brasileira dos Produtores Maçã. Disponível em:
<<http://www.macabrasileira.br>> - Acesso em: 22/03/2005.
- ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. Disponível em:
<<http://www.abpm.org.br>> - Acesso em: 28/10/2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.25. p.3389-3402, 1997.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi** St. Paul, Minnessota: APS Press, 1998.
- BERGAMIN, F. A.; AMORIN, L. Sistemas de previsão e avisos. p. 627–646. In.
- BERGAMIN, F. A.; KIMATI, H; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 920p., 1995.
- BLEICHER, J. Doenças da Macieira e outras Pomáceas. p.472-485. In. KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. v.2. 3. ed. Editora Agronômica Ceres – São Paulo-SP, 774p., 1997.
- BLEICHER, J. História da Macieira. p.29-36. In. EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC, 743p., 2006.
- BONETI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira** São Paulo: BASF, 1998.
- BONETTI, J. I. S.; OZAWA, T. Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar na severidade da mancha foliar de *Glomerella* nas macieiras da cv. Gala, em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. suplemento, p. 295–296, 1999.
- BROOKER, N. L., LESLIE, J. F., DICKMAN, M. B. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, v.81; p. 672–677, 1991.
- BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86; p. 523-527, 1996.
- BUDDIE, A. G. et al. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. **Mycology Research**. v.103, n.4, p. 385-394, 1999.
- CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: **A cultura da cacieira**. Florianópolis, 743p., 2002.

- CADEIAS, J. A. N. A engenharia genética. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.25; p. 3-10, 1991.
- CEREZINE, P. C.; LEITE, R. P.; TSUNETTA, M. Efeito do tratamento químico no controle da mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** v.17; n.3; p.258-267, 1992.
- COOKE, D. E. L. et al. A Molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetic Biology**, San Diego, v. 30, n. 1, p. 17-32, 2000.
- CORREL, J. C.; RHOADS, D. D.; GUERBER, J. C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprint, and randomly amplified polymorphism DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, v.83; p.1199-1204., 1993.
- CULEBRAS, P. V. M. et al. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and desing of PCR primers for their identification. **Journal Phytopathology**. v.151, p. 135-143, 2003.
- DESTÉFANO, R. H. R. **Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliai* em larvas de *Diatraea saccharales* por primer específicos**. 2003. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- FREEMAN, S.; PHAM, M.; RODRIGUEZ, R. J. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T rich DNA, and nuclear DNA analyses. **Experimental Mycology**, v.17; p.309-322, 1993.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterizathion of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant disease**; 82: 596-604, 1999.
- FREEMAN, S. et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**. v.91, n.6, p. 586-592, 2001.
- FUNGARO, M.H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun., 2000.
- GOMES, E. A., et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**; v.25, n.4, p.477-483, 2002.
- HAMADA, N. A. **Caracterização Morfológica, Patogênica e Molecular de Isolados de *Colletotrichum spp.* em Macieira**. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2005.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. Macieira. cap. 2, p.28-88. In. BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. Editora UFV, Viçosa, 2002.

HSIANG, T.; WU, C. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. **Mycology**. Res.104. p. 16-22, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br>> . Acesso em: 16/12/2006.

JUNGHANS, D. T. et al. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, 7:243–248, 1998.

JUNIOR, F. B. R. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microorganismos do solo**. Documentos/Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2002. 33p.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da S. Epidemiologia da Mancha Foliar da Gala in **IV Reunião Anual de Fitossanidade na Cultura da Macieira**. São Joaquim: Epagri. 1999.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da S.; OZAWA, T. Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala. **Fitopatologia brasileira**, 25 (suplemento):383 (Resumos), 2000.

KATSURAYAMA, Y. et al. Epidemiologia das doenças da macieira no subtropico e perspectivas de manejo integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.). In: **SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental**, 1., 2001.

Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001. 161p.

KUMAR, M.; SHUKLA, P. K.; Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.2, p. 662-668, 2005.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 9:291-339, 2001.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 127 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MELLO, L. M. R. Produção e Mercado Brasileiro de Maçã. **Comunicado Técnico Nº 50**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 4.p, 2004.
- MENEZES, M.; HANLIN, M. W. D. S. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 39p.. 1997.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia brasileira**, 27 (suplemento): S23, 2002.
- NAHUM, L. A. Evolução dos Genomas. P.82-96. In. MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. Holos, Ribeirão Preto, 2001.
- NAVAJAS, M. et al. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important *Phytoseiidae* mites. **Experimental and Applied Acarology**. v.23; p.851-859, 1999.
- PAUL, B. ITS1 region of the rDNA of *Pythium proliferatum*, a new species its taxonomy and its comparison with related secies. **FEMS Mycrobios. Lett.**, Cambridge, v. 206, n. 1, p. 191-196, 2001.
- PERES, A. P. et al. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciências agrotécnicas.**, Lavras. v.27, n.5, p.1053-1062, set./out., 2003.
- PETRI, J. L. Desafios da pesquisa na produção integrada de maçã.. In. SANHUEZA, R. M. V. et al. **Reunião sobre o sistema de produção integrada de macieira no Brasil, 1**. Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. p.1-2, 1998. 48p.
- RIBEIRO, I. J. A. Doenças da Mangueira. p.512-524. cap. 49. In. KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas**. v.2, 3. ed. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1997, 774p.
- SAITON, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p.406-425, 1987.
- SCHÄFER, C., WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal Phytopathology**. v.136, p.124-136, 1992.

- SANHUEZA, R. M. V. et al. Normas para a produção integrada de maçãs no Brasil – primeira versão. **Reunião sobre o sistema de produção integrada de macieira no Brasil, 1.** Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. p. 30-40, 1998. 48p.
- SANHUEZA, R. M. V. et al. **Manejo das Doenças de Verão na Produção Integrada de Maçã.** Circular técnica EMBRAPA n° 36. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2002.
- SHERRIFF, C. et al. Ribosomal DNA analysis reveals new species grouping in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology.** v.18; p.121-138, 1994.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 58p., 1999.
- SUTTON, T. B.; SANHUEZA, R. M. Necrotic leaf blotch of Golden Delicious-Glomerella leaf spot: A resolution of common names. **Plant Disease.** v.82, n.3, p.267-268, 1998.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution.** v.10, p. 512-526, 1993.
- TORRES, R. A.; GANAL, M. ; HEMLEBEN, V. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. **Journal Molecular Evolution.** v.30; p.170-181, 1990.
- VIEIRA, L. M. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2004 – 2005.** Publicações anuais da Epagri. 8 p., 2005.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In. INNIS, M. A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications.** Academic Press, San Diego, 1990.

ANEXO 1

1 MEIOS DE CULTURA

1.1 MEIO BATATA DEXTROSE AGAR (BDA)

BDA (<i>Himedia</i>)	40 g
Sulfato de Estreptomicida	0,05 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Foi misturado BDA com a água destilada e autoclavado, após foi adicionado o Sulfato de Estreptomicida.

1.2 MEIO BATATA SACAROSE (BS)

Batata	200 g
Sacarose	17 g
H ₂ O destilada	1000 mL
Sulfato de Estreptomicida	0,05 g

A batata foi cozida por 30 minutos no microondas em 200 mL de água destilada e filtrada em gaze. Foi adicionado o restante da água e o Sulfato de Estreptomicida e autoclavado por 20 minutos a 120°C.

ANEXO 2

2 SOLUÇÕES

2.1 TAMPÃO TBE 10X

Tris – HCl 0,89M	107,8 g
Ácido Bórico 0,89M	55 g
EDTA 0,02M	40 mL de 0,5M pH 8,0
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 1000 mL

A solução foi preparada e mantida à temperatura ambiente. No momento do uso procederam-se as diluições necessárias.

2.2 SOLUÇÃO ESTOQUE DE TRIS-HCl 1M pH 7,2

Trisma-base	12,11 g
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 100 mL

O pH foi ajustado para 7,2 com HCl. A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

2.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	18,61 g
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 100 mL

O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.4 SOLUÇÃO ESTOQUE DE NaCl 5M

NaCl	29,16 g
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 100 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

2.5 SOLUÇÃO ESTOQUE DE SDS 10%

Dodecil Sulfato de Sódio	10 g
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 100 mL

A solução foi mantida em temperatura ambiente.

2.6 TAMPÃO DE LISE PARA EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS

Tris-HCl 50mM pH 7,2	2,5 mL da solução estoque
EDTA 50mM pH 8,0	5 mL da solução estoque
SDS 3%	15 mL da solução estoque
β-Mercaptoetanol 1%	500 μ L
H ₂ O ultra-pura	completar volume para 50 mL

O tampão de lise foi preparado somente no momento do uso.

ANEXO 3

3 GÉIS

3.1 GEL DE AGAROSE 0,8% E 2%

	0,8%	2%
TBE 1X	350 mL	350 mL
Agarose	2,8 g	7 g
Brometo de Etídio (10 mg.mL ⁻¹)	6,5 μ L	6,5 μ L

Foi pesado a agarose e adicionado o TBE 1X, aquecidos no microondas por 2-3 minutos na potência máxima para que toda a agarose fosse dissolvida. Após esperar esfriar um pouco foi adicionado o Brometo de Etídio e vertido o gel na cuba de eletroforese (Gator™ Large Format Horizontal Systems – OWL model A2).

3.2 GEL DE POLIACRILAMIDA 6%

GEL DE POLIACRILAMIDA (100 mL)

- ✗ 20 mL TBE 5X
- ✗ 20 mL A:BIS (29:1)

Misturar o TBE 5X e a A:BIS. Depois completar para 100 mL.

A:BIS (29:1): 29 g acrilamida

1 g de bis-acrilamida

Completar para 100 mL com H₂O Ultra Pura e deixar agitando durante a noite.

Obs: O gel de poliacrilamida pode ficar armazenado na geladeira, no máximo por 1 mês.

PREPARO DO GEL NO DIA ANTERIOR

- ✗ Misture (na capela), minutos antes de aplicar o gel na placa:

80 mL do gel – filtrado com papel filtro

50 μ L TEMED

500 μ L Persulfato de Amônia (APS)

APS: 50 mg de persulfato de amônia

500 μ L de H₂O Ultra Pura

LIMPEZA DAS PLACAS

Placa Aderente (inteira):

Lavar a placa com detergente e secar;

Aplicar álcool 70% algumas vezes no sentido longitudinal e transversal.

Placa Repelente (dentada):

Lavar a placa com detergente e secar;

Aplicar água Ultra Pura algumas vezes e secá-la novamente.

TRATAMENTO DA PLACA ADERENTE (INTEIRA):

- ✗ 995 μ L de álcool 95%

- ✗ 5 μ L de ácido acético glacial

- ✗ 3 μ L de "binding silane"

Misturar os reagentes em um tubo e aplicar na placa no sentido longitudinal e transversal por 3 vezes. Trocar as luvas.

TRATAMENTO DA PLACA REPELENTE (DENTADA) (NA CAPELA):

- ✗ 500 μ L de "repel silane"

Aplicar na placa e espalhar no sentido longitudinal e transversal por 3 vezes.

Obs: Após o preparo das placas deixá-las por 15 minutos secando;

A seguir, limpar novamente as placas:

- ✖ Placa inteira: Utilizar solução etanol a 95% e espalhar no sentido longitudinal e transversal por 3 vezes.

- ✖ Placa dentada: Secar com papel toalha nos dois sentidos por 3 vezes.

Importante: Não esquecer de trocar as luvas ao manusear as placas.

MONTAGEM DA PLACA:

- 1- Preparar todos os aparatos do gel (grampos, espaçadores, pente, nível, injetor do gel, isopor, cuba);
- 2- Cobrir o balcão com parafilme;
- 3- Colocar o isopor sobre o parafilme;
- 4- Colocar a placa aderente (inteira) sobre o isopor;
- 5- Colocar os espaçadores sobre a placa aderente;
- 6- Colocar a placa repelente (dentada) em cima da aderente;
- 7- Colocar os grampos nas laterais da placa;
- 8- Nivelar a placa.

APLICAÇÃO DO GEL:

- ✖ Completar o volume do gel para 80 mL e colocar no injetor de gel;
- ✖ Acrescentar 50 μ L de TEMED e 500 μ L de APS (na capela) agitando;
- ✖ Verter continuamente o gel na placa;
- ✖ Colocar o pente invertido na placa e fixá-lo com grampos;
- ✖ Deixar em repouso até polimerizar bem.

Passos para correr o gel

- 1- Antes de colocar o gel para aquecer, limpar os resíduos de gel nas placas e no local onde fica o pente;
- 2- Tirar os grampos da placa;
- 3- Encaixar o gel no suporte (cuba de eletroforese);

4- Limpar o espaço onde ficará o pente tirando o excesso de acrilamida. Cuidar para não tocar na linha do pente;

1- Colocar o tampão em cima das placas e embaixo;

2- Encaixar os suportes das correntes;

3- Conectar os plugs na fonte;

4- Colocar o medidor de temperatura;

6- Colocar o gel para aquecer por 30 a 45 minutos ou até a temperatura chegar a 45°C com tampão TBE 1X, a qual pode ser utilizada por 3 vezes;

7- Limpar as canaletas com borrifador;

8- Após aquecer o gel, colocar o pente e aplicar as amostras, procure aplicar rápido e limpar a canaleta do lado com a micropipeta na diagonal, deixar correr por 15 minutos, desligar e tirar o pente;

9- Deixar as amostras correndo no gel por um período de $\approx 1 \frac{1}{2}$ horas, em uma voltagem de 1300 V.

Aquecimento: 1300V 46mA 60W

Após aplicar as amostras: 900V 75mA 75W

REAGENTES NECESSÁRIOS PARA REVELAR O GEL

1- Solução de Fixação: Ácido Acético (1 L)

✖ 10 mL de ácido acético glacial 1%

✖ 100 mL etanol 10%

✖ 890 mL de água Ultra Pura

2- Pré-tratamento: Ácido Nítrico (1 L)

✖ 15 mL ácido nítrico 1,5%

✖ 985 mL água Ultra Pura

3- Solução de coloração: Nitrato de Prata (1 L)

✖ 2 g de nitrato de prata

✖ 1L de água Ultra Pura

OBS: Guardar em vidro âmbar ou um vidro forrado com papel alumínio.

4- Solução de Revelação – Impregnação: Carbonato de sódio (1 L)

- × 30 g de carbonato de sódio anidro – Na_2CO_3
- × 540 μL de formaldeído (37%)
- × 1L de água Ultra Pura

Modo de Preparo

Em um Becker acrescentar 500 mL de água Ultra Pura e adicionar o carbonato aos poucos no agitador, até diluir completamente. Completar o conteúdo para 1L e armazenar na geladeira (deve estar bem gelado na hora de ser utilizado). Acrescentar o formaldeído na hora que for utilizar o carbonato.

REVELAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DO GEL

Separar as duas placas com o auxílio de uma espátula

- 1- FIXAÇÃO: em uma bacia mergulhar a placa com o gel (inteira) em uma solução de fixação composta de: etanol 10%, ácido acético 1% (100 mL etanol.L⁻¹ + 10 mL ácido acético.L⁻¹) mantendo sob agitação por 10 minutos.
- 2- LAVAGEM: em uma bacia fazer a lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.
- 3- PRÉ-TRATAMENTO: transferir a placa para outra bacia contendo ácido nítrico 1,5% (15 mL.L⁻¹) e manter sob agitação por 3 minutos.
- 4- LAVAGEM: em uma bacia fazer a lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.
- 5- IMPREGNAÇÃO: transferir a placa para outra bacia contendo nitrato de prata 0,2% (2 g.L⁻¹) e manter sob agitação por 30 minutos.
- 6- LAVAGEM: em uma bacia fazer outra lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.
- 7- REVELAÇÃO: transferir a placa para outra bacia contendo uns 300 mL do carbonato de sódio (30 g.L⁻¹ Na_2CO_3 + 540 μL .L⁻¹ de formaldeído 37%) bem gelado sob leve agitação (manual) até a solução ficar escura e, então, adicionar em uma outra bacia limpa o restante da solução (700 mL) até que apareçam todas as bandas ou até que o gel comece a escurecer bastante.

8- BLOQUEIO: transferir a placa para outra bacia contendo o ácido acético 5% (50 mL.L^{-1}) mantendo sob agitação por 5 minutos para que seja bloqueada a reação.

9- LAVAGEM: em uma bacia fazer outra lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.

REUTILIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Fixação → 3 vezes

Pré-tratamento → 5 vezes

Impregnação → 3 vezes (deve ser armazenada no escuro em T°C ambiente)

Bloqueio → 5 vezes

ANEXO 4

4 CLUSTAW

O site utilizado para acessar o programa de alinhamento de seqüências o ClustalW foi o <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Todas as seqüências foram colocadas juntas no local indicado pela fecha. Após é só clicar no “Run”. Depois escolhe a opção “Alignment file”.

The screenshot displays the ClustalW web interface. On the left is a navigation menu with items like 'General Help', 'Formats', 'Gaps', 'Matrix', 'Preferences', 'ClustalW Help', 'ClustalW FAQ', 'Jalview Help', 'Scores Table', 'Alignment', 'Guide Tree', 'Colours', and 'Similar Applications'. The main content area is titled 'ClustalW' and contains a description of the program. Below the description is a 'Download Software' link with icons for Windows, Mac, and Linux. The configuration section includes several groups of dropdown menus: 'YOUR EMAIL', 'ALIGNMENT TITLE' (set to 'Sequence'), 'RESULTS' (set to 'interactive'), 'ALIGNMENT' (set to 'full'), 'CPU MODE' (set to 'single'), 'KTUP (WORD SIZE)' (set to 'def'), 'WINDOW LENGTH' (set to 'def'), 'SCORE TYPE' (set to 'percent'), 'TOPDIAG' (set to 'def'), 'PAIRGAP' (set to 'def'), 'MATRIX' (set to 'def'), 'GAP OPEN' (set to 'def'), 'END GAPS' (set to 'def'), 'GAP EXTENSION' (set to 'def'), and 'GAP DISTANCES' (set to 'def'). There are also sections for 'OUTPUT' (with 'OUTPUT FORMAT' set to 'aln w/numbers' and 'OUTPUT ORDER' set to 'aligned') and 'PHYLOGENETIC TREE' (with 'TREE TYPE' set to 'none', 'CORRECT DIST.' set to 'off', and 'IGNORE GAPS' set to 'off'). At the bottom, there is a large text area for entering or pasting sequences, with a black arrow pointing to it. Below the text area are buttons for 'Upload a file:', 'Procurar...', 'Run', and 'Reset'. A 'Help' button is also present in the top right of the text area.

Resultado do Alinhamento através do ClustaW

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

M1 -----
M37 -----CTCGGAGGGATCATTACTGA 20
M35 -----ACTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M32 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
M36 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
M33 -----TCTGTAGGTGGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 34
M31 -----TTCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 36
M2 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
M34 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
AY770557 -----CTGA 4
AF272787 -----TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGA 34
DQ286123 GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGA 60
M40 -----CCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 33
M38 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
C2 -----ATCATTACTGA 11
M39 -----AGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 30
M13 -----TCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 35
M16 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M21 -----TCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 35
M11 -----TTCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 36
M5 -----CCGTAGGTGAA--CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 33
M6 -----TTCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 36
M19 -----TTCCGTATGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 36
M22 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M26 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M18 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
M4 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M10 -----TTCCGTAGGTGAA--CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 35
M27 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M28 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M29 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
M15 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
M30 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M25 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M24 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M20 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
M3 -----CGGAGGGATCATTACTGA 18
M9 -----
M17 -----GGGATCATTACTGA 14
M8 -----ATCATTACTGA 11
M12 -----
M14 -----
G4 -----
G5 -----
G7 -----
AJ300559 -----CTGA 4
G3 -----CGGAGGGATCATTACTGA 18
G6 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
G2 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
G1 -----CCTGCGGAGGGATCATTACTGA 22
G10 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
G8 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
G9 -----TTCCGTAGGTGAAACCTGCGGAGGGATCATTACTGA 36
AF272779 -----TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGA 34
AJ536229 -----CTGA 4
AY188931 -----CATTACTGA 9
DQ868499 -----CTGA 4
AY188930 -----CATTACTGA 9
AY188928 -----CATTACTGA 9
AY188926 -----CATTACTGA 9
C1 -----CTGCGGAGGGATCATTACTGA 21
AJ313178 -----CTGA 4
AY188929 -----CATTACTGA 9
AY188927 -----CATTACTGA 9
M7 -----TGCGGAGGGATCATTACTGA 20
DQ812938Pestalotia -----

```

M1 -----
M37 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 78
M35 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 80
M32 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 79
M36 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 79
M33 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 92
M31 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 94
M2 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 79
M34 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 79
AY770557 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 62
AF272787 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACGTACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 92
DQ286123 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACGTACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 118
M40 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 91
M38 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 80
C2 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACGTACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 69
M39 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTA--ACCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGA 88
M13 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 95
M16 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M21 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 95
M11 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 96
M5 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 93
M6 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 96
M19 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 96
M22 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
M26 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
M18 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 81
M4 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M10 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 95
M27 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
M28 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
M29 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
M15 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 81
M30 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M25 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M24 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M20 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
M3 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 78
M9 -TTTACGCTCTATA-CCCTTTGTGATCATACTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 58
M17 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 74
M8 GTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 71
M12 -----TC 2
M14 -----TC 2
G4 -----
G5 -----AACATACCTACAGCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 36
G7 -----CTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 23
AJ300559 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 64
G3 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 78
G6 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
G2 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
G1 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 82
G10 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
G8 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
G9 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 96
AF272779 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 94
AJ536229 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 64
AY188931 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
DQ868499 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 64
AY188930 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
AY188928 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
AY188926 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
C1 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 81
AJ313178 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 64
AY188929 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
AY188927 GTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 69
M7 GTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTACAACCTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 80
DQ812938Pestalotia -----TCGGTGACCC 11
M1 -----CCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 42
M37 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 133
M35 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 135
M32 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 134
M36 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 134
M33 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 147
M31 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 149

M2 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 134
M34 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 134
AY770557 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 116
AF272787 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 147
DQ286123 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 173
M40 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 146
M38 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 135
C2 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 124
M39 AGCCTCTC---GCGGGCTCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACG--GGGACGGGGCGC 143
M13 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 137
M16 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M21 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 137
M11 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 138
M5 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 135
M6 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 138
M19 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 138
M22 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 124
M26 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 124
M18 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 123
M4 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M10 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 137
M27 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 124
M28 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 124
M29 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 124
M15 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 123
M30 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M25 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M24 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M20 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 122
M3 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 120
M9 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 100
M17 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 116
M8 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 113
M12 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 44
M14 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 44
G4 -----TCCCGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 34
G5 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 80
G7 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 67
AJ300559 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 106
G3 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 122
G6 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 126
G2 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 126
G1 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 126
G10 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 124
G8 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 124
G9 CCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCCCGGG--CGGGTC--GGCG 140
AF272779 TCC-----GTGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCCC--CGGG--CGGGTC--GGCG 136
AJ536229 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 106
AY188931 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
DQ868499 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 106
AY188930 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
AY188928 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
AY188926 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
C1 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 123
AJ313178 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CC-G--CCTC--CGG---CGGGTC--GGCG 104
AY188929 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
AY188927 TCC-----GCGACCTCCCGGCCT--CCCG--CCTC--CGGG--CGGGTC--GGCG 111
M7 TCCCTGAAAAGGACGCTCCCGGCCGGACCGGACCCCGCGGGACCGGACCCGGCGC 140
DQ812938Pestalotia TACCTTGGA--ACGGCTACCCTGCCACGCCTTACCCTGGAACGGCTTACCCTGTAACGG 69
*** ** * *

M1 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 100
M37 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 191
M35 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 193
M32 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 192
M36 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 192
M33 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 205
M31 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 207
M2 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 192
M34 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 192
AY770557 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 174
AF272787 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 205
DQ286123 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 231
M40 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 204
M38 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTATTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAA 193

C2 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTCTATTACACGACGTTCTTCTGAGTGGCACAAGCAA 182
 M39 CCGCCGGAG--GAAACCAAACCTCTATTACACGACGTTCTTCTGAGTGGCACAAGCAA 201
 M13 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 196
 M16 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M21 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 196
 M11 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 197
 M5 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 194
 M6 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 197
 M19 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 197
 M22 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 M26 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 M18 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 182
 M4 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M10 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 196
 M27 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 M28 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 M29 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 M15 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 182
 M30 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M25 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M24 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M20 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 M3 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 179
 M9 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 159
 M17 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 175
 M8 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 172
 M12 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 103
 M14 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 103
 G4 CCGCCGGATTGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 94
 G5 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 139
 G7 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 126
 AJ300559 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 165
 G3 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 181
 G6 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 185
 G2 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 185
 G1 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 185
 G10 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 G8 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 183
 G9 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 199
 AF272779 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 195
 AJ536229 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 165
 AY188931 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 DQ868499 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 165
 AY188930 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 AY188928 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 AY188926 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 C1 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 182
 AJ313178 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 163
 AY188929 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 AY188927 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAA 170
 M7 CCGCCGGAG-GATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGCATAAGCAA 199
 DQ812938Pestalotia CTGCCGTG-GACTACCAAACCTCTGTTATTATTAT-TGTAATCTGAGCGTCTTATTTTAA 127
 *

M1 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 159
 M37 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 250
 M35 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 252
 M32 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 251
 M36 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 251
 M33 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 264
 M31 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 266
 M2 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 251
 M34 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 251
 AY770557 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 233
 AF272787 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 264
 DQ286123 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 290
 M40 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 263
 M38 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 252
 C2 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 241
 M39 -TAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 260
 M13 -TAATCA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 255
 M16 -TAATCA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 240
 M21 -TAATCA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 255
 M11 -TAATCA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 256
 M5 -TAATCA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAA 253

M6 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 256
M19 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 256
M22 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
M26 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
M18 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 241
M4 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
M10 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 255
M27 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
M28 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
M29 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
M15 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 241
M30 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
M25 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
M24 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
M20 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
M3 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 238
M9 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 218
M17 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 234
M8 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 231
M12 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 162
M14 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 162
G4 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 153
G5 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 198
G7 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 185
AJ300559 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 224
G3 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 240
G6 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 244
G2 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 244
G1 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 244
G10 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
G8 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 242
G9 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 258
AF272779 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 254
AJ536229 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 224
AY188931 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
DQ868499 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 224
AY188930 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
AY188928 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
AY188926 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
C1 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 241
AJ313178 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 222
AY188929 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
AY188927 -TAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 229
M7 ATAATCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 259
DQ812938Pestalotia TAAGTCAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA 187
* * * * *

M1 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 219
M37 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 310
M35 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 312
M32 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 311
M36 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 311
M33 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 324
M31 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 326
M2 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 311
M34 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 311
AY770557 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 293
AF272787 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 324
DQ286123 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 350
M40 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 323
M38 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 312
C2 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 301
M39 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 320
M13 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 315
M16 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M21 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 315
M11 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 316
M5 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 313
M6 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 316
M19 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 316
M22 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
M26 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
M18 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 301
M4 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M10 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 315

M27 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
M28 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
M29 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
M15 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 301
M30 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M25 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M24 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M20 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
M3 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 298
M9 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 278
M17 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 294
M8 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 291
M12 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 222
M14 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 222
G4 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 213
G5 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 258
G7 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 245
AJ300559 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 284
G3 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 300
G6 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 304
G2 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 304
G1 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 304
G10 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
G8 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 302
G9 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 318
AF272779 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 314
AJ536229 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 284
AY188931 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
DQ868499 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 284
AY188930 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
AY188928 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
AY188926 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
C1 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 301
AJ313178 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 282
AY188929 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
AY188927 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 289
M7 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 319
DQ812938Pestalotia ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT 247

M1 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 278
M37 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 369
M35 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 371
M32 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 370
M36 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 370
M33 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 383
M31 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 385
M2 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 370
M34 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 370
AY770557 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 352
AF272787 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 383
DQ286123 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 409
M40 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 382
M38 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 371
C2 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 360
M39 GCGCTCGCCAGCATTC-TGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCAC 379
M13 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 374
M16 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
M21 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 374
M11 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 375
M5 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 372
M6 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 375
M19 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 375
M22 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
M26 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
M18 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 360
M4 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
M10 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 374
M27 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
M28 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
M29 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
M15 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 360
M30 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
M25 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
M24 GCGCCCGCCAGCATTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359

M20 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
M3 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 357
M9 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 337
M17 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 353
M8 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 350
M12 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 281
M14 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 281
G4 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 272
G5 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 317
G7 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 304
AJ300559 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 343
G3 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 359
G6 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 363
G2 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 363
G1 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 363
G10 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
G8 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 361
G9 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 377
AF272779 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 373
AJ536229 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 344
AY188931 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
DQ868499 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 343
AY188930 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
AY188928 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
AY188926 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
C1 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 360
AJ313178 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 341
AY188929 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
AY188927 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 348
M7 GCGCCCGCCAGCATTTC-TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTC 378
DQ812938Pestalotia GCGCCCATAGTATTTC-TAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTAAGCTC 306
**** * ** **** * * * *****

M1 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 331
M37 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 422
M35 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 424
M32 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 423
M36 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 423
M33 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 436
M31 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 438
M2 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 423
M34 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 423
AY770557 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 405
AF272787 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCC-----GACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 436
DQ286123 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCC-----GACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 462
M40 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 435
M38 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 424
C2 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 413
M39 CGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCA-----CACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGA 432
M13 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 427
M16 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M21 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 427
M11 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 428
M5 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 425
M6 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 428
M19 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 428
M22 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 414
M26 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 414
M18 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 413
M4 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M10 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 427
M27 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 414
M28 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 414
M29 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 414
M15 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 413
M30 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M25 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M24 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M20 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 412
M3 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 410
M9 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 390
M17 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 406
M8 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 403
M12 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 334
M14 TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA 334

G4	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	325
G5	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	370
G7	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	357
AJ300559	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	396
G3	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	412
G6	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	416
G2	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	416
G1	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	416
G10	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	414
G8	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	414
G9	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	430
AF272779	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	426
AJ536229	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCT-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	397
AY188931	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
DQ868499	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	396
AY188930	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
AY188928	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
AY188926	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
C1	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	413
AJ313178	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	394
AY188929	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
AY188927	TGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCC-----GATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	401
M7	TGCTTGGTGTGGGGCTACGGTC-----GACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGA	431
DQ812938Pestalotia	AGCTTAGTGTTGGGGCCCTACGCTTTTGCTAGCTGTAGCTCCTGAAATACAGTGGCGGA	366
	**** *	

M1	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	386
M37	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	477
M35	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	479
M32	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	478
M36	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	478
M33	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	491
M31	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	493
M2	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	478
M34	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	478
AY770557	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	460
AF272787	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	491
DQ286123	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	517
M40	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	490
M38	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	479
C2	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M39	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	487
M13	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	483
M16	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M21	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	483
M11	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	484
M5	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	481
M6	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	484
M19	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	484
M22	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	470
M26	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	470
M18	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	469
M4	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M10	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	483
M27	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	470
M28	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	470
M29	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	470
M15	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	469
M30	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M25	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M24	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M20	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
M3	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	466
M9	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	446
M17	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	462
M8	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	459
M12	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	390
M14	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	390
G4	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	381
G5	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	426
G7	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	413
AJ300559	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	452
G3	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	468
G6	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	472
G2	CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC-TAACGTCTCGCACTGG---GATTCGGAGG	472

G1 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 472
G10 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 470
G8 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 470
G9 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 486
AF272779 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 482
AJ536229 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 453
AY188931 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
DQ868499 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 452
AY188930 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
AY188928 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
AY188926 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
C1 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 469
AJ313178 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 450
AY188929 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
AY188927 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 457
M7 CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGG----GATCCGGAGG 487
DQ812938Pestalotia TCTG--CGATATCCTCTGAGCGTAGTAAATTTTATCTCGCTTTTGACTGGAGTTGCAGC 424
* ** * ** *

M1 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 446
M37 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 537
M35 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 539
M32 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 538
M36 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 538
M33 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 551
M31 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 553
M2 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTT----- 508
M34 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGGAGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 538
AY770557 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGG----- 495
AF272787 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 551
DQ286123 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 577
M40 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 550
M38 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 539
C2 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M39 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 547
M13 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 543
M16 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAA----- 501
M21 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 543
M11 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 544
M5 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 541
M6 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 544
M19 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 544
M22 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
M26 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
M18 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 529
M4 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M10 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 543
M27 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
M28 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
M29 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
M15 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 529
M30 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M25 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M24 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M20 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
M3 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 526
M9 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 506
M17 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 522
M8 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 519
M12 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 450
M14 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 450
G4 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 441
G5 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 486
G7 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 473
AJ300559 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 512
G3 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 528
G6 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 532
G2 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 532
G1 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 532
G10 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
G8 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 530
G9 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 546
AF272779 GACTCTTGCCGTAAAACCCCC--AATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 541
AJ536229 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAATTTTCC----- 483
AY188931 GACTCTTGCCGTAAAACCCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517

```

DQ868499          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG----- 486
AY188930          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517
AY188928          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517
AY188926          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517
C1                GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 529
AJ313178          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAA----- 482
AY188929          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517
AY188927          GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 517
M7                GACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC 547
DQ812938Pestalotia GTCTTTGGCCGCTAAATCCCCCAATTTT-AATGGTTGACCTCGG----- 468
* * * * *

```

```

M1                CCGCTGAACTTAAGCATAT----- 465
M37               CCGCTGAACTTAAGCATATA----- 557
M35               CCGCTGAACTTAAGCATATCATTAA----- 564
M32               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 559
M36               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 559
M33               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 572
M31               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 574
M2                -----
M34               CCG----- 541
AY770557         -----
AF272787         CCG----- 554
DQ286123         CCGCTGAACTTAAGCATAT----- 596
M40               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 570
M38               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 560
C2                CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 549
M39               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 568
M13               CCGCTG----- 549
M16               -----
M21               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 563
M11               CCGCTGAACTTAAGCATATCAATTA----- 569
M5                CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 561
M6                CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 565
M19               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 564
M22               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 550
M26               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 550
M18               CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 549
M4                CCGCTGAACTTAAGCATAT----- 547
M10               CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGG-- 576
M27               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 551
M28               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 551
M29               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 551
M15               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 550
M30               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 549
M25               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 549
M24               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 549
M20               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 549
M3                CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 546
M9                CCGCTGAACTTAAGCATATC----- 526
M17               CCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAAGCGGAGGAA 557
M8                CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 540
M12               CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA----- 475
M14               CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA----- 475
G4                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA-GCGGAGGAA 475
G5                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA-GCGGAGGAA 520
G7                CCGCTGAACTTAAGCATATCAAT----- 496
AJ300559         CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA-GCGGAGGA- 545
G3                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGG-- 561
G6                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAAGCGGAGG-- 565
G2                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAAGAGGAGGA- 566
G1                CCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAGAGGAGG--- 564
G10               CCGC----- 534
G8                CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 551
G9                CCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAAGCGGAGGAA 581
AF272779         CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA-GCGGAGGA- 574
AJ536229         -----
AY188931         CCGC----- 521
DQ868499         -----
AY188930         CCGC----- 521
AY188928         CCGC----- 521
AY188926         CCGC----- 521
C1                CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 550
AJ313178         -----
AY188929         CCGC----- 521

```

```
AY188927          CCGC----- 521  
M7               CCGCTGAACTTAAGCATATCA----- 568  
DQ812938Pestalotia -----
```


ANEXO 5

5 BLAST_N – NCBI

O site utilizado para acessar o *GenBank*, usando o programa *Blast_n* do NCBI foi o <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Todas as seqüências foram colocadas juntas no local indicado pela fecha. Após é só clicar no “BLAST!”. E depois clicar em “FORMAT!”.

NCBI **nucleotide-nucleotide BLAST**

Nucleotide Protein Translations Retrieve results for an RFL

Search **>M1**

```
CCTCCCCTCCCGGGCCGGCCCCACACACGGGACGGGGCCCGCCGGAGGAAACCAA
ACTCTATTACACGACGTCTCTTCGAGTGGCACAAGCAAATATTAAACTTTAAACA
ACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCCATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCT
```

Set subsequence From: To:

Choose database

Human genomic plus transcript

Mouse genomic plus transcript

Others (nr etc.):

est_others

Now: **BLAST!** or

Options for advanced blasting

Limit by entries query or select from: All organisms

Resultado da análise de uma das seqüências feita no *Blast_n*:



BLASTN 2.2.15 [Oct-15-2006]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1169491494-6499-121451750807.BLASTQ4

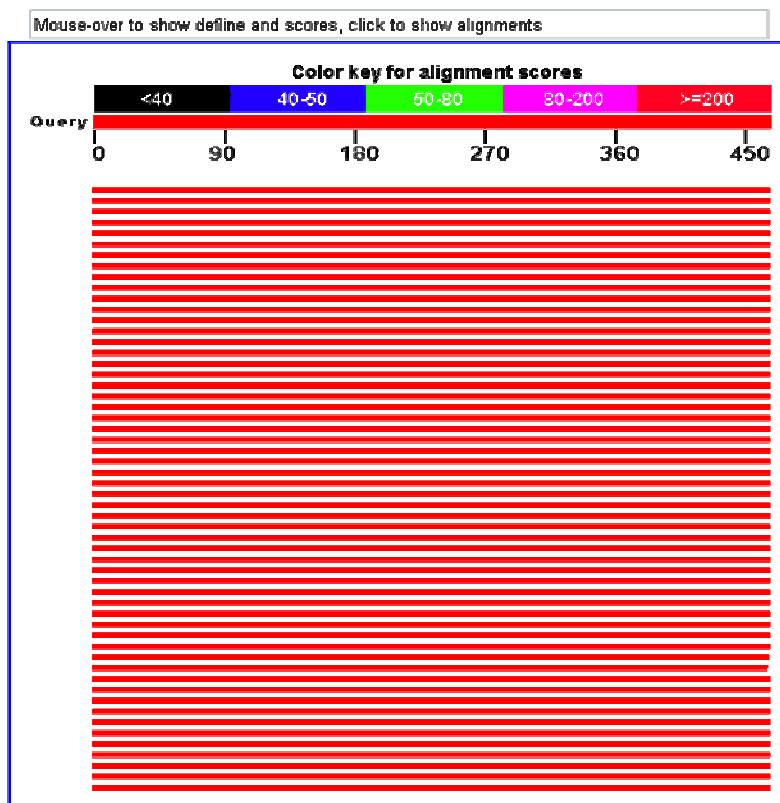
Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
4,885,575 sequences; 19,573,480,972 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

[Taxonomy reports](#)

Query= M1
Length=465

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:				(Bits)	Value
gi 116175377 emb AM404289.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175376 emb AM404288.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175375 emb AM404287.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175374 emb AM404286.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175373 emb AM404285.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175372 emb AM404284.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175371 emb AM404283.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175370 emb AM404282.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175369 emb AM404281.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175368 emb AM404280.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175366 emb AM404278.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175365 emb AM404277.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175364 emb AM404276.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 116175363 emb AM404275.1 	Glomerella acutata 18S rRNA gene...	922	0.0		
gi 96776131 dbj AB219041.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96776105 dbj AB219037.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96776075 dbj AB219033.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96776067 dbj AB219032.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96776061 dbj AB219031.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96776029 dbj AB219026.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 96775988 dbj AB219020.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 31789268 gb AY266405.1 	Glomerella acutata strain G2 inter...	922	0.0		
gi 66990185 emb AJ749679.1 	Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	922	0.0		
gi 67043903 gb DQ062670.1 	Glomerella acutata 18S ribosomal R...	922	0.0		
gi 62903176 gb DQ003133.1 	Glomerella acutata strain ANE-25A ...	922	0.0		
gi 62903166 gb DQ003123.1 	Glomerella acutata strain TUT137A ...	922	0.0		
gi 62903165 gb DQ003122.1 	Glomerella acutata strain Mil-1 in...	922	0.0		
gi 62903164 gb DQ003121.1 	Glomerella acutata strain ALM-9-US...	922	0.0		
gi 62903162 gb DQ003119.1 	Glomerella acutata strain 216 inte...	922	0.0		
gi 55833116 gb AY818361.1 	Glomerella acutata isolate SA 0-1 ...	922	0.0		
gi 24459953 dbj AB042301.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	922	0.0		
gi 17426667 emb AJ301964.1 CAC301964	Colletotrichum acutatum ...	922	0.0		
gi 17426655 emb AJ301951.1 CAC301951	Colletotrichum acutatum ...	922	0.0		
gi 17426654 emb AJ301950.1 CAC301950	Colletotrichum acutatum ...	922	0.0		
gi 17426636 emb AJ301932.1 CAC301932	Colletotrichum acutatum ...	922	0.0		
gi 17426626 emb AJ301922.1 CAC301922	Colletotrichum acutatum ...	922	0.0		
gi 23477056 emb AJ300558.1 CSP300558	Colletotrichum sp. TNOS3...	922	0.0		
gi 82799382 gb DQ286130.1 	Glomerella acutata strain MEP1534 ...	920	0.0		
gi 62903173 gb DQ003130.1 	Glomerella acutata strain ANE-27A ...	918	0.0		
gi 96776125 dbj AB219040.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	914	0.0		
gi 27884443 gb AF272783.1 	Glomerella acutata isolate IMI2231...	914	0.0		
gi 27884442 gb AF272782.1 	Glomerella acutata isolate ANE HV8...	914	0.0		
gi 83316234 gb DQ300348.1 	Colletotrichum sp. SM03 internal t...	914	0.0		
gi 66990182 emb AJ749676.1 	Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	906	0.0		
gi 17426625 emb AJ301921.1 CAC301921	Colletotrichum acutatum ...	902	0.0		
gi 17426624 emb AJ301920.1 CAC301920	Colletotrichum acutatum ...	902	0.0		
gi 96776024 dbj AB219025.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	898	0.0		
gi 96776016 dbj AB219024.1 	Glomerella acutata genes for 18S ...	898	0.0		
gi 28076682 gb AF489564.1 	Glomerella acutata isolate Cha-s 1...	898	0.0		
gi 28076680 gb AF489562.1 	Glomerella acutata isolate 1267b 1...	898	0.0		
gi 24459964 dbj AB042312.1 	Colletotrichum carthami gene for ...	898	0.0		
gi 24459959 dbj AB042307.1 	Colletotrichum carthami gene for ...	898	0.0		
gi 24459958 dbj AB042306.1 	Colletotrichum carthami gene for ...	898	0.0		
gi 62903144 gb DQ003101.1 	Glomerella acutata strain TUT5954 ...	894	0.0		
gi 9716376 gb AF207794.1 AF207794	Colletotrichum acutatum TUT...	894	0.0		
gi 38606384 gb AY376507.1 	Glomerella acutata strain STE-U 44...	892	0.0		
gi 38606383 gb AY376506.1 	Glomerella acutata strain STE-U 44...	892	0.0		
gi 38606382 gb AY376505.1 	Glomerella acutata strain STE-U 44...	892	0.0		
gi 38606381 gb AY376504.1 	Glomerella acutata strain STE-U 44...	892	0.0		
gi 38606380 gb AY376503.1 	Glomerella acutata strain STE-U 44...	892	0.0		
gi 82799371 gb DQ286119.1 	Colletotrichum lupini strain AR282...	890	0.0		
gi 66990184 emb AJ749678.1 	Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	890	0.0		
gi 27884444 gb AF272784.1 	Glomerella acutata isolate STR3 in...	890	0.0		
gi 17426683 emb AJ301982.1 CAC301982	Colletotrichum acutatum ...	890	0.0		
gi 17426682 emb AJ301981.1 CAC301981	Colletotrichum acutatum ...	890	0.0		

gi 17426676	emb AJ301975.1	CLU301975	Colletotrichum lupini 18...	890	0.0
gi 17426669	emb AJ301968.1	CLU301968	Colletotrichum lupini 18...	890	0.0
gi 17426653	emb AJ301949.1	CAC301949	Colletotrichum acutatum ...	890	0.0
gi 17426630	emb AJ301926.1	CAC301926	Colletotrichum acutatum ...	890	0.0
gi 17426620	emb AJ301916.1	CLU301916	Colletotrichum lupini 18...	890	0.0
gi 23477059	emb AJ300561.1	CSP300561	Colletotrichum sp. TNOS3...	890	0.0
gi 82799384	gb DQ286132.1		Glomerella acutata strain ATCC 568...	882	0.0
gi 82799375	gb DQ286123.1		Glomerella acutata strain ATCC MYA...	882	0.0
gi 82799373	gb DQ286121.1		Glomerella acutata strain ATCC MYA...	882	0.0
gi 116175367	emb AM404279.1		Glomerella acutata 18S rRNA gene...	882	0.0
gi 96776112	dbj AB219038.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776098	dbj AB219036.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776082	dbj AB219034.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776047	dbj AB219029.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776040	dbj AB219028.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776035	dbj AB219027.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776009	dbj AB219023.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96776002	dbj AB219022.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 96775994	dbj AB219021.1		Glomerella acutata genes for 18S ...	882	0.0
gi 74182860	dbj AB233349.1		Glomerella acutata genes for 5.8S...	882	0.0
gi 74182858	dbj AB233347.1		Glomerella acutata genes for 5.8S...	882	0.0
gi 74182855	dbj AB233344.1		Glomerella acutata genes for 5.8S...	882	0.0
gi 74182852	dbj AB233341.1		Glomerella acutata genes for 5.8S...	882	0.0
gi 66990199	emb AJ749694.1		Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	882	0.0
gi 66990183	emb AJ749677.1		Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	882	0.0
gi 66990181	emb AJ749673.1		Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	882	0.0
gi 66990180	emb AJ749672.1		Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	882	0.0
gi 66990179	emb AJ749671.1		Colletotrichum acutatum ITS1, 5.8...	882	0.0
gi 62903169	gb DQ003126.1		Glomerella acutata strain APPY3 in...	882	0.0
gi 62903168	gb DQ003125.1		Glomerella acutata strain 2.7.15 i...	882	0.0
gi 62903167	gb DQ003124.1		Glomerella acutata strain 1.4.57 i...	882	0.0
gi 62903163	gb DQ003120.1		Glomerella acutata strain 5.7.52 i...	882	0.0
gi 28076685	gb AF489567.1		Glomerella acutata isolate Myrtill...	882	0.0
gi 28076684	gb AF489566.1		Glomerella acutata isolate F3c 18S...	882	0.0
gi 27884446	gb AF272786.1		Glomerella acutata isolate PCN5 in...	882	0.0

> [gi|116175377](#) [emb|AM404289.1](#) Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S
rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate SM957
Length=601

Score = 922 bits (465), Expect = 0.0
Identities = 465/465 (100%), Gaps = 0/465 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CCTCCCCTCCCGGCCCGCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 60
      |||
Sbjct 117 CCTCCCCTCCCGGCCCGCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 176

Query 61 CTCTATTTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTTAAACTTTTAAACAAC 120
      |||
Sbjct 177 CTCTATTTACACGACGTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTTAAACTTTTAAACAAC 236

Query 121 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 180
      |||
Sbjct 237 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 296

Query 181 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 240
      |||
Sbjct 297 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 356

Query 241 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 300
      |||
Sbjct 357 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 416

```

```

Query 301 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 360
          |||
Sbjct 417 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 476

Query 361 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 420
          |||
Sbjct 477 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 536

Query 421 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 465
          |||
Sbjct 537 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 581

```

[gi|116175376|emb|AM404288.1|](#) Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate SM959
 Length=601

Score = 922 bits (465), Expect = 0.0
 Identities = 465/465 (100%), Gaps = 0/465 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 60
          |||
Sbjct 117 CCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 176

Query 61 CTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAAAACCTTTTAAACAAC 120
          |||
Sbjct 177 CTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAAAACCTTTTAAACAAC 236

Query 121 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 180
          |||
Sbjct 237 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 296

Query 181 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 240
          |||
Sbjct 297 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 356

Query 241 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 300
          |||
Sbjct 357 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 416

Query 301 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 360
          |||
Sbjct 417 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 476

Query 361 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 420
          |||
Sbjct 477 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 536

Query 421 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 465
          |||
Sbjct 537 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 581

```

[gi|116175375|emb|AM404287.1|](#) Glomerella acutata 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, isolate SM59
 Length=601

Score = 922 bits (465), Expect = 0.0
 Identities = 465/465 (100%), Gaps = 0/465 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 60
      |||
Sbjct 117 CCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAAACCAA 176

Query 61 CTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAAACTTTTAACAAC 120
      |||
Sbjct 177 CTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAAACTTTTAACAAC 236

Query 121 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 180
      |||
Sbjct 237 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT 296

Query 181 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 240
      |||
Sbjct 297 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCG 356

Query 241 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 300
      |||
Sbjct 357 AGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACG 416

Query 301 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 360
      |||
Sbjct 417 GCACACGTGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAC 476

Query 361 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 420
      |||
Sbjct 477 TAACGTCTCGCACTGGGATTCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAAATTTTTTACAG 536

Query 421 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 465
      |||
Sbjct 537 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 581

```

ANEXO 6

6 MEGA 3.1

A árvore filogenética foi construída no software Mega 3.1. disponível para download no site <http://www.megasoftware.net>.

Esquema de como colocar os dados e gerar as árvores:

Abrir o Programa

1 – Ir em: Text Editor

File

New

2 – Fazer o Clustaw W das seqüências: copiar da pág. da Web e colar em Mega – New Text

Salvá-las em .txt

3 – Sair do editor de texto

4 – Converter para formato MEGA

5 – Salvar e Fechar

6 – Ir em: Click me to active a data file

Abrir o documento salvo no item 4

7 – Para análises: Estatísticas: ir em estatistic

Árvores: ir em Phylogeny:

Construct phylogeny

View

Tree / Branch style

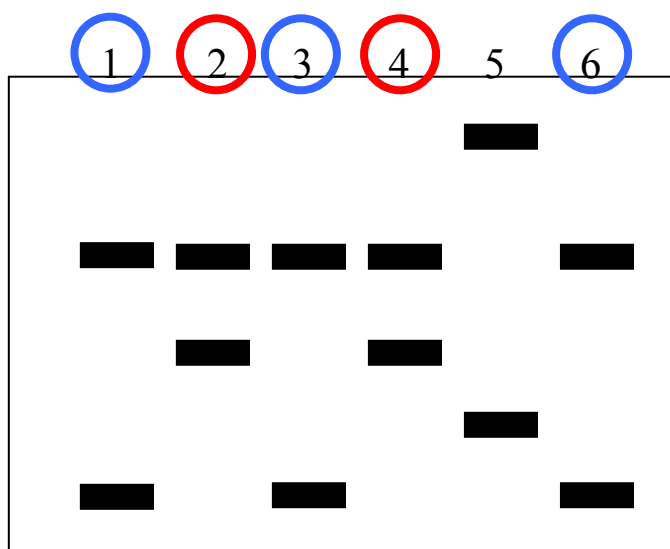
ANEXO 7

7 ANÁLISE DOS GÉIS DE ARDRA PARA AGRUPAMENTO DAS AMOSTRAS EM HAPLÓTIPOS (MARTINS, 2005)

HAPLÓTIPO: É a combinação dos perfis de clivagens obtidos.

7.1 Identifica-se primeiramente nos géis, as amostras que possuem o mesmo perfil para uma determinada enzima de restrição.

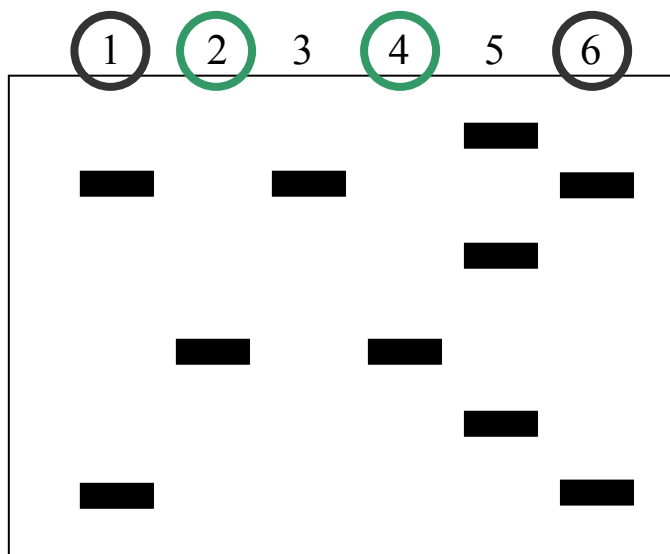
Por exemplo, o produto de PCR para ITS clivado com a enzima *Mbo* I, obtém-se o seguinte padrão de bandas:



7.2 Assim, obtém-se neste gel 3 perfis de ARDRA, sendo que as amostras 1, 3 e 6 possuem padrão semelhante, e da mesma forma, as amostras 2 e 4 são semelhantes entre si.

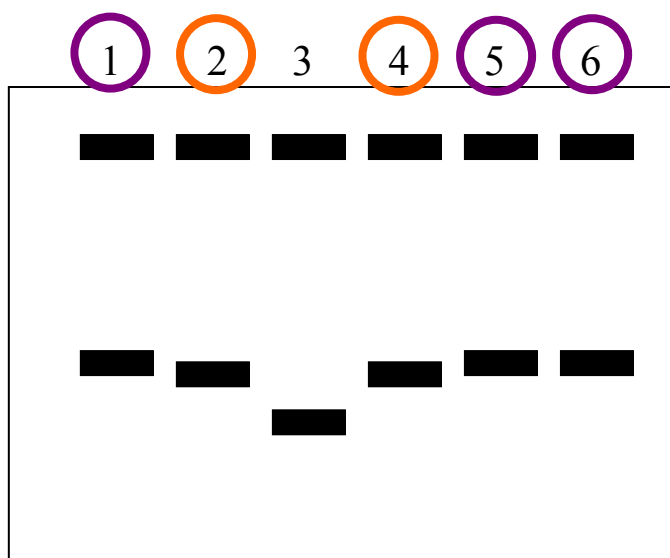
Assim, considera-se que, com essa enzima, obtivemos 3 grupos de perfis diferentes A, B e C. O grupo A conterà as amostras 1, 3 e 6; o grupo B as amostras 2 e 4 e (C) com a amostra 5.

7.3 Procede-se esta mesma análise de agrupamento com as mesmas amostras mas com outras enzimas. Por exemplo, se for utilizado as enzimas *Hinf* I:



7.4 Com a enzima *Hinf* I (gel exemplificado acima), obtém-se novamente 4 padrões, sendo que as amostras 1 e 6 possuem perfis iguais, da mesma forma que as amostras 2 e 4. Assim, para essa enzima, tem-se 4 grupos de perfis diferentes: A, B, C e D, sendo que: (A) amostra 1 e 6; (B) amostra 2 e 4 ; (C) amostra 3 e (D) amostra 5.

7.5 Com outra enzima *Hind* III, novamente repete-se o processo:



7.6 Com a enzima *Hind* III, foi obtido os seguintes grupos de perfis: (A) com as amostras 1, 5 e 6; (B) com as amostras 2 e 4; (C) com a amostra 3.

7.7 Tendo analisado os grupos de perfis para diferentes enzimas, é feito um quadro como segue:

Amostra\Isolado	<i>Mbo</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hind</i> III	Haplótipos
1	A	A	A	1
2	B	B	B	2
3	A	C	C	3
4	B	B	B	2
5	C	C	A	4
6	A	A	A	1

7.8 Por fim é feito o agrupamento dos isolados nos diferentes haplótipos.

Obs.: O número de haplótipos vai depender do número de combinações que se obter. Nesse caso foram 4 haplótipos.