

Caracterização Molecular de Microrganismos do Ecossistema Agrícola do Cerrado

II – *Colletotrichum graminicola*

José Edson Fontes Figueiredo¹
Henrique Cestari De Paoli²
Pablo Lopes Quintão²
Vinício Tadeu da Silva Coelho²
Carlos Roberto Casela³
Alexandre da Silva Ferreira³
Wellington Bressan³
Cláudia Teixeira Guimarães³
Eliane Aparecida Gomes³

Palavras-chave

SDS-PAGE, RAPD, rDNA, ARDRA, Seqüenciamento, Antracnose, *Colletotrichum graminicola*

Introdução

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola*, constitui sério obstáculo à expansão da cultura do sorgo no Brasil. O patógeno apresenta alta variabilidade e rapidamente se adapta à resistência genética do hospedeiro, produzindo novas formas de virulência. A seleção de combinações de genótipos de sorgo para os quais não existam associações de virulência na população do patógeno constitui uma estratégia para a obtenção de plantas com resistência estável à antracnose. Nessa abordagem, a seleção é realizada com base em informações obtidas por meio da análise da estrutura de virulência da população. Várias raças brasileiras de *C. graminicola* foram identificadas utilizando esse procedimento. Contudo, o método

apresenta limitações, pois as relações patógeno/hospedeiro são fortemente influenciadas, tanto pelas condições fisiológicas dos agentes envolvidos, como pelas condições ambientais. Este estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver protocolos de biologia molecular para auxiliar na identificação de raças de *C. graminicola*. Foram testadas as técnicas de SDS-PAGE, RAPD-PCR, ARDRA, e seqüenciamento de genes ribossomais (rDNA) amplificados por PCR. O material biológico consistiu de cinco raças de *C. graminicola* isoladas de sistemas agrícolas da região do cerrado (Sete Lagoas e Capinópolis, MG e Cravinhos, SP) e previamente identificadas por meio de série diferencial. (F1= 29A, F2= 31B, F3= 15C, F4= 30C, F5= 15E).

¹Biólogo, Doutor, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil.
jeff@cnpmc.embrapa.br

²Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Caixa Postal 46, CEP 30.160-012 Belo Horizonte, MG, Brasil

³Eng. Agr., Doutor, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil

A técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) é útil quando ocorrem variações no padrão de expressão gênica e/ou quando existem diferenças significativas no tamanho dos polipeptídeos expressados por determinados genes. Em bactérias endofíticas, por exemplo, esse método se mostrou útil e suficiente para identificar réplicas na coleção da Embrapa Milho e Sorgo (Figueiredo e colaboradores, dados não publicados). O perfil eletroforético de proteínas totais (SDS-PAGE) extraídas de massa micelial de *C. graminicola* apresentou baixo grau de polimorfismo e, por isso, foi insuficiente para discriminar as cinco raças do fungo (Figura 1).

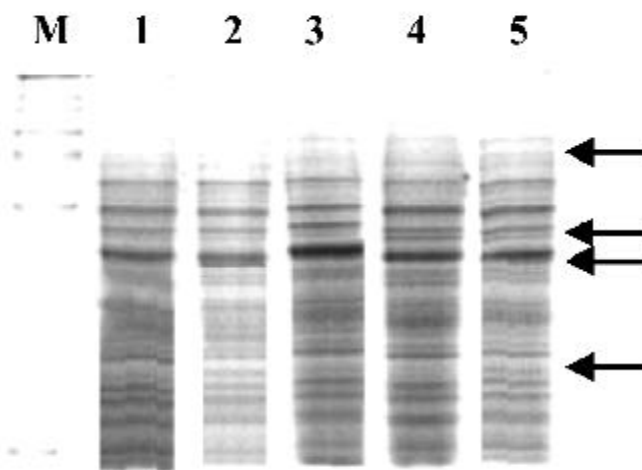


Figura 1. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de proteínas totais de cinco isolados de *C. graminicola*. Algumas diferenças encontradas no perfil eletroforético foram indicadas pelas flechas. M = Marcador de peso molecular Rainbow. Os números de 1 a 5 correspondem aos isolados F1, F2, F3, F4 e F5, respectivamente.

A técnica de RAPD-PCR (Welsh & McClelland, 1990; Williams, et al., 1990) é fundamentada na amplificação de seqüências aleatórias de DNA genômico total, empregando iniciadores desenhados aleatoriamente. RAPD-PCR constitui uma poderosa ferramenta para revelar o grau de polimorfismo genético dentro das populações e para estabelecer relações filogenéticas entre raças e espécies. Neste estudo, foram testados 20 iniciadores (OPA 8, OPA 12, OPA 14, OPA 15, OPA17, OPA18, OPA19, OPA20, OPT1, OPT2, OPT3, OPT4, OPT5, OPT6, OPT7, OPT8, OPT9, OPT10, OPA 5, OPA6), contendo dez nucleotídeos (10-mer primers, Operon

Technologies, Alameda, CA). Os produtos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio (10mg/mL) e a eletroforese foi realizada em tampão TBE, a 70 V durante quatro horas. Em seguida, os géis foram fotografados e analisados. O produto da amplificação de seis iniciadores foram iguais ou apresentaram poucas bandas polimórficas e, por isso, foram descartados da análise. Os 14 iniciadores restantes produziram 153 bandas polimórficas que foram suficientes para revelar as diferenças genéticas (Figura 2) e para estabelecer o grau de identidade entre as cinco raças de *C. graminicola* (Figura 3).

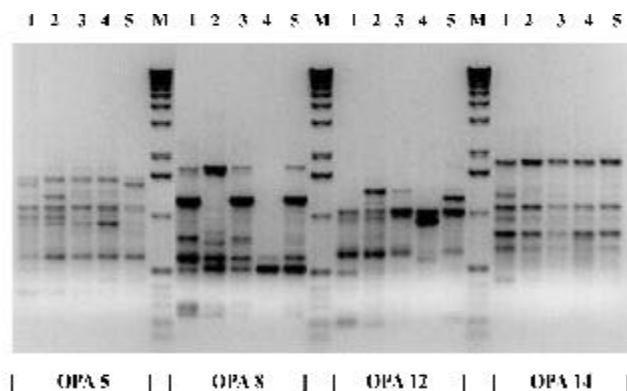


Figura 2. Produtos amplificados por RAPD-PCR de DNA de *Colletotrichum graminicola*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam, respectivamente, os isolados fúngicos F1, F2, F3, F4 e F5. M = marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (GIBCO/BRL).

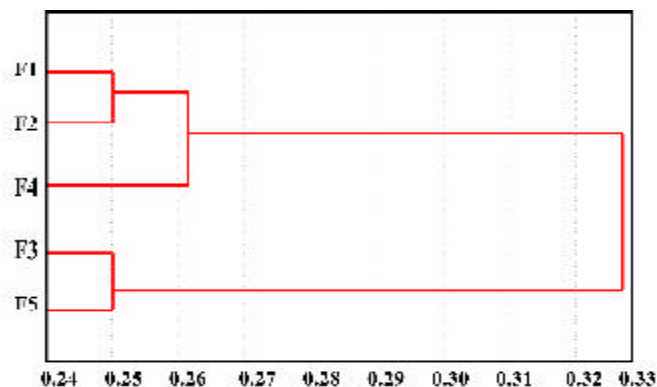


Figura 3. Dendrograma de similaridade entre isolados de *C. graminicola* baseado em DNA amplificado por RAPD. A figura mostra a relação entre cinco raças fúngicas, baseado no padrão de bandas amplificadas. O dendrograma foi construído pelo método de Jaccard. Os números abaixo do dendrograma indicam a dissimilaridade entre as cinco raças (F1 a F5) de *C. graminicola*.

A diversidade genética de cinco isolados de *Colletotrichum graminicola* foi investigada por PCR do gene ribossomal 18S e da região espaçadora intragênica (ITS) dos genes 18S e 28S (Figura 4). O gene 18S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores NS1F (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8R (5'-TCCGCAGGTTCCACCTACGGA-3') (Lane, 1991). O DNA da região espaçadora ITS foi amplificado com os primers 18S ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 28S ITS4 (5'-TCCTCCGCTTCTTGATATGC-3'). Esses iniciadores anelam em regiões de seqüências do DNA que são muito conservadas em fungos, os quais são geneticamente relacionados com *Colletotrichum graminicola* (Bruns, *et al.*, 1992; Lane, *et al.*, 1985; White, *et al.*, 1990).



Figura 4. Esquema da estrutura dos genes ribossomais em organismos superiores. As posições dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S (NS1 e NS8) e da região ITS (ITS1 e ITS4) estão indicadas.

Alíquotas de 500 ng dos produtos de amplificação por PCR de cada isolado foram digeridas durante 4 h com 2,0 U de enzimas de restrição (*AluI*, *MboI*, *Sau3A* e *EcoRI*) (GIBCO BRL). Após as digestões, o DNA foi analisado por eletroforese em géis de agarose 1,5 % (ITS) e 0,8 % em tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA, pH 8,0), contendo 0,5 mg/L de brometo de etídio. Os géis foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Alternativamente, os produtos das digestões do DNA amplificado da região ITS foram resolvidos em géis de poliacrilamida a 10% e corados com prata (dados não mostrados).

Os produtos da amplificação do rDNA 18S e da região intragênica 18S-23S de cada isolado de *Colletotrichum graminicola* foram seqüenciados (Forward e Reverse) diretamente ou clonados em vetor pBluescript II KS (+)

cloning vector. Subclonagens do gene 18S foram realizadas sempre que necessário. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit de seqüenciamento ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer). As reações foram realizadas em volume total de 20 µL contendo 180ng de DNA, 8,0 µL de premix, 4,0 mM de um dos iniciadores (ITS1, ITS4, NS1, NS8, , M13 forward ou M13 reverse). As reações foram incubadas no termociclador "PTC-100™ MJ Research. Inc.", estabelecendo o programa de 30 segundos a 96°C para desnaturação do DNA, 15 segundos a 50°C para anelamento dos primers e quatro minutos a 60°C para extensão da fita de DNA, sendo repetido 25 vezes. A precipitação do DNA foi feita com NaOAC 3M, 95% etanol e ressuspenso em tampão de seqüenciamento. Cada reação foi repetida pelo menos três vezes. As reações foram processadas no aparelho ABI PRISM 377 sequencer (Perkin-Elmer).

As seqüências de DNA da região ITS (18S-23S) e do gene 18S (NS1 e NS8) de *Colletotrichum graminicola* produzidas durante este estudo foram alinhadas e revelaram as diferenças entre as cinco raças. A região ITS apresentou menor grau de variação do que as seqüências do gene 18S (Figuras 9, 10 e 11). As seqüências de DNA dos genes ribossomais das cinco raças de *C. graminicola* foram empregadas para estabelecer as relações filogenéticas entre elas (Figura 12). A análise por similaridade de seqüências no GenBank confirmaram amplamente a identidade das cinco raças analisadas com a espécie *Colletotrichum graminicola* (dados não mostrados). As seqüências do DNA foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e as relações filogenéticas foram estabelecidas usando MEGA package (Kumar *et al.*, 1993) (Figura 12).

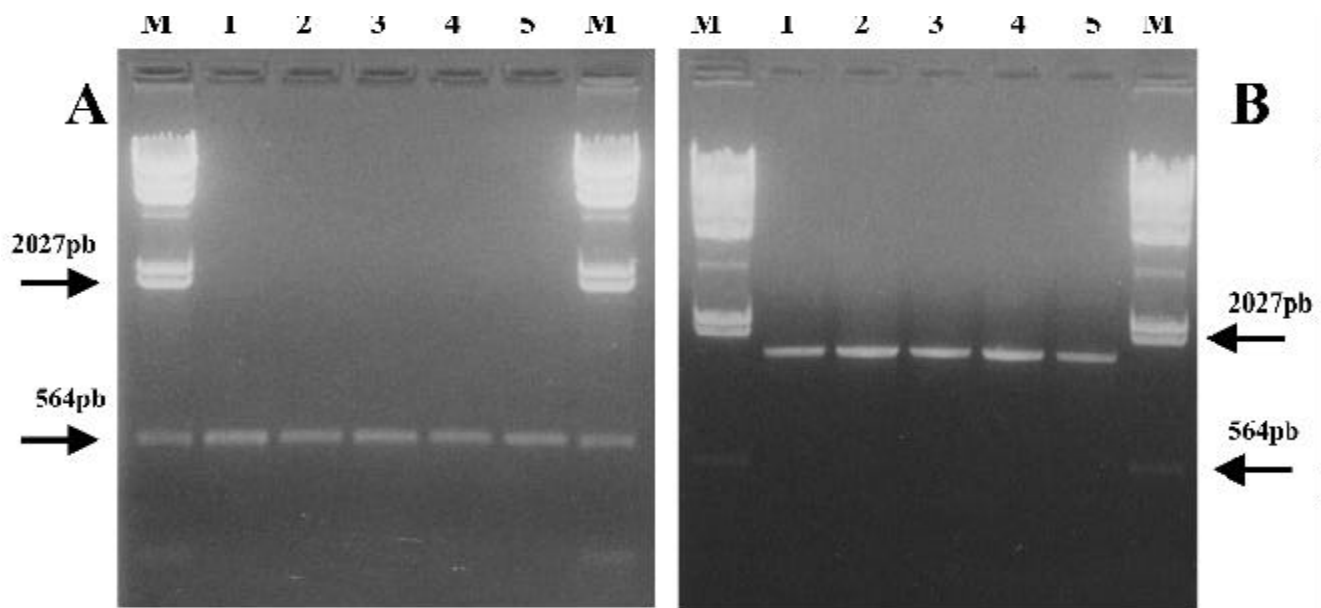


Figura 5. PCR de rDNA de *Colletotrichum graminicola*. (A) Região intragênica amplificada com os primers universais FITS1/RITS4, (B) gene 18S com os primers FNS1/RNS8. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem, respectivamente, aos isolados fúngicos F1, F2, F3, F4 e F5. Não foram observadas diferenças visíveis no tamanho de DNA amplificado. M = marcador de peso molecular lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III (GIBCO/BRL).

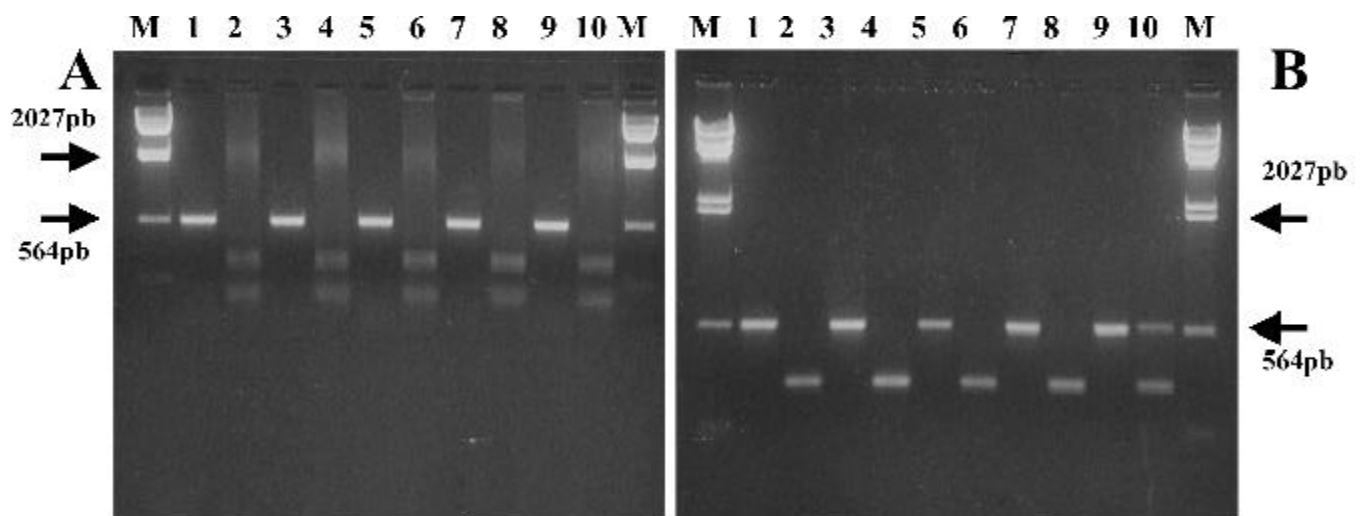


Figura 6. Produto de amplificação de DNA ribossomal, região intragênica ITS, de *Colletotrichum graminicola* digerido com as enzimas de restrição *Sau3A* I (A) e *EcoR* I (B). Os números 1, 3, 5, 7 e 9 e 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem aos isolados fúngicos F1, F2, F3, F4 e F5 sem digerir e digeridos, respectivamente. Não foram observadas diferenças visíveis no tamanho de DNA amplificado. M = marcador de peso molecular lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III (GIBCO/BRL).

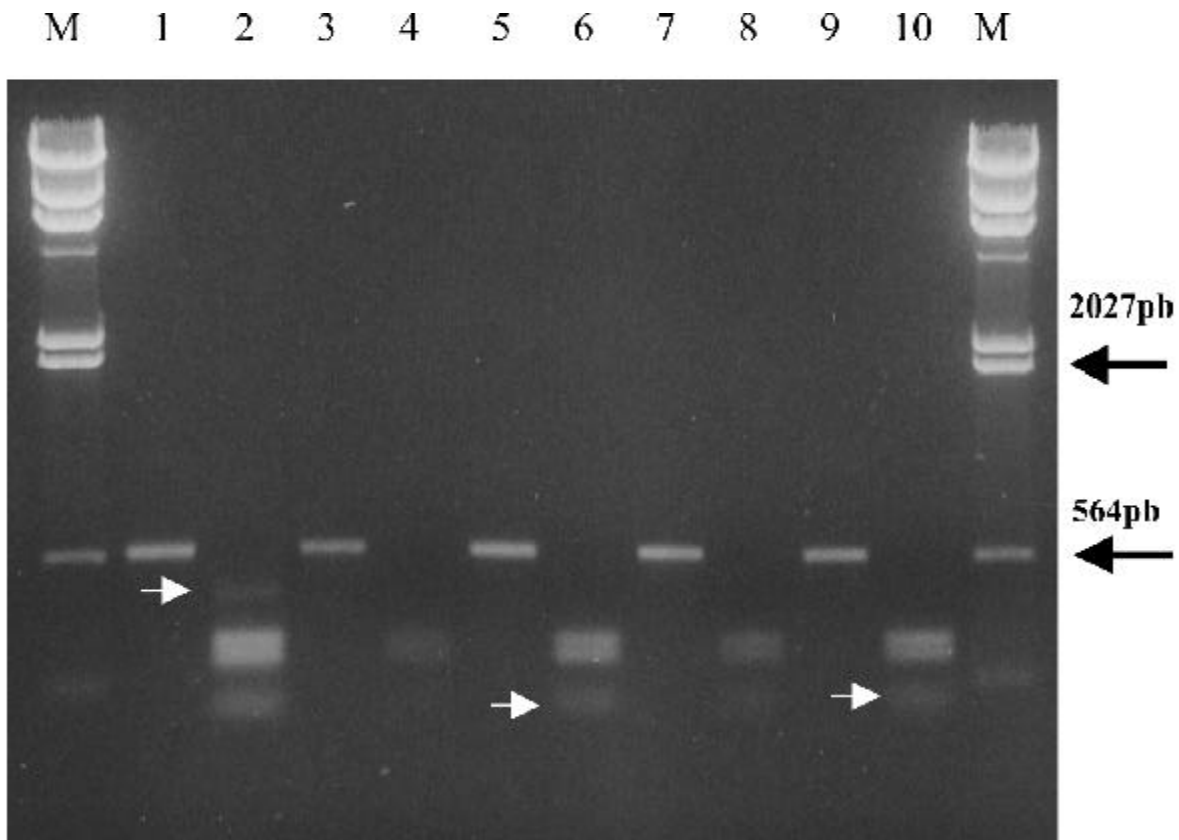


Figura 7. Produto de amplificação de DNA ribossomal de *Colletotrichum graminicola*, região intragênica ITS, digerido com enzima de restrição *Mbo* I. Os números 1, 3, 5, 7 e 9 e 2, 4, 6, 8 e 10 indicam DNA dos isolados fúngicos F1, F2, F3, F4 e F5 sem digerir e digeridos, respectivamente. O isolado F1 apresentou padrão de digestão diferente dos demais, enquanto que os isolados F2 e F4 apresentaram padrão similar mas diferente de F3 e F5, que foram também similares entre si. M = marcador de peso molecular lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III (GIBCO/BRL).

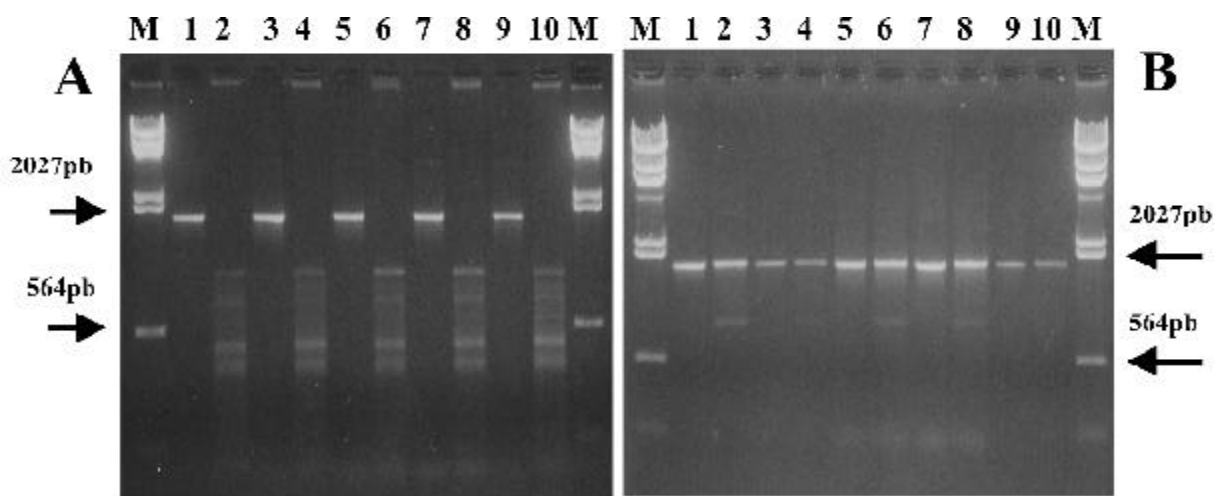


Figura 8. Produto de amplificação de DNA ribossomal, região 18S, de *Colletotrichum graminicola* digerido com enzimas de restrição *Sau*3A I (A) e *Eco*R I (B). Os números 1, 3, 5, 7 e 9 e 2, 4, 6, 8 e 10 indicam os isolados fúngicos F1, F2, F3, F4 e F5 sem digerir e digeridos, respectivamente. Não foram observadas diferenças visíveis no tamanho de DNA amplificado. M = marcador de peso molecular lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III (GIBCO/BRL).

```

F2 TTTTCTTCCGCTTATTGAAAAATGGTAAAGTT-CAGCGGGTTATTCTTACCTG-AT-CCGAGGTCAACC
F1 C.....G.....T.--.T...T.....G.....-.-.....
F3 .....T.--.C.TG...-.....-.....-.....-.....
F5 .....G.T.T.-A...T.G.....G..A.....A.
F4 .....CGG..G..C.T.A..-.....A..C.A.....-.-.....
-----10+-----20+-----30+-----40+-----50+-----60+-----70+

F2 AGTTAAAAGTTAGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCT-CCGGATCCCGATGCGAGACGTTAGTTACTACGC
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....-.....A.....-.....-.....-.....-.....-.....
F4 .....T.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....
-----80+-----90+-----100+-----110+-----120+-----130+-----140+
F2 AAAGGAGGCTCCG-GGAGGGTCCGCCACTACTTTTGAGGGCCTACGTCAACCGTAGTGCCCC-AACACCA
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....T.....-.....-.....-.....-.....-.....T.....
F4 .....-.....A.....-.....-.....-.....-.....-.....
-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200+-----210+
F2 AGCGAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGC
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F4 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
-----220+-----230+-----240+-----250+-----260+-----270+-----280+
F2 GTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTT-CTTCA
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....-.....-.....-.....-.....-.....A..A.....-.....
F4 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....
-----290+-----300+-----310+-----320+-----330+-----340+-----350+
F2 TCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTATTTGCTTGTGCCACTCAGAAGAAACGT
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F4 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
-----360+-----370+-----380+-----390+-----400+-----410+-----420+
F2 CGTTAAATCAGAGTTT-GGTTATCCTCCGGCGGGCGCCGCGACCCCTCCCGGAAGAAGAAGGCGCGGCCG
F1 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
F4 .....T.....-.....-.....-.....-.....T.....G.....C.....
-----430+-----440+-----450+-----460+-----470+-----480+-----490+
F2 GGAGGGCGTCCCCGGGGGGACCCCATACCCGCGCAAGCAACAGTTAGGTATGTTTACAAAGGGTTATAA
F1 ..A.....C.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F3 .....C.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F5 .....C.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
F4 ..A..C.....C.....C.....-.....-.....-.....-.....
-----500+-----510+-----520+-----530+-----540+-----550+-----560+

```

Figura 9. Alinhamento parcial das seqüências de rDNA, região intragênica ITS de *Colletotrichum graminicola*. Os pontos representam nucleotídeos idênticos aos nucleotídeos da primeira seqüência e os traços são "gaps", que foram introduzidos para possibilitar melhor alinhamento das seqüências. (ClustalW Multiple Sequence Alignment Results).

```

F1NS1          TATAAGCAATTATACAGCGAAAAC TGGCT-CATTATATAAGTTAT
F5NS1          ATCTAAG.....-.....
F4NS1 CGCACTTTCTAAG.....-.....
F2NS1
F3NS1 TGTCGGGATGGGTA..TT..GCGCC.G.T..CTTCCT..GATG.A.TAGC.G..TCTC.G..CC
-----10|-----20|-----30|-----40|-----50|-----60|-----

F1NS1 TATTTGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATCTAGAGCTAATACA-TGCTAAAAAC
F5NS1 .....-.....
F4NS1 .....-.....
F2NS1          G..CC...A..C.TCCC.TC.C...T...CCA.---...GA...C.A..CT.GCA
F3NS1 CGGGSTCG..C-...A..C-T.CC.T..C...T.T..CCA.---...GA...C.A..CT.GCA
-----80|-----90|-----100|-----110|-----120|-----130|-----

F1NS1 CTTCGGAAGGGGTGTATTTATTAGATTA AAAACCAATGCCCTT-CGGGGCTCACTGGTGATTCAT
F5NS1 .....-.....
F4NS1 .....-.....
F2NS1 AG.T.AT...AA.A.---...T..A.G.--...TA.A.GGCG.AA...-...-C....GG
F3NS1 AG.T.AT...AA.A.---...T..A.G.--...TC..GGCG.AA...-..T--C....G-
-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200+-----

F1NS1 CTTC TC--CAATCCCATGCCCTTCGCGCGGCGAIGGTCATTCAAATTCCTTCCCTATCAAC TTT
F5NS1 .....-.....
F4NS1 .....-.....
F2NS1 G..A.TAT....A.---C.AAC.A...CC...A..G-...GGTT...AA..CTA..A...ACA
F3NS1 G..A.TAT....A.---.AG..A...C...A..G-...GGTT...AA.. TA..A..TACA
-----220+-----230+-----240+-----250+-----260+-----270+-----

F1NS1 GCTAGAGTAGTG TCTAGCAIGGTTACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAA
F5NS1 .....-.....
F4NS1 .....-.....A.....
F2NS1 T.CCA...C.G.GT..T.....--..TT.--.C.
F3NS1 T.CCA...C.G.GT..T.....--..TT.--.C.CTA.A.TTACC.C..T.ATC.AAGTACT.
-----290+-----300+-----310+-----320+-----330+-----340+-----

```

Figura 10. Alinhamento parcial das seqüências de rDNA 18S de *Colletotrichum graminicola* amplificados com o iniciador NS1. Os pontos representam nucleotídeos idênticos aos nucleotídeos da primeira seqüência e os traços são "gaps", que foram introduzidos para possibilitar melhor alinhamento das seqüências. (ClustalW Multiple Sequence Alignment Results). O asterisco (*) indica o ponto em que o alinhamento passou a ser feito tomando por base seqüência de F4NS1.

```

F3NS8 AC---CGGAGCCAGCGAGTATTCCTTGGCCGGGAAGGCCCGGGTAATC---TACGTTAAACT-C
F4NS8 ..TGA.....C.....-.....T-.....-
F1NS8 C.GCAATT.TA.....AAC.G.GAA...TC--.TTATATAA..T...CGT.TAT.G.T.G.A.
F5NS8                AA...TC--.TTATATAA..T...GTT..TT.G.P.G.A.
F2NS8 .ATCAAC..TTNT.GATAAC.GT.KK.....A.-NT..NAATT.CCCA.CTCAT.TGG.GC..AT
-----10+-----20+-----30+-----40+-----50+-----60+-----

F3NS8 TGCTCCGGATACAGCCATAGCAATTATTGTTCTTCAACGAGC--AATCCNTAGTAAGCCCAAGTCA
F4NS8 .....T.....C.....--.....C.....
F1NS8 .A..T.....-C.G.G.T...C.A.AG...AT..AT.CTA..AA.CCC.ACTT..G..NGGG
F5NS8 .A..T...-...-C.G.G.T...C.A.AG..AAT..AT.CTA..AA.CCC.ACTT..G...GGG
F2NS8 .A.CTT.....A.C.G.GCT.T..C.A.AA..AAT.G.T..PATG.A.CCC.AGNT..G...G.
-----80+-----90+-----100+-----110+-----120+-----130+-----

F3NS8 CTTTGGCCTAGACCACGTCGG--TGCCCTTTGGTACACACCGCCCATCGCCTACTACCGA-TAGAAATG
F4NS8 .....T..TT.....--.....-1.....G.....-P.....
F1NS8 -.TAT...TT.AAAA.CAA.....C..GG.T...T.CTG..TCA..A..A.TTC.C...C
F5NS8 -.TAT...TT.AAAA.CAA.....GG.T...T.CTG..TCA..A..A.TTC.C...C
F2NS8 -.TAT...TT.AAAA.CAC.....C..GG.T.C.T.CTG.ATCA..A..A.TTC.CC.C.C
-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200+-----

F3NS8 GTTGAGCCCTTTCCGGAATGGCCCAAGAGAGGTGGGCAA
F4NS8 .....C.....--.....C-TC.C.CTC.CGGC.CG.A.T...CC
F1NS8 .CCTT..GCCC.CG...TT..TTC.A.TT.CTT.CCT-.T...CTTT.G..C.T...C..G...
F5NS8 .CCTT..GCCC.CG...TT..TTC.A.TT.CTT.CCT-.T...CTTT.G..G.T...G..G...
F2NS8 .CCTT.AAGCGA.TGT.A.TT..TTCCC.T.GCTT.CCGGATCAATGCCTATCCCAGACTACTCT
-----220+-----230+-----240+-----250+-----260+-----270+-----

F3NS8
F4NS8 .GGT....CA.A..AA....A.AC..A.
F1NS8 .....T.CA..
F5NS8 .....T.CC..C...T.CCA.C.....A...C.CG.
F2NS8 CATGCTCATTACGGGTAAAAGATCGTTACCGCTCCACCACCTA
-----290+-----300+-----310+-----320+-----330

```

Figura 11. Alinhamento parcial das seqüências de rDNA 18S de *Colletotrichum graminicola* amplificado com o iniciador NS8. Os pontos representam nucleotídeos idênticos aos nucleotídeos da primeira seqüência e os traços são "gaps", que foram introduzidos para possibilitar melhor alinhamento das seqüências. (ClustalW Multiple Sequence Alignment Results). O asterisco (*) indica o ponto em que o alinhamento passou a ser feito tomando por base seqüência de F2NS8.

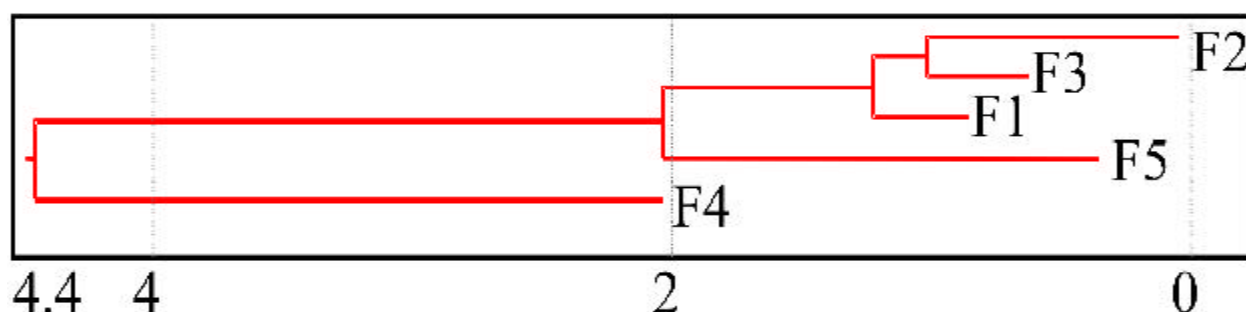


Figura 12. Dendrograma de similaridade de seqüências de rDNA entre cinco raças de *C. graminicola*. O dendrograma foi editado pela análise de seqüências de rDNA da região intragênica (ITS) e pelas seqüências NS1 e NS8 do gene 18S. Os números abaixo do dendrograma indicam o grau de dissimilaridade.

Conclusões

As diferenças observadas no perfil eletroforético de proteínas totais de *C. graminicola* não foram significativas e, portanto, não geraram informações suficientes para auxiliar na identificação das raças estudadas. Ao contrário, o resultado com RAPD-PCR revelou elevado grau de polimorfismo, possibilitando separar cada uma das cinco raças de *C. graminicola*. Os produtos da digestão dos DNAs ribossomais amplificados por PCR (ARDRA) também forneceram informações que possibilitaram identificar diferenças entre os isolados. Contudo, considerando o elevado custo e a necessidade de identificação de número maior de isolados, esse método não é indicado. Com relação aos resultados do seqüenciamento do rDNA, que também revelou diferenças entre as cinco raças de *C. graminicola*, foi verificado que as seqüências geradas forneceram informações úteis para diferenciação taxonômica entre as raças e poderão ser utilizadas, juntamente com outros métodos (RAPD, RFLP), para gerar etiquetas de DNA que servirão para identificação inequívoca de raças de *C. graminicola*. As diferenças entre os resultados de filogenia que foram obtidas com os dados do RAPD e com as seqüências de rDNA mostraram que é necessário cautela com esse tipo de informação quando o objetivo é estabelecer o grau de parentesco entre isolados.

Referências

- Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-684, 1970.
- Welsh, J.; McClelland, M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, London, v.18, p.7213-7218, 1990.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Williams, J.G.K.; Kubelick, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

Comunicado Técnico, 68

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Comitê de Publicações

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan Machado Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Expediente

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição
1ª impressão (2003) Tiragem: 200