

VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE
Phaeoisariopsis griseola

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

2007

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Phaeoisariopsis griseola*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Kaesel Jackson Damasceno e
Variabilidade entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola* /
Kaesel Jackson Damasceno e Silva. -- Lavras : UFLA, 2007.
153 p : il.

Orientadora: Elaine Aparecida de Souza
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Feijão. 2. Variabilidade patogênica 3. Mancha angular. 4. Anastomose. 5.
diversidade genética. 6. Estrutura genética. I. Universidade Federal e
Lavras. II. Título.

CDD-635.652934

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

VARIBILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Phaeoisariopsis griseola*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 29 de março de 2007

Prof. Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho UFLA

Profa. Dra. Silvia Nietsche UNIMONTES

Dra. Ana Lilia Alzate Marin USP

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por ser minha fonte inesgotável de força, paz, segurança e fé. Obrigado Senhor!

*À minha querida mamãe, **Rosiana**, às minhas irmãs,
Karine, Katherine e Karla, e aos meus queridos
sobrinhos, **Kaio e Samuel**.*

*A meus avós, **Antônio Gomes Damasceno** (in
memorian) e **Maria Benedita Pereira Damasceno**.*

OFEREÇO

*À minha esposa, **Elisa**, e ao meu filho, **Luis Felipe**.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me acompanhado dia-a-dia na luta pela felicidade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Arroz e Feijão, especialmente ao Pesquisador Dr. Aloízio Sartorato pela participação efetiva na execução deste trabalho.

À Professora Dra. Elaine Aparecida de Souza, orientadora, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso e pela participação na banca examinadora deste trabalho.

Ao Professor Dr. Magno Antônio Patto Ramalho, pela disponibilidade de participação na banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas sugestões para a melhoria deste.

À Professora Dra. Silvia Nietzsche e à Dra. Ana Lilia Alzate Marin pela participação na banca examinadora e incomensurável contribuição para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas: Ângela, César Brasil, Lisete Davide, João Cândido e Samuel, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao amigo Cassius, em especial, por ter colaborado efetivamente em todas as etapas da realização deste trabalho, além da sincera amizade.

À Professora Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes (UFPI), por mostrar-me que quando se persevera tudo é possível e por estar presente, orientando-me, em todos os momentos desta longa caminhada.

À Embrapa Meio-Norte, especialmente ao Dr. Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza, pela amizade e oportunidade de iniciar na pesquisa em uma instituição de grande credibilidade científica.

Aos amigos Angela, Maurisrael e Ida, pela amizade dedicada.

Ao Lamartine pela amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Zélia, Rafaela e, em especial, à Elaine, pela educação e disposição com a qual atende todos os alunos.

Aos companheiros do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças/UFLA: Cassius, Francine, Livia, Osnil e Quélen.

A toda minha família, sem a qual chegaria a lugar algum.

Aos amigos que hoje tenho como familiares: Francine, Helton, Livia, Marcelo (Jacaré), Nádia, Osnil, Rafael. Agradeço a vocês pelo companheirismo e espero, de coração, que nossa amizade se prolongue independente da distância.

A todos os amigos do GEN.

Aos amigos da velha república: Airton, Cristóvão Eduardo Lambert, Marco Aurélio, Vladimir e João Luís pela convivência e amizade.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT | iii |
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 2 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 6 |
| 2.1 Mancha Angular do feijoeiro | 6 |
| 2.2 Variabilidade patogênica de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> | 10 |
| 2.3 Marcadores genéticos | 21 |
| 2.3.1 Marcadores moleculares | 22 |
| 2.3.2 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos..... | 24 |
| 2.4 Estrutura genética de populações..... | 29 |
| 2.5 Análises multidimensionais | 31 |
| 2.5.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade..... | 31 |
| 2.5.2 Análises de agrupamento | 32 |
| 2.6 Anastomoses entre hifas | 34 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 39 |
| CAPÍTULO 2: VARIABILIDADE PATOGÊNICA ENTRE ISOLADOS DE <i>Phaeoisariopsis griseola</i> | 51 |
| RESUMO..... | 52 |
| ABSTRACT | 53 |
| 1 INTRODUÇÃO | 54 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 57 |
| 2.1 Identificação de patótipos de <i>P. griseola</i> | 57 |
| 2.1.1 Isolados do fungo..... | 57 |
| 2.1.2 Identificação de patótipos | 58 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 60 |
| 3.1 Identificação de patótipos de <i>P. griseola</i> | 60 |
| 4 CONCLUSÕES | 72 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |
| CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Phaeoisariopsis</i> <i>griseola</i> POR MEIO DE MARCADORES RAPD..... | 77 |
| RESUMO..... | 78 |
| ABSTRACT | 79 |
| 1 INTRODUÇÃO | 80 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 82 |
| 2.1 Isolados de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> | 82 |
| 2.2 Obtenção das culturas monospóricas | 84 |

| | |
|---|-----|
| 2.3 Obtenção de massa micelial..... | 84 |
| 2.4 Extração de DNA total..... | 85 |
| 2.5 Reação RAPD..... | 86 |
| 2.6 Estimativa das similaridades genéticas..... | 87 |
| 2.7 Análise de variância molecular..... | 89 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 92 |
| 3.1 Análise de marcadores moleculares..... | 92 |
| 3.2 Avaliação da variabilidade genética..... | 92 |
| 3.3 Diversidade genética..... | 100 |
| 3.4 Análise de variância molecular..... | 103 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 107 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 108 |
| CAPÍTULO 4: GRUPOS DE ANASTOMOSE ENTRE ISOLADOS DE | |
| <i>Phaeoisariopsis griseola</i> | 112 |
| RESUMO..... | 113 |
| ABSTRACT..... | 114 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 115 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 118 |
| 2.1 Isolados de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> | 118 |
| 2.2 Anastomoses entre hifas..... | 118 |
| 2.3 Análises estatísticas..... | 119 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 121 |
| 3.1 Análises das anastomoses..... | 121 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 127 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 128 |
| ANEXOS..... | 131 |

RESUMO

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Variabilidade entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola***. 2007. 153 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é responsável por perdas expressivas na produtividade do feijoeiro no Brasil. As perdas podem atingir 80% na produção, sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. A estratégia de controle mais eficiente é o emprego da resistência genética. No entanto, o sucesso do desenvolvimento de uma estratégia para controlar e ou reduzir o impacto do fungo *P. griseola* requer o entendimento dos níveis de variabilidade e o conhecimento prévio da estrutura populacional do patógeno. Devido à importância desta doença no estado de Minas Gerais e a elevada capacidade de variação patogênica deste fungo, o monitoramento constante desta variabilidade é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias apropriadas para a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno. Tradicionalmente, a elevada variação genética e patogênica apresentada pelo fungo *P. griseola* tem sido detectada pela utilização do conjunto de cultivares diferenciadoras e por meio de marcadores moleculares. Adicionalmente, pode-se levar em consideração a ocorrência de anastomose entre hifas como um caráter para a realização de estudos populacionais. Os objetivos deste trabalho foram: i) investigar a variabilidade patogênica entre isolados de *P. griseola* coletados no Estado de Minas Gerais; ii) estudar a diversidade genética e a estrutura genética de populações entre isolados de *P. griseola* coletados nos estados de Minas Gerais e Goiás, por meio de marcadores RAPD e iii) identificar a variação entre isolados do fungo *P. griseola*, coletados no estado de Minas Gerais, por meio de grupos de anastomoses. Foram identificados 10 patótipos diferentes entre os 48 isolados de *P. griseola*, evidenciando a elevada capacidade de variação patogênica deste fungo em Minas Gerais. Os patótipos 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 não haviam sido detectados neste estado. Todos os patótipos (63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) identificados neste estudo, exceto o patótipo 55-15, induziram reações compatíveis com todas as cultivares andinas e foram classificados como de origem mesoamericana. Os patótipos 63-31 (25%) e 63-63 (47,92%) foram identificados em maior frequência, sendo o patótipo 63-63 amplamente distribuído entre os locais estudados. O patótipo 63-63 quebrou a resistência de todos os genes presentes em todas as cultivares diferenciadoras. Observou-se a ocorrência de pontes de anastomose em forma de H, entre os 20 isolados estudados. Todos os isolados formaram anastomose,

porém, três isolados apresentaram 85% de compatibilidade, ou seja, foram compatíveis com 17 isolados. Este é o primeiro relato da ocorrência de anastomose entre hifas para o fungo *P. griseola*. Foi observada a formação de 16 grupos. Isolados pertencentes a grupos diferentes podem apresentar formação de anastomose entre hifas. Foi constatada elevada variabilidade para a ocorrência de anastomoses entre hifas e a ausência de agrupamento entre os isolados para a formação de anastomose demonstra a existência de variabilidade genética para os locos envolvidos com o controle deste caráter. A similaridade genética, calculada utilizando-se informação de marcadores RAPD, entre os 70 isolados de *P. griseola*, variou de 0,301 a 0,993, com média de 0,746. As análises descritivas revelaram tendência de diferenciação dos isolados por cidades de origem. A estimativa do índice de diversidade de Shannon revelou que as cidades de Viçosa-MG e Ijací-MG apresentaram, respectivamente, a maior e a menor diversidade genética. A diferenciação genética entre as populações estudadas foi de 0,1979 (G_{ST}). Portanto, 80,21% da variação deve-se à variação dentro das populações. A AMOVA demonstrou que 77,51% da variação está contida dentro de cidades e 22,49% entre cidades. Foi realizada uma comparação par a par dos 76 locos polimórficos estudados. Foram obtidos valores de desequilíbrio gamético significativos para as populações estudadas, mostrando que *P. griseola* mantém uma estrutura genética consistente com a reprodução assexual.

*Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

ABSTRACT

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. Variability among *Phaeoisariopsis griseola* isolates . 2007. 153 p. Thesis (Plant Genetics and Breeding Program) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) angular leaf spot, caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, is responsible for extensive yield losses of common bean in Brazil. Yield loss can reach up to 80% under disease favorable environmental conditions. Breeding for disease resistance is the most effective strategy to control the bean angular leaf spot disease. However, the successful development of a strategy to control and or reduce the impact of *P. griseola* requires an understanding of the levels of variability and previous knowledge of the population structure of the pathogen. Due to the importance of common bean angular leaf spot in Minas Gerais State and to the high magnitude of pathogenic variability of this fungus, monitoring the pathogenic variability of its causal agent becomes an important tool for the development of adequate strategies for a breeding program aimed at the development of resistant cultivars. Traditionally, the high pathogenic and genetic variation has been evaluated by differential cultivars and molecular markers. Besides, the anastomosis occurrence among hyphae can be taken into consideration as a trait for population studies. The aims of this work were: i) to investigate the pathogenic variability among *P. griseola* isolates collected in Minas Gerais state, Brazil; ii) to study the genetic diversity and population's structure among *P. griseola* isolates collected in Minas Gerais and Goiás state, Brazil, by RAPD markers and iii) to identify the variation among isolates of *P. griseola* fungus collected in Minas Gerais state, Brazil, by anastomosis groups. Ten pathotypes were identified among forty-eight isolates of *P. griseola* demonstrating the wide pathogenic variability of this fungus in Minas Gerais State. Pathotypes 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 had not been reported in this state. Pathotypes (63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) identified in this study, except the pathotype 55-15, induced compatible reactions with all andean cultivars and were classified as mesoamerican pathotypes. Pathotypes 63-31 and 63-63 were the most frequent, whereas pathotype 63-63 was the most widespread among the places studied. Pathotype 63-63 overcame resistance genes present in all differential cultivars. Anastomosis bridges were observed in H form among 20 isolates studied. Anastomosis were observed for all the isolates ones, however three isolates presented 85% compatibility, in other words, were compatible with 17 isolates. This is the first report of the anastomosis occurrence among hyphae for the *P. griseola* fungus. Sixteen anastomosis groups were observed. Isolates from different

groups can present anastomosis among hyphae. High variability for anastomosis occurrence among hyphae and absent clustering among isolates for formation of anastomosis among hyphae demonstrating the existence of genetic variability for loci involved with control this trait. The genetic similarity, obtained from RAPD markers, among the seventy isolates of *P. griseola*, varied from 0.301 to 0.993, with average of 0.746. The descriptive analyses revealed tendency of differentiation of isolates for origin areas. The Shannon diversity index revealed that Viçosa, MG and Ijaci, MG counties presented, respectively, the largest and the smallest genetic diversity. The genetic differentiation among the populations was 0.1979 (G_{ST} value). Therefore, 80.21% of the genetic variation observed in this study was due to differentiation within populations. AMOVA demonstrated that 77.51% of the variation was contained within counties and 22.49% among counties. Pairwise comparisons of 76 polymorphic RAPD loci gave disequilibrium values that were all significantly different from zero for studied populations, showing that *P. griseola* maintains a genetic structure consistent with asexual reproduction.

*Advisor: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a mais importante leguminosa consumida no mundo, sendo o Brasil o maior produtor (FAO, 2006) e consumidor mundial dessa leguminosa. Apesar de ocupar posição de destaque na produção mundial de feijão, a produtividade brasileira é baixa. No ano de 2006, a produção nacional de feijão foi de 3.406.478 t, numa área de 4.012.367 ha. A produtividade foi de 849 kg.ha⁻¹, tendo, na safra das águas, a produtividade sido de 1.997 kg.ha⁻¹, na safra da seca, de 724 kg.ha⁻¹ e, na safra de inverno, de 866 kg.ha⁻¹ (IBGE, 2007).

Independentemente do sistema de manejo adotado, estresses bióticos e abióticos representam as principais limitações para a alta produtividade desta cultura (Miklas et al., 2006). Dentre as principais causas da baixa produtividade da cultura estão as doenças fúngicas da parte aérea, entre as quais destacam-se a mancha-angular, a antracnose e a ferrugem (Sartorato, 2003; Vale et al., 1997), dependendo das condições ambientais e das cultivares em uso.

Por muito tempo, a mancha angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris., foi considerada uma doença secundária (Paradela Filho, 1972; Viera, 1974). No entanto, a partir de 1990, tem ocorrido com maior severidade (Dalla Pria et al., 1999; Ito et al., 2004; Hemp & Massignma, 2004; Sartorato et al., 1991) e, atualmente, ocupa lugar de destaque. É considerada uma das mais importantes doenças, em condições tropicais e subtropicais (Stenglein et al., 2003). As perdas na produção provocadas por ela podem chegar a 80%, dependendo das condições ambientais, da suscetibilidade das cultivares e do estágio de desenvolvimento da cultura (Liebenberg & Pretorius, 1997; Mahuku et al., 2002a). Adicionalmente, são registradas perdas de

qualidade das sementes e ou grãos e redução do valor de mercado e na disponibilidade de sementes (Pastor-Corrales et al., 1998).

O controle da doença pode ser realizado quimicamente, por meio de fungicidas, resultando na redução da rentabilidade, além de promover danos ao ambiente (Miklas et al., 2006). Em virtude deste fato, a utilização de cultivares resistentes ao patógeno, associada a boas práticas de manejo, constitui a melhor estratégia para o controle da mancha-angular devido à praticidade e à economia. Porém, o manejo adequado de doenças requer não apenas o desenvolvimento de cultivares mais resistentes, mas também que se encontrem formas de aumentar a durabilidade e a estabilidade desta resistência (Casela, 2002).

O desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular é dificultado pela elevada variabilidade patogênica apresentada pelo fungo *P. griseola*. O sucesso do desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular depende do entendimento dos níveis de variabilidade das populações do patógeno.

Tradicionalmente, a variação tem sido avaliada pela determinação do padrão de infecção dos isolados sobre um conjunto de cultivares diferenciadoras. A adoção de um sistema de nomenclatura padrão proposto por Pastor-Corrales & Jara (1995), permitiu uma comparação consistente dos dados obtidos por diferentes pesquisadores. No Brasil, mais de 50 patótipos já foram identificados (Sartorato & Alzate-Marin, 2004). Alternativamente, a variabilidade entre isolados de *P. griseola* tem sido avaliada por meio do uso de marcadores moleculares (Busogoro et al., 1999; Guzmán et al., 1995; Mahuku et al., 2002a; Nietzsche et al., 2001; Nietzsche et al., 2002; Pastor-Corrales et al., 1998; Sartorato, 2004; Stenglein & Balatti, 2006; Wagara et al., 2004) e tem sido verificada a ocorrência de ampla variabilidade genética. O conhecimento do nível de variabilidade entre os isolados pode determinar o sucesso de um programa de melhoramento, visando à obtenção de cultivares de feijão

resistentes à mancha-angular. Este conhecimento propicia a adoção de melhores estratégias que permitam o desenvolvimento de cultivares de feijão com resistência durável.

Os isolados de *P. griseola* podem ser agrupados em dois conjuntos gênicos, andino e mesoamericano. Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales et al. (1995) foram os pioneiros em revelar o processo de coevolução entre o patógeno e o conjunto gênico hospedeiro de acordo com o centro de origem. Ou seja, isolados de origem andina infectam cultivares do conjunto gênico andino e, isolados de origem mesoamericana infectam cultivares do conjunto gênico mesoamericano, mas possuem capacidade de infectar, também, cultivares de origem andina. O processo de coevolução entre patógeno e hospedeiro relaciona-se diretamente às estratégias de melhoramento a serem usadas para a obtenção de cultivares resistentes geneticamente ao patógeno (Miklas et al., 2006).

Devido à elevada variabilidade do fungo *P. griseola*, o sucesso de um programa de melhoramento que vise à obtenção de cultivares resistentes à mancha angular requer, sobretudo, o conhecimento da estrutura genética de populações de uma dada região. Tal conhecimento é crucial para determinar a adoção de estratégias para a obtenção de cultivares resistentes. Entretanto, no Brasil, não têm sido realizados estudos que objetive o conhecimento da estrutura populacional deste fungo.

Os mecanismos responsáveis pela produção do nível de variabilidade neste fungo não têm sido estudados. A recombinação parassexual é um possível mecanismo que pode estar gerando variação dentro de uma população de reprodução assexuada. O passo inicial para que ocorra a heterocariose é a formação de anastomoses entre hifas. A anastomose é a fusão entre hifas, que pode ser de dois tipos: em forma de H e adjacente. As anastomoses são importantes para comunicação intra-hifas e homeostase da colônia durante o

crescimento e a reprodução (Saupe, 2000), além de permitir a troca de material citoplasmático e genético (Roca, 2004). Alguns mecanismos genéticos atuam, impedindo a formação do heterocário (Glass et al., 2000).

Este trabalho teve por objetivos: i) verificar a diversidade patogênica e genética de isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais, bem como fornecer informações sobre a estrutura genética da população amostrada, para orientar os programas de melhoramento genético que visam ao desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular, e ii) identificar entre isolados do fungo *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais, variação por meio de grupos de anastomoses.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mancha-angular do feijoeiro

A mancha-angular é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, sendo o agente causal conhecido por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris. É um fungo imperfeito (Deuteromicotina) da classe Hiphomycete, ordem Moniliales, família Stilbaceae, descrito originalmente como *Isariopsis griseola*, por Saccardo em 1878 (Stenglein et al., 2003). Ferraris, em 1909, mostrou que o gênero *Isariopsis* Fr. Sacc. é idêntico ao gênero *Phaeoisariopsis* Nob. e renomeou o fungo como *Phaeoisariopsis griseola* (Stenglein et al., 2003). Este foi reconhecido por Ellis (1971) e o Instituto Internacional de Micologia (IMI) (Anonymous, 1986b). O nome *P. griseola* não foi inicialmente aceito (Hocking, 1967; Andersen, 1985) e, até meados da década de 1980, o patógeno ainda era denominado, por alguns pesquisadores, de *Isariopsis griseola* (Liebenberg & Pretorius, 1997).

Sob condições de campo, o patógeno produz, na face inferior da folha, sinêmios com diâmetro de 40 µm e um comprimento de 500 µm e são compostos por conidióforos paralelos e escuros e forma tufo visíveis a olho nu. No ápice de cada conidióforo são formados os conídios. Os conidióforos tendem a separar-se com a idade, quando iniciam a frutificação. Os conídios são hialinos com um a três septos, geralmente, podendo apresentar até cinco septos; apresentam-se sob a cor marrom, forma cilíndrica a fusiforme, e ligeiramente curvos; medem de 50 a 60 µm de comprimento e 5,5 a 8,0 µm de largura (Campos-Ávila, 1987; Zaumeyer & Thomas, 1957).

Os conídios podem germinar em três horas, sob condições de umidade. A germinação bipolar é mais comum, embora a germinação lateral, com três a

quatro tubos germinativos tenha sido observada. Os esporos infectam os tecidos das folhas, ao penetrar através dos estômatos. A penetração se completa em dois dias, sob condições ótimas. O micélio se desenvolve na cavidade subestomatal e, depois de quatro dias, coloniza o espaço intercelular entre o parênquima paliçádico. Os cloroplastos apresentam sinais de degradação três dias após a inoculação, seguidos por necrose das células guardas e das células do mesófilo adjacente; desintegração do parênquima paliçádico e, finalmente, a epiderme é destruída (Liebenberg & Pretorius, 1997). Segundo Campos-Ávila (1987), aos 19 dias, o fungo se desenvolve intracelularmente nas lesões necróticas; doze dias depois, na cavidade subestomática, o fungo desenvolve um estroma, do qual emergem os conidióforos que formam o sinêmio.

P. griseola é comum em *P. vulgaris*, tanto em variedades cultivadas quanto em silvestres. A doença também pode ser observada em *Phaseolus lunatus* L. (Campos-Avila & Fucikovsky, 1981). Cardona-Alvarez & Walker (1956) identificaram este fungo na cultura da soja (*Glycine max*) e Diaz et al. (1965) detectaram níveis baixos a moderados de infecção em folhas de caupí (*Vigna unguiculata*). Existem também relatos de lesões provocadas por *P. griseola* em *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus calcaratus* e *Phaseolus coccineus* (Campos-Ávila & Fucikovsky, 1980). Este fungo tem vários hospedeiros alternativos.

É importante enfatizar que outras espécies podem ser úteis como fonte(s) de resistência em programas de melhoramento para introgressão de genes. A existência de hospedeiros alternativos leva a implicações epidemiológicas. Hospedeiros alternativos e restos culturais são importantes fontes de inóculo (Sengooba & Mukiibi, 1986). Na ausência de hospedeiro vivo, o patógeno sobrevive sobre restos culturais, sob condições de campo, por tempo superior a 19 meses. O fungo sobrevive sobre a semente por nove ou doze meses (Liebenberg & Pretorius, 1997).

Toda a parte aérea é afetada, especialmente as folhas e vagens (Liebenberg & Pretorius, 1997). No entanto, em menor proporção, podem aparecer lesões nos caules, ramos e pecíolos. Nas folhas, as lesões variam de cinza-escuro a marrom e são freqüentemente delimitadas pelas nervuras, o que proporciona o aspecto angular. Sob condições de infecção severa, as lesões coalescem, causando o amarelecimento e o desfolhamento prematuro (Ferraz, 1980). Lesões nas folhas primárias tendem a ser circulares (Saettler, 1991). Nas vagens, as lesões são aproximadamente circulares, de coloração castanho-avermelhada. São de tamanho variável e, quando numerosas, cobrem toda a largura da vagem. A infecção pode se disseminar sobre as sementes, as quais se tornam coloridas e mal desenvolvidas e ou totalmente enrugadas. Nos caules, ramos e pecíolos, as plantas podem apresentar lesões alongadas de cor castanho-escuro (Saettler, 1991).

A doença pode ocorrer no estágio inicial de desenvolvimento da plântula, dependendo da disponibilidade de inóculo. Para iniciar uma epidemia de mancha-angular, são necessários esporos advindos de fora da lavoura/área experimental (Sartorato et al., 2005). Segundo Liebenberg & Pretorius (1997), como inóculo primário, podem atuar as sementes primárias, os restos de cultura e as lavouras também contaminadas. As próprias lesões que se desenvolvem nas plantas atuam como inóculo secundário. Os principais agentes de disseminação são chuvas, ventos, sementes e partículas de solo contaminadas (Cardona-Alvarez & Walker, 1956). A doença é favorecida por ambiente seco-úmido intermitente e temperaturas em torno dos 24°C (Brenes et al., 1983; Sartorato & Rava, 1992).

A ocorrência desta doença foi relatada em mais de 78 países (Liebenberg & Pretorius, 1997), incluindo África (Allen, 1995), América, Europa, Ásia, Austrália ou Oceania (Anonymous 1986a; Cardona-Alvarez, 1956; Zaumeyer & Thomas, 1957), com expressivas conseqüências econômicas (Stenglein et al.,

2003). Perdas de produtividade maiores que 50% foram detectadas na Índia (Singh & Sharma, 1976), 80% na Colômbia (Schwartz et al., 1981), 82% na Costa Rica (Wang et al., 1985) e de 51% a 70% no Brasil (Mora, 1983). Perdas devido à baixa qualidade da semente (sementes secas e murchas) podem ser consideráveis.

Estudos de herança revelaram que a resistência nas cultivares AND 277 (Carvalho et al., 1998), MAR 2 (Ferreira et al., 2000), Cornell 49-242 (Nietsche et al., 2000), Mexico 54 (Sartorato et al., 2000), BAT 332 (Caixeta et al., 2003), Ouro Negro (Corrêa et al., 2001) e G 10474 (Mahuku et al., 2004) é monogênica e condicionada por um alelo dominante. Herança monogênica controlada por alelos recessivos também foi relatada (Corrêa et al., 2001; Santos Filho et al., 1976).

Caixeta (2002) realizou testes de alelismo para verificar se os alelos de resistência presentes em cinco fontes de resistência estão presentes em um mesmo loco ou em locos distintos. Foi demonstrado que a cultivar Cornell 49-242 possui apenas um alelo (*Phg-3*); a cultivar AND 277 apresenta quatro alelos para resistência, denominados *Phg-1*, *Phg-2*², *Phg-3*² e *Phg-4*²; a cultivar México 54 apresenta três alelos (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*); a cultivar MAR 2 tem dois alelos (*Phg-4* e *Phg-5*²) e a cultivar BAT 332 apresenta a forma alélica *Phg-6*².

Portanto, o controle da resistência a *P. griseola* pode ser monogênico e ou oligogênico. Amaro et al. (2007) sugerem que vários genes podem estar envolvidos no controle da resistência à mancha-angular. Esses autores ao avaliarem a variabilidade entre linhagens de feijão para resistência à mancha-angular, observaram graduação nos sintomas observados entre as linhagens consideradas resistentes e atribuíram essa graduação ao efeito ambiental, enfatizando a possível existência de controle poligênico deste caráter (Amaro et al., 2007).

Têm sido desenvolvidas várias estratégias para tornar eficaz o controle da mancha-angular e, entre elas, salienta-se o uso de sementes sadias (livres do patógeno), a rotação de culturas, o uso de fungicidas e o emprego da resistência genética (Stenglein et al., 2003). O uso de cultivares resistentes destaca-se como a alternativa mais eficaz e de menor custo para o controle desta doença, além de não agredir o meio ambiente (Miklas et al., 2006). Para que esta estratégia seja usada, é necessário o conhecimento da variabilidade patogênica apresentada pelo fungo no(s) local(is) em que será(ão) desenvolvida(s) a(s) cultivar(es).

2.2 Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola*

As diferentes reações (resistência e suscetibilidade) apresentadas por uma cultivar em diferentes regiões caracteriza a hipótese da existência de diferentes patótipos do patógeno. Este fato torna-se mais evidente quanto maior for a diferença entre a resistência e a suscetibilidade manifestada pelas cultivares (Sartorato, 1989).

O fungo *P. griseola* possui ampla variabilidade de virulência, o que justifica o elevado número de patótipos existentes e a complexidade no emprego da resistência genética. Dessa forma, torna-se essencial o monitoramento constante deste patógeno e a busca de novas fontes de resistência e, conseqüentemente, promove-se o desenvolvimento de novas cultivares resistentes de feijão, com o propósito de controlar a doença.

Vários pesquisadores descreveram a variabilidade entre isolados de *P. griseola* de diferentes áreas ao redor do mundo. Brock (1951), ao estudar a resistência de variedades de feijão ('Brown Beauty', 'Stringless Black Calentine', 'Pinto' e 'Red Mexican') à mancha-angular, observou que treze isolados australianos apresentaram diferentes padrões de virulência. Embora tais resultados tenham sido questionados, pois os autores não utilizaram cultura

monospórica, eles ressaltaram pioneiramente, a ocorrência de variabilidade entre os isolados, alertando para o perigo de utilização de apenas uma cultivar em um dado campo de produção.

Outro trabalho de destaque foi conduzido por Marin-Villegas (1959) na Colômbia, visando identificar uma possível variabilidade de *P. griseola*. Neste estudo, realizado com 14 cultivares diferenciadoras de feijão e 30 linhagens do patógeno, resultou no agrupamento de 13 patótipos distintos.

Uma vez constatada tal variabilidade, inúmeros trabalhos foram conduzidos, empregando diferentes cultivares diferenciadoras, reafirmando a amplitude desta variabilidade e a existência de fontes de resistência. Entre os trabalhos realizados, podem ser citados os de Alvarez-Ayala & Schwartz (1979), Buruchara (1983), Correa & Saettler (1986), Correa-Victoria (1987), Pyndji (1992), Sartorato & Rava (1984), Sartorato et al. (1991), Wagara et al (1995). Igualmente, estes estudos relataram a existência de elevada variabilidade e a inadequação e a insuficiência das cultivares diferenciadoras para a discriminação dos patótipos.

Os trabalhos supracitados demonstram que o fungo, *P. griseola*, possui ampla variabilidade patogênica, sendo indispensável a utilização de uma metodologia padrão para a identificação e a denominação de patótipos. Depreende-se claramente que, até meados da década de 1990, não havia uma padronização no uso das cultivares diferenciadoras, impossibilitando a comparação de resultados de avaliação de cultivares de diferentes regiões, dificultando a permuta de fontes de resistência e a verificação da real dinâmica populacional do patógeno.

Na tentativa de padronização dos métodos de determinação da variabilidade de *P. griseola*, foi realizado, no ano de 1995, no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia, o “I Taller International sobre la Mancha Angular del Frijol Comum”. Nesta reunião, ficou

instituído o conjunto de doze cultivares diferenciadoras, das quais seis são de origem andina e seis de origem mesoamericana. Estas cultivares foram selecionadas após testes preliminares realizados no CIAT (Pastor-Corrales & Jara, 1995). Para a denominação do patótipo, foi proposta a utilização do método de Habgood (1970), que consiste no uso do grupo de cultivares diferenciadoras em ordem pré-estabelecida, utilizando um método binário e obtido por expansão binomial, de tal forma que o nome do patótipo é um número. Esse sistema, combinado com as duas classes de resposta à infecção (resistência ou suscetibilidade), permite classificar um total de $2^d = 2^{12} = 4096$ patótipos, em que “d” é o número de linhagens diferenciadoras.

O Quadro 1 apresenta exemplo hipotético, cujo isolado foi classificado como patótipo 31-23. Os números 31 e 23 fazem alusão ao somatório dos valores binários referentes às cultivares andinas e mesoamericanas, respectivamente, com as quais o isolado apresentou reação de compatibilidade.

O uso desta metodologia, internacionalmente reconhecida, tem contribuído consideravelmente para a eficácia dos programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular. Entre os benefícios, destacam-se o intercâmbio de germoplasma e a permuta de informação entre os pesquisadores de diversas partes do mundo.

Trabalhos pioneiros realizados por Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales & Jara (1995) relataram, a ocorrência do processo de coevolução patógeno-hospedeiro. Aparício (1998) estudou 66 isolados provenientes de oito estados brasileiro (Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rondônia e Santa Catarina) e verificou a ocorrência de 30 patótipos diferentes entre os isolados estudados, sendo os patótipos 15-39, 31-23, 63-23 e 63-31, os mais frequentes. O resultado deste trabalho indicou apenas a ocorrência de isolados do conjunto gênico mesoamericano.

QUADRO 1 Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro para a caracterização de patótipos de *Phaeoisariopsis griseola*, conjunto gênico e seus valores binários.

| | Cultivares diferenciadoras | Conjunto gênico | Série binomial | Valor binário | Reação ^a |
|----------|----------------------------|-----------------|----------------|--------------------|---------------------|
| A | Don Timóteo | Andino | 2 ⁰ | 1 | C |
| B | G 11796 | Andino | 2 ¹ | 2 | C |
| C | Bolón Bayo | Andino | 2 ² | 4 | C |
| D | Montcalm | Andino | 2 ³ | 8 | C |
| E | Amendoin | Andino | 2 ⁴ | 16 | C |
| F | G 5686 | Andino | 2 ⁵ | 32 | I |
| G | Pan 72 | Mesoamericano | 2 ⁰ | 1 | C |
| H | G 2858 | Mesoamericano | 2 ¹ | 2 | C |
| I | Flor de Mayo | Mesoamericano | 2 ² | 4 | C |
| J | México 54 | Mesoamericano | 2 ³ | 8 | I |
| K | BAT 332 | Mesoamericano | 2 ⁴ | 16 | C |
| L | Cornell 49-242 | Mesoamericano | 2 ⁵ | 32 | I |
| Patótipo | | | | 31-23 ^b | |

^a C: reação compatível; I: reação incompatível.

^b Exemplo hipotético

Pastor-Corrales et al. (1998) caracterizaram 316 isolados de *P. griseola* oriundos de onze países da América Latina e dez países da África, com base no conjunto de doze cultivares diferenciadoras, e observaram que 82 são andinos, 193 mesoamericanos e 41 são de origem desconhecida. Embora os isolados de *P. griseola* tenham apresentado considerável variação entre e dentro de países, foi possível classificá-los em dois grupos principais, andino e mesoamericano. Os autores discutiram sobre a origem dos isolados e sugeriram que isolados de

P. griseola co-evoluíram com o feijão e que, em geral, isolados de origem mesoamericana são mais virulentos que os de origem andina. Esta informação é importante para realizar um eficiente e econômico processo de seleção de germoplasma para resistência durável à mancha-angular.

Pastor-Corrales et al. (1998) realizaram também a avaliação de 22.832 acessos de *P. vulgaris* do CIAT, em experimentos de campo e casa de vegetação, e verificaram que apenas 59 foram classificados como intermediários (notas de 4 a 6) e 64 foram considerados resistentes (notas de 2 a 3), nos ensaios de campo. Entre estes 123 acessos que foram classificados como intermediários ou resistentes em campo, somente 19 mostraram reações similares quando testados em casa de vegetação, os quais se constituíram em valiosas fontes de germoplasma para serem utilizados em trabalhos futuros. Os autores enfatizam que os dois tipos de ensaios realizados simultaneamente fortalecem as conclusões sobre a resistência dos acessos.

Busogoro et al. (1999) coletaram 54 isolados de *P. griseola*, tendo 44 sido coletados na região dos Grandes Lagos da África e outros 10 foram coletados no Brasil e na Colômbia. A caracterização da virulência foi realizada com base em 29 genótipos, os quais consistiam de 17 genótipos de *P. vulgaris*, 6 acessos de *P. coccineus* e 6 acessos de *P. polyanthus*. Foi observado um total de 53 padrões de virulência diferentes, além de diferenças entre os padrões de virulência, mesmo quando os isolados tinham uma origem comum. É importante ressaltar que, neste trabalho, não são conhecidos os genes de resistência das cultivares utilizadas para verificar a diferença entre os isolados, o que dificulta a interpretação destes dados em termos de estrutura de populações. Os autores propuseram que a diversidade dentro das populações do patógeno deve-se à existência de diferentes mecanismos, incluindo mutações pontuais, migração e recombinação sexual. Padrões RAPD similares encontrados entre isolados coletados de diferentes origens geográficas sugerem a ocorrência de migração.

Para um patógeno de reprodução sexual desconhecida, a diversidade observada não pode ser atribuída à recombinação sexual. Mutações pontuais, algumas aberrações cromossômicas (deleções, translocações e perdas cromossômicas) e a presença de transposons (Kempler & Kück, 1998) podem incrementar a variabilidade.

Jara et al. (2001) realizaram levantamento de 419 isolados de *P. griseola* em 22 países do mundo e observaram a ocorrência de 120 patótipos distribuídos em dois grandes grupos, andino e mesoamericano. A análise de diversidade demonstrou que Brasil, Colômbia, Costa Rica e Honduras apresentaram os mais altos índices de diversidade da América Latina. Observaram também que a cultivar diferenciadora G5686 (Andina) foi a mais resistente e concluíram que esta cultivar deve ser considerada como fonte de resistência em um programa de melhoramento em combinação com outros genes, principalmente os de origem mesoamericana, para otimizar o potencial de resistência estável. Estes autores ressaltaram a importância do monitoramento permanente das variações na estrutura populacional do patógeno, devido à alta dinâmica populacional de *P. griseola*.

No Brasil, já foram realizados levantamentos em vários estados. Em levantamento feito por Nietsche et al. (2001), em Minas Gerais, foi avaliada a diversidade genética de 30 isolados de *P. griseola*. Treze patótipos foram identificados, o que demonstra a alta variabilidade do fungo nas regiões amostradas em Minas Gerais. Dois isolados coletados em Lavras, região sul do estado, infectaram todas as variedades da série diferenciadora, classificada como o patótipo 63-63. O patótipo 63-23 foi o mais freqüente (dez isolados), estando amplamente distribuído nas regiões estudadas, devendo ser, portanto, incluído no processo de seleção para a identificação de fontes de resistência. Este trabalho sugeriu que o conjunto de cultivares diferenciadoras é limitado e que existe necessidade de incorporação de novas fontes de resistência. A cultivar

Mexico 54 foi identificada como uma possível fonte de resistência para o estado de Minas Gerais.

Mahuku et al. (2002a) estudaram 112 isolados de *P. griseola* coletados na América Central e, adicionalmente, 25 isolados (6 do Equador e 19 da Colômbia) foram incluídos para elucidar as relações entre isolados deste fungo. Foi evidenciada a ocorrência de 50 patótipos diferentes entre os isolados coletados na América Central, enquanto 14 patótipos foram identificados entre os 25 isolados andinos do Equador e da Colômbia. Nenhum dos patótipos representou mais de 10% da amostra dos isolados e a maioria foi representada por apenas um isolado. Os patótipos que ocorreram em maior frequência foram 31-47, 31-31, 31-43 e 63-47. Importante ressaltar também a ocorrência do patótipo 63-63 em dois países.

Ao estudarem 131 isolados de *P. griseola* coletados no continente africano e na América Latina, Mahuku et al. (2002b) verificaram a presença de alta variabilidade patogênica caracterizada por 67 patótipos, dos quais ocorreram 34 patótipos de origem mesoamericana e 14 foram tipicamente de origem andina. Adicionalmente, 19 patótipos foram descritos como afro-andinos, devido a sua capacidade de infectar as cultivares Pan 72, Flor de Mayo ou Cornell 49242, de origem mesoamericana.

Ao estudar a variabilidade genética da patogenicidade de *P. griseola* no Brasil, Nietsche et al. (2002) identificaram 26 patótipos diferentes entre os 72 isolados estudados. Os patótipos mais frequentes foram: 63-31, 63-23, 63-55, 63-39 e 63-47. Entre os isolados obtidos no município de Lavras, MG, foi observada a ocorrência dos patótipos 31-7, 31-33, 31-39, 63-7, 63-23, 63-31, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63. Neste trabalho, foi evidenciada também a predominância de isolados pertencentes ao conjunto gênico mesoamericano.

Sartorato (2002) estudou 51 isolados de *P. griseola* coletados nos estados de Santa Catarina, Paraná, Goiás, Minas Gerais e Paraíba, com o

objetivo de identificar patótipos para posterior utilização nos programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à mancha angular. Foram identificados sete patótipos diferentes (31-23, 55-31, 63-15, 63-23, 63-31, 63-39 e 63-63), os quais foram isolados de cultivares de feijoeiro que apresentavam sementes com tamanho médio ou pequeno e induziram reações de compatibilidade com as diferenciadoras andinas e mesoamericanas, portanto sendo classificadas como pertencentes ao conjunto gênico mesoamericano. O patótipo que apresentou maior distribuição geográfica foi o 63-31, além de ter sido o patótipo que ocorreu em maior frequência (25 isolados), seguido pelo patótipo 63-63 (20 isolados). A ocorrência do patótipo 63-63 é um indicativo da necessidade de busca constante por novas fontes de resistência. Ao inocular o patótipo 63-63 sobre a cultivar AND 277, ocorreu a subdivisão deste patótipo em dois grupos diferentes de patogenicidade; um deles supera a resistência genética da cultivar AND 277 e o outro grupo não consegue “quebrar” a resistência desta cultivar (Sartorato, 2002).

Pastor-Corrales et al. (2004), na tentativa de identificar diversidade de virulência no Sudeste e Leste da África, caracterizaram 15 isolados e observaram a ocorrência de nove patótipos diferentes. Neste levantamento, foi observada a presença de patótipos de origem andina e mesoamericana.

Ao analisar a variabilidade patogênica de isolados de *P. griseola* em dois municípios (Inhumas e Damolandia) do estado de Goiás, Brasil, Sartorato (2004) verificou a ocorrência de 13 patótipos diferentes, entre os 96 isolados estudados. O patótipo 63-31 foi o mais frequente, seguido pelos patótipos 63-63, 63-15 e 63-23. Foi também verificado que as cultivares Cornell 49-242 (mesoamericana) e AND 277 (andina) foram as mais resistentes e podem ser importantes para o desenvolvimento de novas cultivares de feijão com resistência à mancha angular.

Informações valiosas aos programas de melhoramento que visem à obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular foram fornecidas por Sartorato & Alzate-Marin (2004). Os autores realizaram levantamento, na literatura, dos trabalhos publicados sobre a diversidade de virulência de isolados de *P. griseola* identificados no Brasil, entre os anos de 1996 e 2002. Foi possível observar a ocorrência de 51 patótipos diferentes e que os patótipos 31-39, 63-31, 63-23, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63 são os de ocorrência mais freqüente e de distribuição ampla. Os estados de Goiás (25 patótipos) e Minas Gerais (20 patótipos) foram os que apresentaram maior variabilidade, respectivamente. A maioria dos patótipos ocorre em apenas um estado, evidenciando a necessidade da realização do estudo da diversidade de virulência local. As cultivares Mexico 54, Cornell 49-242 e BAT 332 se apresentaram com maior nível de resistência, sendo incompatíveis com 36, 27 e 23 patótipos de *P. griseola*, respectivamente. A associação dos alelos presentes nessas três fontes de resistência confere resistência a 50 patótipos, exceto ao patótipo 63-63, sugerindo um possível programa de melhoramento que priorize a piramidação de alelos de resistência. As cultivares andinas G5686 e Amendoim são também importantes fontes de resistência.

Wagara et al. (2004a) caracterizaram a diversidade de virulência presente no Kenya e verificaram que, entre os 100 isolados coletados em campo de produção, ocorriam 44 patótipos diferentes. Os autores classificaram os isolados em três grupos de virulência: andino (13 isolados), mesoamericano (70 isolados) e afro-andino (17 isolados). Estes autores denominam isolados andinos como aqueles que infectam apenas cultivares andinas, enquanto isolados afro-andinos infectam, principalmente, cultivares andinas mais uma ou duas cultivares mesoamericanas. Isolados mesoamericanos, por outro lado, infectam, principalmente, cultivares mesoamericanas, mas também infectam cultivares andinas. Estes autores ressaltam a importância do desenvolvimento de cultivares

de feijão com resistência durável à mancha-angular para a adoção de estratégias para um manejo integrado da doença, especialmente para pequenos agricultores, os quais disponham de recursos limitados.

Orozco & Araya (2005), objetivando estudar a variabilidade patogênica do fungo *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica, para orientar programas de melhoramento genético que visem à obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular, coletaram 61 isolados em diferentes campos de produção e observaram a ocorrência de 21 patótipos diferentes. Verificaram, ainda, que 19 patótipos infectaram cultivares diferenciadoras mesoamericanas e 17 patótipos infectaram ambos os grupos de cultivares diferenciadoras (andinas e mesoamericanas). Segundo os autores, a diversidade patogênica encontrada nos isolados de *P. griseola*, na Costa Rica, é produto da diversidade intrínseca das populações do hospedeiro. Os autores propõem que as fontes de resistência à mancha-angular devam ser selecionadas com a utilização de patótipos mais frequentes e mais virulentos em germoplasma mesoamericano. As diferenças encontradas na estrutura populacional do fungo, nos diferentes países, tornam necessária a avaliação de germoplasma em cada região e sob diferentes condições ambientais. Neste trabalho, foi sugerida, como estratégia para obter resistência durável, a piramidação de genes em cultivares comerciais bem adaptadas.

Vital et al. (2005) testaram a patogenicidade de isolados de *P. griseola* para posterior classificação em patótipos e verificaram que, entre os 25 isolados testados nas cultivares IAC-Carioca e IAC-Maravilha, 20 isolados apresentaram alta virulência e verificaram que a área foliar afetada foi de 80% e 5 isolados afetaram apenas 1% da área foliar. Segundo os autores, embora os isolados não tenham sido classificados quanto à variabilidade patogênica, foi possível constatar a existência de patótipos.

Stenglein et al. (2005) e Stenglein & Balatti (2006) estudaram a variabilidade patogênica entre 45 isolados de *P. griseola* coletados em campos

de produção do noroeste da Argentina e observaram a ocorrência de doze patótipos diferentes entre os isolados estudados. Os patótipos mais freqüentes foram 63-15 e 63-63. Neste trabalho, os autores identificaram patótipos de origem andina (oito isolados) e mesoamericana (37 isolados) coexistindo em um mesmo local. Além disso, verificaram que o nível de diversidade entre os grupos é similar. Observação importante foi feita por esses autores ao perceberem que, em diferentes lesões em uma mesma folha da cultivar “NAG12” foram encontrados patótipos diferentes e, também, de origens diferentes (63-15, 63-31, 14-0 e 30-0) o que promove o incremento das chances de ocorrência de eventos de recombinação.

Garcia et al. (2006) estudaram 96 isolados de *P. griseola* obtidos em campo experimental no estado de Goiás. Estes autores verificaram a ocorrência de sete patótipos diferentes (31-55, 63-23, 63-31, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63), tendo o 63-63 sido o mais freqüente (40,63%). Além disso, foi verificada também a ocorrência de mais de um patótipo em uma mesma lesão, o que é denominado de processo de infecção múltipla.

Vital (2006) verificou a ocorrência de seis patótipos distintos (16-4, 31-15, 31-47, 39-63, 63-15 e 63-47) ao inocular, no conjunto de doze cultivares diferenciadoras, sete isolados obtidos de diferentes municípios do estado de São Paulo. O patótipo 31-15 foi identificado a partir de isolados provenientes dos municípios de Mogi-Guaçu e Pinhalzinho; os patótipos 16-4 e 39-63 foram oriundos de genótipos do município Capão Bonito; os patótipos 31-47 e 63-47 foram provenientes de genótipos do município Ribeirão Branco, e o patótipo 63-15 foi procedente de coleta realizada no município de Itapetininga. Neste trabalho é notória a especialização de cada patótipo por local (hospedeiros), ressaltando que o monitoramento deve ser realizado por local para que as estratégias de controle sejam adotadas eficientemente.

O uso de cultivares diferenciadoras para discriminar a variabilidade patogênica é amplamente difundido. Adicionalmente, tem sido proposto o uso de marcadores genéticos, no intuito de proporcionar uma melhor visualização dos componentes de variabilidade existente na população e, conseqüentemente, verificar a estrutura genética populacional.

2.3 Marcadores genéticos

Robinson (1998) definiu marcadores genéticos como características qualitativas com herança mendeliana simples e que são facilmente reconhecidas. Por meio dos marcadores genéticos é possível realizar comparações genotípicas, e estudos genéticos, já que eles permitem verificar a herança de caracteres, ajudam na construção de mapas genéticos e permitem estudar a relação entre os genótipos.

Por muito tempo, a principal classe de marcadores utilizada foi a classe de marcadores morfológicos. Os estudos de genética e melhoramento eram realizados com base em genes associados a caracteres morfológicos, de fácil identificação visual. Entretanto, estes ocorrem em número reduzido, limitando a sua utilização (Ferreira & Grattapaglia, 1998), além de estarem sujeitos à forte influência ambiental, mascarando o fenótipo. Estes marcadores foram usados por naturalistas para identificação, descrição e classificação dos seres vivos (Mühlen et al., 2000). Além disso, proporcionaram o desenvolvimento das teorias de Mendel, as teorias sobre ligações gênicas e para a construção dos primeiros mapas genéticos (Steiner & Greene, 1996).

O desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, seguido do advento das técnicas modernas de biologia molecular, proporcionou uma verdadeira revolução nos estudos de genética. Estas técnicas possibilitaram o surgimento de métodos variados para a detecção de polimorfismo genético, diretamente no

DNA (marcadores de DNA) e o número de marcadores genéticos aumentou substancialmente, possibilitando a sua aplicabilidade a todas as espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.3.1 Marcadores moleculares

A descoberta das enzimas de restrição proporcionou uma revolução na biologia molecular, resultando no desenvolvimento de técnicas que podem fornecer um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos para qualquer organismo vivo. Os distintos tipos de marcadores moleculares disponíveis distinguem-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade no âmbito de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (“Restriction Fragment Length Polymorphism” – RFLP) (Grodzicker et al., 1974). Mais tarde, o surgimento da técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) levou a um grande avanço da biologia molecular. A técnica de PCR consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos de DNA utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de seqüência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo em ciclos repetidos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma via PCR causou grande impacto, visto que tornou possível a detecção de DNA a olho nu, diretamente em gel de eletroforese por meio de corantes específicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Igualmente, estes marcadores apresentam a vantagem de identificar elevado nível de polimorfismo e são, geralmente, neutros em relação a efeitos ambientais, com mínimo ou nulo

efeito epistático ou pleiotrópico, possibilitando também a identificação de genótipos em estágios precoces de desenvolvimento.

Entretanto, a técnica de PCR apresentava uma importante limitação: a construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia, essencialmente, do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse, havendo, então, a necessidade da clonagem e seqüenciamento da região (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Essa limitação foi superada quando Welsh & McClelland (1990) e Williams et al. (1990) descreveram que os produtos genômicos amplificados por *primers* arbitrários poderiam ser usados como marcadores genéticos. A técnica desenvolvida por Williams et al. (1990) foi denominada RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), e tornou-se, em pouco tempo, a técnica de marcadores moleculares mais popular. Ela vem sendo utilizada em vários estudos, como na estimação de variabilidade genética, identificação de alelos favoráveis e construção de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD têm contribuído substancialmente com os programas de melhoramento, por meio da identificação de polimorfismos e de alelos de resistência a doenças em feijoeiro (Caixeta et al., 2003; Ferreira et al., 2000; Nietsche et al., 2000), e na virulência e diversidade genética em *P. griseola* (Boshoff et al., 1996; Busogoro et al., 1999; Guzmán et al., 1999; Nietsche et al., 2001; Nietsche et al., 2002; Mahuku et al., 2002a; Mahuku et al., 2002b; Stenglein & Balatti, 2006; Wagara et al., 2004b).

Metodologias variadas (isoenzimas, RFLP, RAPD e AFLP) têm sido usadas para a detecção de variabilidade genética. Em geral, os resultados das análises por isoenzimas e RFLP têm mostrado alta repetibilidade, porém, têm revelado baixos níveis de polimorfismo. Resultados das análises de RAPD têm revelado elevado nível de polimorfismo e baixa repetibilidade dos resultados (Hosokawa et al., 2000). A técnica RAPD, no entanto, apresenta uma série de

vantagens em relação aos demais métodos, que tornam o seu uso bastante viável e popular. Dentre essas vantagens estão a rapidez, o baixo custo e a necessidade de pouco material.

Historicamente, a variabilidade genética do fungo *P. griseola* tem sido estudada por meio da inoculação em cultivares diferenciadoras. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que o conjunto de cultivares diferenciadoras padrão não é suficiente para estimar tal variabilidade (Sartorato, 2004; Sartorato & Alzate-Marin, 2004; Stenglein et al., 2005; Stenglein & Balatti, 2006; etc.). Tal método, leva em conta somente o caráter patogenicidade, representando apenas uma diminuta fração do genoma do patógeno. Este caráter pode, ainda, sofrer forte pressão de seleção, devido às variações do hospedeiro e patógeno, sendo necessário o uso de outras ferramentas que possibilitem o estabelecimento de informações mais detalhadas sobre a estrutura populacional do patógeno.

2.3.2 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos

A análise da estrutura populacional de um patógeno, visando ao estabelecimento de inferências evolutivas, pode ser melhor visualizada se forem utilizados marcadores genéticos seletivamente neutros (RFLP, RAPD, AFLP e etc.). Isso porque eles fornecem informações sobre todo o genoma, além de não sofrerem variações ambientais, tornando, assim, o estudo mais conciso (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar e estudar o grau de divergência genética de patótipos de *P. griseola*, por meio de marcadores moleculares (Busogoro et al., 1999; Guzmán et al., 1995; Mahuku et al., 2002a; Pator-Corrales et al., 1998; Sartorato, 2004).

Marcadores RAPD foram utilizados para caracterizar 62 isolados de *P. griseola* de três países, Malawi, Estados Unidos e Brasil (Guzmán et al., 1995).

Onze *primers* geraram polimorfismo e dividiram os isolados de *P. griseola* em dois grupos principais. Isolados do grupo 1 (andinos) foram geralmente encontrados em materiais do conjunto gênico andino, ao passo que os isolados do grupo 2 (mesoamericanos) foram encontrados em materiais do pool gênico mesoamericano. Este trabalho foi o primeiro a revelar a ocorrência da coevolução patógeno-hospedeiro. Em áreas nas quais são cultivados genótipos mesoamericanos e andinos podem ser encontrados isolados híbridos (mesoamericanos e andinos). A presença de isolados híbridos sugere a existência de um mecanismo de recombinação, talvez parassexualidade (Guzmán et al., 1995).

Objetivando estudar a variabilidade genética de 28 isolados de *P. griseola* por meio de marcadores isoenzimáticos, Boshoff et al. (1996) identificaram treze locos em dez sistemas enzimáticos. Todos os locos foram polimórficos, exceto para ACP (fosfatase ácida), que apresentou monomorfismo. Os autores observaram uma baixa variabilidade deste patógeno. Dada a uniformidade dos padrões eletroforéticos exibidos, foi descartada a utilização da análise de isoenzimas para detectar características específicas de virulência. Os autores sugerem que outras técnicas mais sensíveis devam ser usadas como possível meio para descrever a variação patogênica de populações do fungo *P. griseola*.

Pastor-Corrales et al. (1998), com o objetivo de determinar os padrões de variação patogênica entre isolados de *P. griseola*, caracterizaram 433 isolados de 11 países da América Latina e 10 da África, usando, além das cultivares diferenciadoras, isoenzimas e marcadores RAPD. Os isolados foram classificados em dois grupos, andinos e mesoamericanos, embora cada grupo apresente diferenças para características bioquímicas, moleculares e virulência. Neste trabalho, ficou evidenciada a coevolução entre patógeno e hospedeiro. Estes resultados corroboram com os apresentados por Guzmán et al. (1995).

Busogoro et al. (1999), ao caracterizarem isolados, na África, de acordo com os padrões de patogenicidade e moleculares, mencionaram que não houve correlação direta entre os padrões moleculares e de virulência. Foram encontrados padrões RAPD similares entre isolados coletados de diferentes origens geográficas, sugerindo que pode ter ocorrido migração entre estes locais. No entanto, os autores sugerem que uma maior amostragem deve ser realizada para confirmar esta hipótese.

Ao estudar a diversidade genética de isolados de *P. griseola*, no estado de Minas Gerais, por meio de marcadores RAPD, Nietzsche et al. (2001) verificaram uma baixa diversidade. Neste trabalho, verificou-se a presença apenas de isolados mesoamericanos. Os dados moleculares não permitiram agrupar os isolados em patótipos ou por região de origem. Estes resultados devem ser observados com cautela, visto que apenas cinco *primers* foram usados.

Nietzsche et al. (2002) selecionaram 28 isolados de *P. griseola* e construíram *bulks* dos patótipos (63-23, 63-39, 63-31 e 63-55) mais freqüentes no Brasil. A análise da variabilidade genética foi realizada por marcadores RAPD e, para tal análise, foram utilizados apenas três *primers*. Verificou-se a impossibilidade de correlacionar a caracterização de patótipos via marcadores moleculares RAPD e a série diferenciadora.

A variabilidade genética de 137 isolados de *P. griseola*, coletados de vários locais na América Central, Colômbia e Equador, foi estudada usando sete *primers* RAPD (Mahuku et al., 2002a). Foi detectado um total de 54 fragmentos polimórficos. Os isolados coletados em genótipos de origem andina (Colômbia e Equador) foram agrupados. A maior variabilidade foi observada entre os isolados de origem mesoamericana, comparados aos de origem andina. Os autores verificaram que 81% dos valores de desequilíbrio de ligação foram significativamente diferentes de zero, levando-os a determinar que a estrutura

genética do fungo *P. griseola* é compatível com a reprodução assexual. Tais resultados evidenciaram que a reprodução sexual em *P. griseola* é ausente. Os mesmos autores sugerem que a piramidação de alelos de resistência em cultivares bem adaptadas constitui estratégia apropriada para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável à mancha angular.

Até o momento são reconhecidos apenas dois grupos gênicos, o mesoamericano e o andino. Na África, foi relatada a ocorrência de um terceiro grupo, afro-andino. Para comprovar a ocorrência deste grupo, Mahuku et al. (2002b) utilizaram marcadores RAPD e RAMS (Random Amplified Microsatellites). A análise da diversidade genética revelou que não há diferenciação ($G_{ST} = 0,004$) entre isolados afro-andinos e andinos oriundos da África. Estes resultados demonstram que isolados afro-andinos não constituem um novo grupo de *P. griseola*. Entretanto, níveis significativos de diferenciação genética ($G_{ST} = 0,39$) foram observados entre isolados afro-andinos ou andinos oriundos da África e isolados andinos da América Latina, revelando significativa diferenciação geográfica dentro de linhagens andinas.

Sartorato (2004) estudou a diversidade genética de 96 isolados de *P. griseola*, obtidos em dois municípios do estado de Goiás, por meio de marcadores RAPD. Neste trabalho, apenas 14 locos polimórficos foram usados. O autor verificou elevada variabilidade genética entre os isolados. No entanto, foi verificada a falta de especificidade dos isolados, de acordo com a sua origem geográfica. Foi sugerida, também, ausência de correlação entre a análise molecular e a análise de virulência. O autor sugere duas explicações para a falta de associação: a) as cultivares diferenciadoras foram escolhidas sem considerar o processo de evolução entre patógeno e hospedeiro, e b) o método RAPD explora uma região arbitrária do genoma do fungo, portanto não é esperada relação entre a região genômica amplificada e o gene de virulência do fungo (Sartorato, 2004).

Wagara et al. (2004) estudaram a diversidade genética de isolados de *P. griseola* no Kenya, por meio de marcadores AFLP. Os 50 isolados estudados foram representados por 44 patótipos diferentes. A diversidade genética variou consideravelmente entre as três populações estudadas (andina, afro-andina e mesoamericana). A população mesoamericana apresentou maior porcentagem de locos polimórficos (91,6%) e maior diversidade genética ($H = 0,231$) entre as populações estudadas. Embora tenha sido observado um alto nível de variabilidade genética entre os isolados, quando eles foram agrupados em populações, o nível de diferenciação entre populações foi baixo. Foi observado, em média, que 9,3% da variação genética foi devido à diferenciação entre as três populações quando comparada a variação dentro das populações (90,7%). Os autores sugerem que isolados andinos e mesoamericanos infectando uma mesma folha podem levar à ocorrência de recombinação parassexual, portanto, reduzindo a diversidade entre os grupos. Neste trabalho não foi observada correlação entre padrões de virulência e moleculares. Verificaram, ainda, que isolados afro-andinos são muito similares a isolados andinos, classificando-os apenas em isolados andinos.

Stenglein et al. (2005) e Stenglein & Balatti (2006) estudaram a variabilidade molecular entre isolados de *P. griseola*, por meio de marcadores RAPD e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e verificaram que as duas ferramentas são úteis para avaliar a diversidade deste fungo, embora ISSR tenha detectado maior nível de variabilidade que RAPD. Nestes trabalhos foram observadas correlações entre os padrões moleculares e o local de origem dos isolados, sugerindo que as áreas cultivadas com feijão na Argentina são bastante isoladas umas das outras e que todos estes patótipos podem ter sido introduzidos nos campos por sementes infectadas. A análise de variância molecular revelou que a maior parte da variação resultou de diferenças genéticas entre grupos mesoamericanos e andinos (79,68%, $P < 0,001$).

A alta variabilidade do fungo *P. griseola*, demonstrada tanto pelos testes de virulência quanto pelos dados de marcadores moleculares, pode ser usada em benefício dos melhoristas no desenvolvimento de cultivares de feijão com resistência durável (Mahuku et al., 2004). Portanto, novas fontes de resistência devem ser sempre acessadas e a utilidade destes genes validadas, antes de serem empregados. Isso pode ser feito por meio da exposição de fontes de resistência à variação patogênica existente sobre as diferentes áreas de produção (Milgroom & Fry, 1997) ou por amostragem da diversidade que existe no patógeno e uso de patótipos representativos para selecionar fontes de resistência (Milgroom & Fry, 1997).

2.4 Estrutura genética de populações

Uma espécie é formada por populações espalhadas por sua área de distribuição geográfica. Os indivíduos de uma espécie raramente se distribuem homogeneamente no espaço. Quase sempre formam agregados, bandos, colônias ou outro tipo de associação. A estrutura genética de populações refere-se à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e do grau de endogamia dentro e entre populações (Robinson, 1998).

A pedra angular da epidemiologia tem formato de triângulo – o triângulo de doenças – composto pelos vértices: ambiente, hospedeiro e patógeno. Neste contexto, populações de plantas interagem com populações de patógenos sob o efeito do ambiente (Mizubuti, 2002). A interação patógeno-hospedeiro é dependente do genoma de cada organismo, sua interação mais o efeito do ambiente. Tais interações em níveis de planta, celular e molecular são de grande interesse para o melhor entendimento do processo envolvido no desenvolvimento da doença. Este conhecimento eventualmente leva a um controle mais racional e efetivo da doença (Stenglein et al., 2003).

Na agricultura, a natureza dinâmica das relações hospedeiro-patógeno tem sido demonstrada pela frequência com que os patógenos são capazes de se adaptar aos alelos de resistência introduzidos em cultivares melhoradas. As relações recíprocas que são parte de modelos coevolucionários de resistência no hospedeiro e de virulência no patógeno são virtualmente indivisíveis. Aumentos ou decréscimos na frequência de alelos de resistência no hospedeiro apenas fazem sentido quando considerados à luz de alterações produzidas na população do patógeno. Da mesma forma, flutuações na estrutura genética da população de um determinado patógeno são interpretadas em termos de mudanças produzidas no hospedeiro (Casela, 2002).

O conhecimento da população do patógeno contribui para a maior eficiência de técnicas de manejo de resistência, tais como o melhoramento para resistência durável, piramidação de genes, uso de multilinhas e uso de misturas varietais (Mizubuti, 2002).

Para as mais diversas aplicações práticas, o interesse em marcadores se concentra em quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e como pode ser manipulada. A maneira como os indivíduos pertencentes a uma espécie se distribuem no espaço físico depende: a) dos limites estabelecidos por variáveis ecológicas; b) do modo de reprodução e dos mecanismos de dispersão da espécie; c) de eventos estocásticos que resultam na formação e extinção de populações ou em variações em seu tamanho efetivo e d) de variáveis ambientais que impõem diferentes coeficientes de seleção a cada genótipo (Robinson, 1998).

Algumas técnicas multivariadas têm sido empregadas com a finalidade de avaliar materiais genéticos. Nesse sentido, vários métodos podem ser empregados. Um dos mais utilizados na comparação de genótipos são os métodos aglomerativos (Cruz & Regazzi, 2001), os quais necessitam de estimativas de similaridade ou dissimilaridade genética.

2.5 Análises multidimensionais

2.5.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade

A visualização dos relacionamentos entre dois indivíduos é possibilitada por várias técnicas de análise multivariada que têm o coeficiente de similaridade/dissimilaridade como ponto de partida (Duarte, 1998).

A similaridade é uma medida estabelecida entre um genótipo i e um genótipo j (s_{ij}) e, geralmente, apresenta valores entre 0 e 1. A expectativa de um coeficiente de similaridade é representar a regressão linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de p variáveis. Associada a ela, a dissimilaridade, medida por $d_{ij} = 1 - s_{ij}$, é simétrica e não negativa. Segundo Krzanowski (1988), é grande o número de coeficientes que já foram propostos para estimar esta medida.

Os coeficientes de similaridade mais simples são aqueles relacionados a variáveis dicotômicas, em que cada variável possui apenas dois valores. Marcadores do tipo RAPD e AFLP são binários, estando incluídos nesta categoria de variável. Para estes marcadores, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas baseadas na presença (1) ou ausência (0) da banda no gel de eletroforese, conforme Quadro 2.

Os diferentes coeficientes propostos combinam as quantidades a, b, c e d. Os coeficientes que não consideram a quantidade d são preferidos em estudos com marcadores dominantes, já que não se sabe, precisamente, a natureza molecular da ausência da banda. Duarte et al. (1999) estudaram oito coeficientes de similaridade, nas subseqüentes análises de agrupamento e ordenação de 27 cultivares de feijão analisados por marcadores RAPD. Estes autores concluíram que, dentre os coeficientes estudados, o de Sorensen-Dice ou Nei & Li foi o

mais eficiente na dispersão dos genótipos em um plano bidimensional e, por isso, consideram-no o mais eficaz na análise de marcadores RAPD.

Com o objetivo de maximizar as medidas de similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos, são utilizadas análises de agrupamento (Dias, 1998).

2.5.2 Análises de agrupamento

Para se ter informações relativas a cada par de categorias de interesse, considerando n indivíduos, são estimadas $n(n-1)/2$ medidas de similaridade/dissimilaridade. Assim, se n é um número elevado, a identificação de grupos homogêneos pela simples observação da matriz de distâncias tornar-se-á, obviamente, impraticável. Sob esta ótica, destaca-se a importância do agrupamento para resumir a informação contida na matriz de distâncias (Dias, 1998).

QUADRO 2 Quadro de contingência, mostrando as quatro possíveis combinações dos tipos concordância e discordância de comparações de dois genótipos por marcadores dominantes.

| Patótipo j | Patótipo i | |
|------------|------------|------------|
| | 1 | 0 |
| 1 | a (1,1) | b (0,1) |
| 0 | c (1,0) | d (0,0) |

As análises de agrupamento são utilizadas com a finalidade de maximizar, por algum critério de classificação, a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos (Cruz & Regazzi, 2001; Dias, 1998). Duas etapas são envolvidas no processo de agrupamento. De acordo com Cruz (1990), são as etapas de estimação de uma medida de dissimilaridade entre indivíduos a serem agrupados, e a adoção de uma técnica de agrupamento visando à formação de grupos.

Os métodos hierárquicos são divididos em aglomerativos, procedentes de uma série de sucessivas fusões, e os divisíveis, procedentes de sucessivas divisões. Para o método hierárquico, a estrutura classificatória formada é representada por um gráfico em forma de árvore, dendrograma, que simplifica substancialmente os processos de classificação, comparação e discussão de agrupamentos biológicos (Regazzi, 1998).

As delimitações dos grupos podem ser definidas por meio de exame visual do dendrograma. Estabelecendo-se cortes em certos pontos do dendrograma, definem-se os grupos e seus respectivos números de indivíduos. Isso constitui uma das dificuldades de utilização do método hierárquico, devido à arbitrariedade na escolha destes pontos de corte. Segundo Cruz (1990), devem-se evidenciar pontos de alta mudança de nível.

Em estudos de divergência com marcadores moleculares, um dos métodos mais utilizados na construção de dendrogramas é o da média aritmética entre pares não ponderados (Dias, 1998), comumente referido como UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*). Neste caso, a distância intergrupo é a média das distâncias pareadas dos membros de dois grupos. Algebricamente, a distância entre os itens i e j , para $i \neq j$, é dada por:

$$d_{(ij)} = \text{mín}(d_{ij})$$

a distância de um item k em relação ao primeiro grupo formado por i e j , com $k \neq i, j$, fica definida por

$$d_{(ij)k} = 1/2(d_{ik} + d_{jk})$$

e a distância entre dois grupos (ij) e (kl) , com $i, j \neq k, l$, é dada por

$$d_{(ij)(kl)} = 1/4(d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl})$$

Diversos trabalhos na literatura utilizaram métodos de agrupamento com a finalidade de estudar a divergência genética de fungos fitopatogênicos por meio de marcadores moleculares. Esta metodologia foi usada por Busogoro et al. (1999), Mahuku et al. (2002a,b), Nietsche et al. (2001, 2002), Sartorato (2004), Stenglein & Balatti (2006), Wagara et al. (2004b).

Diante da revisão apresentada, é evidente a necessidade do estudo dos mecanismos que propiciam a ampliação da variabilidade genética. Entre os mecanismos que têm sido estudados para algumas espécies de fungos, destaca-se a formação de anastomoses entre hifas, que pode atuar como um evento inicial para que ocorra a troca de material genético.

2.6 Anastomoses entre hifas

As hifas desempenham papel importante no ciclo de vida da maioria dos fungos, destacando-se a função de colonização do substrato, absorvendo água e outros nutrientes. A fusão que ocorre entre as hifas é o que se denomina de anastomose. As “pontes” de anastomose podem ocorrer de duas formas distintas: forma de H e adjacente. A ocorrência de anastomose entre hifas está diretamente

ligada à ocorrência do ciclo parassexual. Adicionalmente, estas são importantes, também, para a comunicação intra-hifas e homeostase da colônia durante o crescimento e a reprodução. As anastomoses são comuns em dois estádios de desenvolvimento da colônia vegetativa dos fungos filamentosos. O primeiro ocorre no início do estabelecimento da colônia entre esporos ou esporos germinados. O segundo ocorre, subseqüentemente, entre hifas localizadas atrás da hifa principal da zona de crescimento periférico do micélio (Glass et al., 2004).

Saupe (2000) destacou que existem mecanismos genéticos entre indivíduos geneticamente diferentes que restringem a formação do heterocário e, conseqüentemente, dificultando a ocorrência do ciclo parassexual (Glass et al., 2000). O mesmo autor sugere que fungos filamentosos apresentam diferentes formas de reconhecimento: o reconhecimento sexual, que é controlado por locos *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, que é controlado por um loco específico denominado *het* (incompatibilidade de heterocário ou também pode ser chamado *vig*, de incompatibilidade vegetativa). Quando dois indivíduos se encontram, eles podem sofrer a fusão celular ou anastomose. Se os dois indivíduos apresentam o mesmo genótipo *het*, ocorre a heterocariose. Se eles diferirem geneticamente para o loco *het*, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido.

Os fungos filamentosos apresentam um sistema de autodefesa que promove o reconhecimento de genótipos diferentes para prevenir a passagem de elementos infecciosos e que recursos sejam retirados durante a reprodução sexual. Este mecanismo de autodefesa é representado pela ocorrência de incompatibilidade vegetativa. Provavelmente, o responsável pela preservação da individualidade genética são os locos *het* (Saupe, 2000).

A reação de incompatibilidade do heterocário pode ocorrer em quatro etapas diferentes (Leslie & Zeller, 1996): i) pré-fusão, regulada por locos que podem estar relacionados com a auto-incompatibilidade do heterocário (*hsi*); ii) fusão, controlada por genes de auto/não-auto-reconhecimento, como os genes *het* e *vic*; iii) pós-fusão, uma cascata de reações ocorre desde o não-auto-reconhecimento até a morte celular, podendo ser influenciada por diversos genes, entre eles os genes supressores (*sup*), que modificam o sinal e iv) morte celular, provocada por genes apoptóticos.

O pré-contato pode ocorrer da seguinte forma: a ponta da hifa induz a ramificação da outra hifa e estas, posteriormente, fundem-se; as pontas das hifas crescem em direção umas das outras e, em seguida, ocorre a fusão ou o pré-contato do tipo “tip-to-side” (Glass et al., 2004). Provavelmente, o início do pré-contato das pontas novas das hifas ocorre devido a uma difusão de sinais químicos e o redirecionamento do crescimento da hifa (Glass et al., 2000).

A degradação das paredes celulares provoca o início do evento da fusão. Esta degradação ocorre devido à liberação de enzimas hidrolíticas no ponto de contato e, então, é formada uma ponte de parede celular entre duas hifas envolvidas. Os eventos pós-fusão entre hifas envolvem a fusão de membranas plasmáticas e a mistura de citoplasma (Glass et al., 2000).

Glass et al. (2004) descreveram os passos de pré-contato, pós-contato e pós-fusão: inicialmente, a ponta da hifa secreta um sinal extracelular desconhecido e difusível, o qual induz à formação do Spitzenkörper, que é uma vesícula central que fornece componentes para a extensão da parede celular nas pontas da hifa (Glass et al., 2000). Em seguida, a ponta de cada hifa secreta um sinal difusível quimiotrópico extracelular, que atua regulando o comportamento do Spitzenkörper, levando ao crescimento das pontas das hifas, uma em direção a outra. Após o contato físico de suas paredes celulares, as hifas apresentam uma parada de crescimento e os Spitzenkörper persistem. Posteriormente, junto às

pontas das hifas, ocorre a secreção de um material adesivo. A dissolução da parede celular e do material adesivo determina o momento em que as membranas plasmáticas das pontas das hifas entram em contato e, logo a seguir, fundem-se. Neste momento, dar-se-á a formação de um poro e o Spitzenkörper permanece associado a estes, enquanto inicia o aumento e fluxo citoplasmático entre as hifas. Os poros ampliam, o Spitzenkörper desaparece. Devido a diferenças na pressão de turgor, pode haver fluxo de organelas entre as hifas em anastomose.

Estudos a respeito do controle genético da anastomose de hifas são escassos. O conhecimento da genética dos sistemas de incompatibilidade vegetativa em fungos tem se limitado a um número pequeno de espécies como *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *Aspergillus nidulans* e *Cryphonectria parasítica*. O número de locos *het* varia de espécie para espécie (Saupe, 2000). Pelo menos onze locos *het* foram identificados em *N. crassa*, nove em *P. anserina*, oito em *Aspergillus nidulans* e sete em *C. parasítica* (Glass et al., 2000). As similaridades dos fenótipos de incompatibilidade vegetativa entre diferentes interações *het* e entre diferentes espécies de fungos sugerem que os passos que mediam as manifestações morfológicas de incompatibilidade vegetativa possuem características genéticas e bioquímicas comuns (Glass et al., 2000).

A classificação de isolados em VCGs pode ser uma importante ferramenta para a análise de populações em fungos. Na prática, o confronto entre isolados selvagens de uma mesma população ou de populações diferentes resulta frequentemente em interações de incompatibilidade (Saupe, 2000).

Ainda não existem relatos a respeito de grupos de anastomoses em *P. griseola*. Porém, alguns trabalhos já foram realizados, considerando o patossistema *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum*. Rodriguez-Guerra et al. (2003) observaram que, em populações naturais, vários grupos de

anastomoses podem ser identificados. Estes autores propuseram que este mecanismo pode levar à formação de diferentes linhagens clonais de *C. lindemuthianum*. No entanto, um isolado que é capaz de formar anastomoses com isolados de diferentes grupos de anastomoses pode servir como uma ponte, permitindo a troca de informações genéticas entre dois grupos. Neste trabalho, não foi observada relação entre genótipo, patótipo e grupos de anastomoses. Provavelmente, a variação existente na população estudada deve-se à mutação e ou à reprodução parassexual entre isolados pertencentes a um mesmo grupo de anastomose.

No Brasil, a ocorrência de anastomoses foi estudada por Freire et al. (2005), que verificaram a presença de anastomoses entre hifas de patótipos diferentes do fungo *C. lindemuthianum*. A análise de agrupamento proporcionou a formação de três grupos de compatibilidade. A fusão de hifas pode levar à formação de grupos de compatibilidade e do heterocário, sendo, portanto, um importante mecanismo para gerar variabilidade em fungos de reprodução assexuada.

Ishikawa (2006) verificou a ocorrência de anastomose entre hifas dentro de isolados do patótipo 65 do fungo *C. lindemuthianum*. A autora observou uma ampla variabilidade para este caráter e mostrou que alguns isolados podem proporcionar a formação de anastomose com todos os outros isolados. Agrupamentos diferentes foram obtidos quando considerados os marcadores RAPD e a anastomose entre hifas. Portanto, isolados geneticamente diferentes, ocorrendo dentro de um mesmo grupo de compatibilidade, podem proporcionar um incremento na variabilidade, caso ocorra a recombinação parassexual. Foi relatada, também, a não ocorrência de associação entre o agrupamento baseado na formação de anastomose e nos marcadores RAPD.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. J. **Na annotated list of diseases, pathogens and associated fungi of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Eastern and Southern Africa.** Wallingford: CAB International; Cali, Colômbia: CIAT, 1995. (Phytopathological Papers, n. 34).
- ALVAREZ-AYALA, G.; SCHWARTZ, H. F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 22, p. 86-88, 1979.
- AMARO, G. B.; ABREU, A. DE F. B.; RAMALHO, M. A. P.; AND SILVA, F. B. Phenotypic recurrent selection in the common bean with Carioca-type grains for resistance to *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, 2007.
- ANDERSEN, A. L. Common names for plant diseases: bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 653, 1985.
- ANONYMOUS. CMI distribution maps of plant diseases, n. 328, 3. ed. Wallingford: CAB International, 1986a.
- ANONYMOUS. *Phaeoisariopsis griseola*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria n° 847. Wallingford: CAB International, 1986b.
- APARÍCIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolívia.** Cali, Colômbia: Universidad del Valle – Facultad de Ciencias, 1998. p. 120.
- BOSHOFF, W. H. P.; SWART, W. J.; PRETORIUS, Z. A.; LIEBENBERG, M. M.; CROUS, P. W. Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in southern Africa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 344–349, Apr. 1996.
- BRENES, B. M.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIN, L. Estimativas de perdas no rendimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 599, out. 1983.

BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Collingwood, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1951.

BURUCHARA, R. A. **Determination of pathogenic variation in *Isariopsis griseola* Sacc. and *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolica* (Burk, 1926) Young, Dye and Wilkie 1978.** 1983. 188 p. Tese (Doutorado) - University of Nairobi, Nairobi.

BUSOGORO, J. P.; JIJAKLI, M. H.; LEPROIVE, P. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 559-569, Sept. 1999.

CAIXETA, E. T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**, 2002. 90 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAIXETA, E. T.; BORÉM, A.; AZEVEDO FAGUNDES, S.; NIESTCHE, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 134, n. 3, p. 297-303, 2003.

CAMPOS-ÁVILA, J. **Enfermedades del frijol**. México: Ed. Trillas, 1987. 132 p.

CAMPOS-ÁVILA, J.; FUCIKOVSKY, Z. L. Estudio de algunos aspectos de la mancha angular causada por *Isariopsis griseola* Sacc. en cultivo del frijol. **Fitopatología**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 16-19, fev. 1981.

CAMPOS-ÁVILA, J.; FUCIKOVSKY, Z. L. Estudio de algunas características de *Isariopsis griseola* Sacc. agente causal de la mancha angular del frijol. **Agrociencia**, México, n. 39. p. 41-48. 1980.

CARDONA-ALVAREZ, C.; WALKER, J. C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 16, n. 11, p. 610-615, Nov. 1956.

CARVALHO, G. A.; PAULA JR. T. J.; ALZATE-MARIN. A. L.; NIESTCHE, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e

identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 482-485, out./dez. 1998.

CASELA, C. R. Influência do hospedeiro na estrutura populacional de patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 35, ago. 2002. Suplemento.

CORREA, F. J.; SAETTLER, A. W. Pathogenic variation in *Isariopsis griseola*, cause of angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1141, Oct. 1986. Abstract.

CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; OLIVEIRA, M. L. P.; NIESTCHE, S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Herança da resistência à mancha angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 27-32, jan./mar. 2001.

CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** 1987. Thesis (PhD) - Michigan State University.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**, 1990. 188 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. R. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C.; COSTA, SOUZA, E. D. T.; BERNI, R. F. Diagnose das doenças. In: CANTERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. **Principais doenças fúngicas do Feijoeiro**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. p. 17-20.

DIAS, L. A. dos S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-473.

DIAZ, P. C.; ARMAS, E. D.; BARROS, A. **La mancha angular de la Caraota producida por *Isariopsis griseola* Sacc. en la cuenca del lago de Valencia**. 1965.

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD**, 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparasion of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, Sept. 1999.

ELLIS, M. B. **“Dematiaceus Hyphomycetes.”** Kew, U. K: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2006. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 03 jun. 2006.

FERRARIS, T. Oservazioni micologiche su specie del gruppo Hyphales (Hyphomycetae): IV. Sul. gen. *Isariopsis* Fers. Sacc. **Annales Mycologici**, Berlin, v. 7, p. 273-286, 1909.

FERRAZ, S. La mancha angular. In: SCHWARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de produccion del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p. 55-64.

FERREIRA, C. F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G. A.; NIETSCHE, S.; PAULA JR., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. . Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 4, p. 1130-1133, July/Aug. 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

FREIRE, C. N. S.; SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A. Formação de anastomoses entre isolados do agente causal da antracnose do feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA, 2005. p. 193-196.

GARCIA, R. A. V.; CARNEIRO, M. S.; SARTORATO, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 49, p. 209-210, 2006.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, p. 165-186, 2000.

GLASS, N. L.; RAMUSSEN, C.; ROCA, M. G.; READ, N. D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. **Trends Microbiology**, London, v. 12, n. 3, p. 135-141, Mar. 2004.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, Plainview, v. 39, p. 439-446, 1974.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 37-42, Jan. 1999.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTAS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 600-607, May 1995.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, London, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, Sept. 1970.

HEMP, S.; MASSIGNA, A. M. **Considerações sobre a cultura do feijoeiro comum e a ocorrência de mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.) no Estado de Santa Catarina - Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/negocios/ser_doc/doc_132/132_3.html>. Acesso em: 10 jun. 2005.

HOCKING, D. A new virulent form of *Phaeoisariopsis griseola* causing circular leaf spot of French beans. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 51, n. 4, p. 276-278, 1967.

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; KAWAHARA, K.; NAKAMURA, I.; SHIBATA, T. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. **Panta Medica**, New York, v. 66, n. 3, p. 270-272, Apr. 2000.

IBGE. **Banco de dados agregados**: pesquisa: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 10 de março de 2007.

ISHIKAWA, F. H. **Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses**. 2006. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M.; CASTRO, J. L.; DUDIENAS, C. **A cultura do feijoeiro comum e a mancha-angular no Estado de São Paulo**. 2004. Disponível em: http://www.cnfap.embrapa.br/negocios/ser_doc/doc_132/132_1.html>. Acesso em: 10 jun. 2005.

JARA, C.; CASTELLANO, G.; MAHUKU, G. Estado actual y proyección de la investigación relacionada com la mancha angular del frijol (*Phaeoisariopsis griseola*). **Fitopatología Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2001.

KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungifacts and perspectives. **BioEssays**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 652–659, Aug. 1998.

KRZANOWSKI, W. J. **Principle of multivariate analysis. A user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.

LESLIE, J. F.; Zeller, K. A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 75, n. 3, p. 415-424, Dec. 1996.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 594-604, Oct. 2002a.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the afro-andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, June 2002b.

MAHUKU, G.; MONTOYA, C.; HENRÍQUEZ, M. A.; JARA, C.; TERAN, H.; BEEBE, S. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1817-1824, Sept./Oct. 2004.

MARIN-VILLEGAS, J. **Variabilidad del *Isariopsis griseola* Sacc., agente causal de la mancha angular del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Thesis (PhD) - Universidad de Caldas. 1959 (Abstracts on Field Beans 1979, v. 4, p. 140-141).

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, Jan. 2006.

MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. **Advances in Botanical Research**, London, v. 24, p. 1-30, 1997.

MIZUBUTI, E. S. G. O vértice – biologia de populações e manejo de doenças. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 37, ago. 2002. Suplemento.

MORA, B. B. **Estimativa de perdas no rendimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas pela mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.)**. 1983. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A.; Variabilidade genética em etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2000.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, Oxford, v. 55, p. 335-350, 1987.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 331-335, out./dez. 2002.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A.; PAULA JR., T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of

Phaeoisariopsis griseola in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G. A.; ROCHA, R. C.; PAULA JR., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 2, p. 117-121, Feb. 2000.

OROZCO, S.; ARAYA, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 589-593, nov./dez. 2005.

PARADELA FILHO, O. Algumas moléstias fúngicas do feijoeiro que ocorrem em São Paulo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO FEIJÃO, 1., 1972. Campinas. Anais...Campinas: 1972. v.2, p. 305-384.

PASTOR-CORRALES, M. A.; AGGARWAL, V. A.; CHIRWA, R. M.; BURUCHARA, R. A. Andean beans with resistance to angular leaf spot and virulence diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Southern and Eastern Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 129-130, 2004.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 2, p. 161-171, 1998.

PYNDJI, M. M. Pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in the Great Lakes Region. In: PAN-AFRICA BEAN PATHOLOGY WORKING GROUP MEETING, 1992, Thika, Kenya. **Proceedings...** Thika, Kenya: CIAT, 1992. p. 7-12. (CIAT Workshop Series, n. 23)

REGAZZI, A. J. Análise multivariada. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5., 1998, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Genética Regional, 1998. p. 55.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:**

fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, L. M.; MENDES-COSTA, M. C.; SCHWAN, R. and WHEALS A. E. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, New York, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, Nov. 2004.

RODRIGUEZ-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M. T.; MARTINEZ, O.; SOMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p 228-235, Apr. 2003.

SACCARDO, P. A. *Isariopsis griseola* Sacc. **Michelia**, v. 1, 273. 1878.

SAETTLER, A. W. Angular leaf spot. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St Paul, USA: APS Press, 1991. p. 15-16

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SANTOS-FILHO, H. P.; FERRAZ, S.; VIEIRA, C. Resistência à mancha-angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 23, n. 127, p. 226-230, maio/jun. 1976.

SARTORATO, A. Identificarion of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 78-81, jan./mar. 2002.

SARTORATO, A. Origem dos conídios de *Phaeoisariopsis griseola* para iniciar uma epidemia de mancha angular no feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia, GO. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. p. 41-43.

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goiás, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385-390, Aug. 2004.

SARTORATO, A. **Principais doenças do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2003. Disponível em: <http://www.agromil.com.br/dae_fej.html>. Acesso em: 20 out. 2003.

SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola* Sacc.** 1989. 131 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz". Universidade de São Paulo. Piracicaba.

SARTORATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 235-236, 2004.

SARTORATO, A.; NIETSCH, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 637-642, out./dez. 2000.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Especialização fisiológica de *Isariopsis griseola* Sacc. em *Phaseolus vulgaris* L. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 10, n. 1/2, p. 58-59, jan./jun. 1984.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas de produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 247-251, 1992.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; MENTEN, J. O. M.; BERGAMIN FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 43-46, Feb. 1991.

SAUPE, S. J. Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, Sept. 2000.

SCHWARTZ, H. F.; CORREA, F. J.; PENEDA, P. A.; OTOYA, M. M.; KATHERMAN, M. J. Dry bean yields losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 494-496, June 1981.

SENGOIBA, T. N.; MUKIIB, J. Studies on inoculum sources of angular leaf spot of beans caused by *Phaeoisariopsis griseola* in Uganda. **Tropical pest management**, London, v. 32, n. 4, p. 288-291, Oct./Dec. 1986.

SINGH, B. M.; SHARMA, Y, R. Screening of fungicides to control angular and floury leaf spots of beans. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Calcutta, v. 6, p. 148-151, 1976.

STEINER, J. J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germoplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 439-451, Mar./Abr. 1996.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 158-167, Apr./June 2006.

STENGLEIN, S. A.; FERMOSELLE, G. E.; BALATTI, P. A. Pathogenic and molecular studies of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 48, p. 92-93, 2005.

STENGLEIN, S.; PLOPER, L. D.; VIZGARRA, O.; BALATTI, P. Angular leaf spot: A disease caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**, London, v. 52, p. 209-243, 2003.

VALE, F. X. R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 335-449.

VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais, IV: estudos realizados no período de 1970 a 1973. **Revista Ceres**, v. 21, p. 470-485, 1974.

VITAL, W. M. ***Phaeoisariopsis griseola*: caracterização fisiológica, fontes de resistência e reação do feijoeiro**. 2006. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP.

VITAL, W. M.; ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F. Patogenicidade de isolados monospóricos de *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha angular em feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia, GO. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. p. 212-215.

WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; KIMENJU, J. W.; BURUCHARA,

R. A. Occurrence and distribution of Andean, Afro-Andean and Mesoamerican pathotypes of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 239-240, 2004a.

WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; SIBOE, G. M. The occurrence and extent of pathogenic variation in *Phaeoisariopsis griseola* Sacc. in Kenya. In: REGIONAL MYCOLOGY CONFERENCE, 3., 1995, Harare, Zimbabwe. **Proceedings...** Harare, Zimbabwe: African Mycological Association, 1995.

WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; KIMENJU, J. W.; BURUCHARA, R. A.; JAMNADASS, R.; MAJIWA, P. A. O. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as revealed by AFLP and Group-specific primers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 235-242, Apr. 2004b.

WANG, A.; VARGAS, E.; MORA, B. Evaluation of the resistance of French bean cultivars to angular leaf spots (*Isariopsis griseola* Sacc.) by three methods, and estimation of yield losses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 10, p. 1180, Oct. 1985. Abstract.

WELSH, J.; Mc CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. **Bulletin Agricultural Experiment Station United States of America**, Washington, n. 869, p. 255, 1957.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE PATOGÊNICA ENTRE ISOLADOS DE *Phaeoisariopsis griseola*

RESUMO

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Variabilidade patogênica entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola***. 2007. p. 51-76. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é responsável por perdas expressivas na produtividade do feijoeiro no Brasil. As perdas podem atingir 80% da produção sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Devido a sua importância no estado de Minas Gerais e à elevada capacidade de variação patogênica deste fungo, o monitoramento constante desta variabilidade é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias apropriadas para a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno. A variabilidade patogênica de 48 isolados de *P. griseola*, coletados no estado de Minas Gerais, foi testada sobre o conjunto de doze cultivares diferenciadoras em casa de vegetação. Foram identificados 10 patótipos diferentes, evidenciando a elevada capacidade de variação patogênica deste fungo em Minas Gerais. Os patótipos 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 não haviam sido detectados no estado. Todos os patótipos (63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) identificados neste estudo, exceto o patótipo 55-15, induziram reações compatíveis com todas as cultivares andinas. Os isolados estudados foram altamente patogênicos, em ambos os conjuntos gênicos de cultivares diferenciadoras. Todos os patótipos foram classificados como pertencentes ao conjunto gênico mesoamericano. Os patótipos 63-31 (25%) e 63-63 (47,92%) foram identificados em maior frequência, sendo o patótipo 63-63 amplamente distribuído entre os locais estudados. O patótipo 63-63 quebrou a resistência de todos os genes presentes em todas as cultivares diferenciadoras. O amplo espectro de patogenicidade deste patótipo indica a necessidade de uma busca contínua por novas fontes de resistência, para serem inseridas nos programas de melhoramento visando resistência à mancha-angular.

*Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

ABSTRACT

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Pathogenic variability among *Phaeoisariopsis griseola* isolates**. 2007. p. 51-76. Thesis (Plant Genetics and Breeding Program) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) angular leaf spot, caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, is responsible for extensive yield losses of common bean in Brazil. Yield loss can reach up to 80% under disease favorable environmental conditions. Due to the importance of common bean angular leaf spot in Minas Gerais State and to the high magnitude of pathogenic variability of this fungus, monitoring the pathogenic variability of its causal agent becomes an important tool for the development or adequate adjusted strategies for a breeding program aimed at developing resistant cultivars. The pathogenic variability of 48 isolates of the *P. griseola*, collected in Minas Gerais State, was tested on a set of 12 differential cultivars in the greenhouse. Ten pathotypes were identified indicating a wide pathogenic variability of this fungus in Minas Gerais State. Pathotypes 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 had not been reported in Minas Gerais State. Pathotypes (63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) identified in this study, except the pathotype 55-15, induced compatible reactions with all andean cultivars. Isolates highly pathogenic in both differential cultivars gene pools, were observed. All isolates were classified as belonging to the mesoamerican gene pool. Pathotypes 63-31 and 63-63 were the most frequent, whereas pathotype 63-63 was the most widespread among the studied places. Pathotype 63-63 overcame resistance genes present in all differential cultivars. Its wide spectrum of pathogenicity reinforces that a continuous search for new resistance gene sources of angular leaf spot must be pursued for including in genetic breeding programs aiming angular leaf spot resistance.

*Advisor: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é hospedeiro de vários patógenos. Entre os patógenos que afetam esta cultura, destaca-se o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, agente causal da mancha-angular. Esta doença é de ampla distribuição geográfica, ocupando zonas tropicais e subtropicais do mundo (Liebenberg & Pretorius, 1997). Nos últimos anos, ela doença tem se tornado uma das mais importantes no Brasil, podendo proporcionar perdas de até 80% na produção, dependendo da suscetibilidade das cultivares, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura (Cardona-Alvarez & Walker, 1956; Correa-Victoria et al., 1989 e Mahuku et al., 2002a; Schwartz et al., 1981).

O controle da mancha-angular pode ser realizado quimicamente, por meio de fungicidas, resultando na redução da rentabilidade e em danos ambientais (Miklas et al., 2006). Em virtude deste fato, a utilização de cultivares resistentes ao patógeno, associada a boas práticas culturais, constitui a melhor estratégia para o controle da mancha-angular devido à praticidade e economia. Porém, o manejo adequado de doenças requer não apenas o desenvolvimento de cultivares mais resistentes, mas também que se encontrem formas de aumentar a durabilidade e a estabilidade desta resistência (Casela, 2002).

Na agricultura, a natureza dinâmica das relações hospedeiros-patógenos tem sido demonstrada pela frequência com que os patógenos são capazes de se adaptar aos alelos de resistência introduzidos em cultivares melhoradas (Casela, 2002). Estudos de diversidade genética com o fungo *P. griseola* realizados, por Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales & Jara (1995), foram os pioneiros a revelar o processo de coevolução entre o patógeno e o conjunto gênico hospedeiro de acordo com o centro de origem, ou seja, isolados de origem

andina infectam cultivares do conjunto gênico andino e, contrariamente, isolados de origem mesoamericana atacam cultivares do conjunto gênico mesoamericano, mas possuem capacidade de infectar, também, cultivares de origem andina.

O processo de coevolução entre patógeno e hospedeiro incide diretamente sobre as estratégias de melhoramento a serem usadas para a obtenção de cultivares resistentes geneticamente ao patógeno. Os alelos de resistência de cultivares do conjunto gênico mesoamericano são efetivos quando transferidos para cultivares andinas em regiões em que prevalecem isolados de origem andina. Por conseguinte, uma boa estratégia para a obtenção de cultivares melhoradas é o desenvolvimento de cultivares com genes de resistência de ambos os conjuntos gênicos (Miklas et al., 2006).

Dados da literatura indicam que a resistência genética ao fungo *P. griseola* pode ser monogênica e ou oligogênica (Mahuku et al., 2004). Devido à elevada capacidade de variação patogênica, ou seja, a ocorrência de muitos patótipos (Busogoro et al., 1999; Mahuku et al., 2002a; Pastor-Corrales et al., 1998), combinações de diversas fontes de resistência são necessárias para fornecer resistência ampla ao conjunto de patótipos prevalentes em uma dada região (Miklas et al., 2006). Além disso, Mahuku et al. (2004) apontam o uso da diversidade de genes de resistência no hospedeiro e o conhecimento da diversidade genética do patógeno para virulência e outros marcadores como ferramentas úteis no desenvolvimento de cultivares de feijão com resistência durável.

Amaro et al. (2007) sugerem que, certamente, vários genes estão envolvidos no controle da resistência à mancha-angular. Ao avaliarem a variabilidade entre linhagens de feijão para resistência à mancha-angular, observaram graduação nos sintomas observados entre as linhagens consideradas resistentes e atribuíram essa graduação ao efeito ambiental, enfatizando a possível existência de controle poligênico deste caráter. Estes autores

verificaram, também, a eficiência do emprego da seleção recorrente no melhoramento visando resistência a mancha angular.

O monitoramento constante da variabilidade patogênica e a identificação de novos alelos de resistência são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias apropriadas para a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno. Esta variabilidade tem sido estudada por meio de um conjunto de doze cultivares diferenciadoras, proposto pelo CIAT, no ano de 1995 (Pastor-Corrales & Jara, 1995).

A diversidade genética de *P. griseola* foi determinada no estado de Minas Gerais por Nietsche et al. (2001). Neste trabalho foram identificados 13 patótipos diferentes entre os 30 isolados estudados, tendo os patótipos que ocorreram em maior frequência sido: 31-21, 31-23, 63-39, 63-55 e 63-23. Sartorato (2002) estudou 51 isolados de *P. griseola* obtidos de cinco estados do Brasil e observou a ocorrência de sete patótipos diferentes (31-23, 55-31, 63-15, 63-23, 63-31, 63-39 e 63-63). Elevada variabilidade também foi detectada em estudo realizados no Brasil, por Nietsche et al. (2002), totalizando 26 patótipos diferentes entre os 73 isolados estudados. O mesmo nível de variabilidade é detectado quando se coletam isolados de diversas partes do mundo, como observado nos trabalhos realizados por Mahuku et al. (2002a,b), Orozco & Araya (2005), Pastor-Corrales et al. (2004), Stenglein et al. (2005), Stenglein & Balatti (2006), Wagara et al. (2004a). Adicionalmente, resultados de pesquisa tem demonstrado a ocorrência do patótipo 63-63, que apresenta reação compatível com todas as cultivares da série diferenciadora, o que sinaliza para uma busca constante de novas fontes de resistência.

Este trabalho teve por objetivo verificar a diversidade patogênica de isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais, para orientar os programas de melhoramento genético que visam ao desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação de patótipos de *P. griseola*

2.1.1 Isolados do fungo

Isolados de *P. griseola* obtidos de cultivares de feijão naturalmente infectadas no campo foram usados neste estudo. Dos 48 isolados do fungo coletados, 46 foram provenientes de Ijaci e Lavras, e dois, Pg-38 e Pg-42, coletados no município de Alterosa, Minas Gerais, Brasil. A maioria dos isolados foi coletada em campos experimentais, no qual são empregados programas de melhoramento do feijoeiro.

Os isolados foram coletados de amostras de folhas ou vagens com sintomas de mancha-angular. O isolamento monospórico foi realizado da seguinte forma: i) inicialmente, a folha infectada foi visualizada sob lupa para a observação da presença de corêmios esporulados; ii) foi realizada a raspagem destes corêmios com uma ponta de vidro fina; iii) o material coletado foi colocado em um disco (5 mm) de meio BDA (batata-dextrose-ágar) sobre uma lâmina e, iv) posteriormente, com o auxílio de microscópio e agulha de vidro adaptada ao microscópio, foi realizada a coleta do esporo e inoculado sobre outro pedaço de BDA; v) o pedaço de meio com o esporo foi colocado no interior de uma placa de Petri estéril, com meio BDA, para a obtenção da colônia monospórica e armazenada à temperatura média de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz, em câmara B.O.D.

Aproximadamente, 15 dias após a inoculação do esporo, as colônias monospóricas que cresceram foram repicadas para outra placa de Petri contendo

meio BDA. Os isolados foram repicados para tubos Eppendorff que continham água destilada estéril e armazenados a -10°C.

2.1.2 Identificação de patótipos

O conjunto de doze cultivares diferenciadoras (Pastor-Corrales & Jara, 1995), mais as cultivares Rosinha G-2 (suscetível) e AND 277 (resistente), foi inoculado com cada isolado de *P. griseola* (Tabela 1). As sementes das cultivares diferenciadoras foram semeadas em vasos contendo 2,0 kg de solo e cinco sementes por vaso.

Para obter altos níveis de esporulação, o fungo foi cultivado em meio folha de feijão-dextrose-ágar (Silveira, 1967) e incubado a 24±2°C, por 14 dias, no escuro. Posteriormente, o inóculo foi preparado pela adição de 5-10 ml de água destilada estéril a cada placa e raspagem da superfície da cultura. A suspensão de conídios foi obtida pela filtragem, através de duas camadas de gase, para a remoção dos fragmentos miceliais. A concentração final de esporos foi ajustada para 2 x 10⁴ conídios.ml⁻¹. As plantas foram inoculadas no estágio V3 (CIAT, 1987). As plantas inoculadas foram incubadas em uma câmara úmida (acima de 96% UR), durante 48 horas e 16 horas de fotoperíodo.

Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação. Entre 14 e 18 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas de acordo com a escala descritiva de 1 a 9, desenvolvida pelo CIAT (1987). Nesta escala, consideram-se como resistentes (reação incompatível) as plantas com notas variando de 1 a 3 e suscetíveis (reação compatível) as plantas que receberam nota igual ou superior a 4. Os patótipos foram designados de acordo com o sistema binário de nomenclatura sugerido por Habgood (1970). As cultivares diferenciadoras foram divididas em dois conjuntos (andinas e mesoamericanas) de seis cultivares cada, de acordo com sua origem. Cada conjunto foi arranjado

em uma ordem fixa e pré-estabelecida, em que cada cultivar recebe um valor fixo. Este valor foi definido pela seguinte equação: 2^{n-1} , em que 2 reflete o número de reações (resistente e suscetível) levadas em consideração e n é o número de ordem de cada cultivar.

A reação incompatível tem o valor zero e, quando multiplicada pelo valor da cultivar, anula o valor desta. A reação compatível recebe o valor 1 e, quando multiplicada pelo valor da cultivar, recebe o mesmo valor desta. Assim, a soma total dos valores das reações compatíveis proporcionará a designação do patótipo (Sartorato & Thung, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação de patótipos de *P. griseola*

Com base na reação do grupo de doze cultivares diferenciadoras de *P. griseola* foi observada a existência de diferentes padrões de virulência. Ao examinar a variabilidade de virulência entre os 48 isolados estudados, verificou-se a existência de dez patótipos diferentes (Tabelas 1 e 2). O resultado indica que a cada cinco isolados estudados, um patótipo deste patógeno foi identificado. Este fato evidencia a elevada variabilidade patogênica deste fungo e confirma os dados existentes na literatura (Mahuku et al., 2002a; Nietzsche et al., 2002; Orozco & Araya, 2005 Sartorato, 2002; Sartorato, 2004).

Nietzsche et al. (2002) e Orozco & Araya (2005) observaram elevada patogenicidade entre os isolados de *P. griseola* e verificaram que, a cada três isolados estudados, um patótipo foi identificado. Resultado similar foi observado por Mahuku et al. (2002a), os quais observaram, em média, a ocorrência de um patótipo a cada dois isolados. Já Sartorato (2002 e 2004) identificou um patótipo a cada sete isolados estudados. É possível verificar que, nos trabalhos realizados por Mahuku et al. (2002a) e Orozco & Araya (2005), a variabilidade apresentada pelo fungo foi maior que nos trabalhos realizados por Sartorato (2002 e 2004). Esse fato, provavelmente, deve-se à maior diversidade de locais amostrados e aos hospedeiros que, nestes estudos, pertenciam a ambos os conjuntos gênicos, mesoamericano e andino.

Isolados coletados em um mesmo local exibiram diferentes padrões de virulência. No município de Lavras, MG, por exemplo, ocorreram seis patótipos diferentes (Tabela 2). Estes resultados corroboram com os de Nietzsche et al. (2002), Sartorato (2002) e Sartorato (2004).

TABELA 1 Isolado, cultivar e município de origem dos isolados de *P. griseola*.

| Isolado | Cultivar | Município – Estado | Patótipo |
|---------|------------------|--------------------|----------|
| Pg-01 | CV-13 | Ijaci, MG | 63-47 |
| Pg-02 | CV-78 | Ijaci, MG | 63-15 |
| Pg-03 | ESAL 507 | Ijaci, MG | 63-47 |
| Pg-04 | Z-22 | Ijaci, MG | 63-63 |
| Pg-05 | CV-78 | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-06 | MAI - 8-13 | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-07 | LH-10 | Ijaci, MG | 63-55 |
| Pg-08 | CI - 257 | Ijaci, MG | 63-15 |
| Pg-09 | ERIPARSA | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-10 | ERIPARSA | Ijaci, MG | 63-63 |
| Pg-11 | ERIPARSA | Ijaci, MG | 63-63 |
| Pg-12 | RC-I-3 | Ijaci, MG | 63-23 |
| Pg-13 | MAI-6-10 | Ijaci, MG | 63-55 |
| Pg-14 | ANLAV-51 | Ijaci, MG | 63-7 |
| Pg-15 | ESAL 502 | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-16 | - | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-17 | - | Ijaci, MG | 63-31 |
| Pg-18 | - | Ijaci, MG | 63-63 |
| Pg-19 | - | Lavras, MG | 63-47 |
| Pg-20 | - | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-21 | - | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-22 | - | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-23 | Batatinha | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-24 | RC ^{1/} | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-25 | RC | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-26 | Batatinha | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-27 | RC x Talismã | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-28 | Jalo | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-29 | Jalo | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-30 | Jalo | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-31 | Jalo | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-32 | Jalo | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-33 | F1 (PA3) | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-34 | RC | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-35 | RC | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-36 | RC | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-37 | RC | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-38 | Carioca | Alterosa, MG | 63-27 |

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

| | | | |
|-------|----------------------|--------------|-------|
| Pg-39 | Jalo | Lavras, MG | 63-15 |
| Pg-40 | Small White | Lavras, MG | 55-15 |
| Pg-41 | Mulatinho Vagem Roxa | Lavras, MG | 63-31 |
| Pg-42 | CIII-R-3-19 | Alterosa, MG | 63-63 |
| Pg-43 | Talismã | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-44 | Talismã | Lavras, MG | 63-25 |
| Pg-45 | Talismã | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-46 | Talismã | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-47 | Talismã | Lavras, MG | 63-63 |
| Pg-48 | Talismã | Ijaci, MG | 63-63 |

^{1/} RC: Progenies oriundas do programa de seleção recorrente para resistência à mancha-angular.

Nietsche et al. (2002) verificaram a ocorrência de diferentes patótipos em um mesmo município. Sartorato (2002), ao estudar a variabilidade de isolados de *P. Griseola* em cinco estados do Brasil, verificou a existência de diferentes patótipos ocorrendo em um mesmo estado e inclusive, diferentes padrões de virulência no mesmo município. No trabalho os três isolados coletados em Lavras, MG, foram classificados em três patótipos diferentes (31-23, 63-31 e 63-39). Estudos conduzidos por Sartorato (2004), reafirmaram a elevada variação patogênica em dois municípios de Goiás com a identificação de dez patótipos diferentes para Damolândia e Inhumas.

Entre os patótipos identificados, o que apresentou maior dispersão foi o patótipo 63-63, sendo identificado nos três municípios onde foram realizadas coletas de isolados. A ampla distribuição dos patótipos foi confirmada em alguns trabalhos realizados no Brasil e no mundo. Jara et al. (2001) verificaram a ocorrência de 120 patótipos diferentes em 22 países do mundo e, entre os patótipos identificados, 71 deles ocorreram especificamente em um país. Trabalhos realizados no Brasil por Nietsche et al. (2002) e Sartorato (2002) também evidenciaram a ampla distribuição deste patógeno.

TABELA 2 Identificação de patótipos baseada na reação das 12 cultivares diferenciadoras inoculadas com 48 isolados de *P. griseola* coletados nos municípios de Alterosa, Ijací, Lavras, Minas Gerais.

| Patótipos | Cultivares diferenciadoras | | | | | | | | | | | | n° de isolados |
|-----------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Andinas ^a | | | | | | Mesoamericanas ^b | | | | | | |
| | 2 ⁰ | 2 ¹ | 2 ² | 2 ³ | 2 ⁴ | 2 ⁵ | 2 ⁰ | 2 ¹ | 2 ² | 2 ³ | 2 ⁴ | 2 ⁵ | |
| Lavras | | | | | | | | | | | | | 27 |
| 55-15 | + ^c | + | + | - ^d | + | + | + | + | + | - | - | - | 1 |
| 63-15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 1 |
| 63-25 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | 1 |
| 63-31 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 6 |
| 63-47 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 1 |
| 63-63 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 17 |
| Ijací | | | | | | | | | | | | | 19 |
| 63-07 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 1 |
| 63-15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 2 |
| 63-23 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | 1 |
| 63-31 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 6 |
| 63-47 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 2 |
| 63-55 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | 2 |
| 63-63 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 5 |
| Alterosa | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 63-27 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | 1 |
| 63-63 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 1 |
| Total | 48 | 48 | 48 | 47 | 48 | 48 | 48 | 47 | 46 | 44 | 40 | 28 | 48 |

^a 2⁰ - Don Timóteo; 2¹ - G11796; 2² - Bolón Bayo; 2³ - Montcalm; 2⁴ - Amendoin; 2⁵ - G5686.

^b 2⁰ - Pan 72; 2¹ - G2858; 2² - Flor de Mayo; 2³ - Mexico 54; 2⁴ - BAT 332; 2⁵ - Cornell 49-242.

^c Reação compatível (+).

^d Reação incompatível (-).

Os patótipos 63-15, 63-31, 63-47 e 63-63 foram observados nos municípios de Lavras, MG e Ijací, MG. No entanto, os patótipos 55-15 e 63-25 ocorreram somente no município de Lavras, enquanto os patótipos 63-07, 63-23 e 63-55 foram identificados, apenas no município de Ijací. Entre os dois isolados estudados de Alterosa, foram obtidos dois patótipos, o 63-63 e o 63-27, sendo o segundo encontrado apenas neste município. Os patótipos 63-7, 63-23, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63 já haviam sido identificados, em Minas Gerais, por Nietsche et al. (2002). Até o momento ainda não havia sido relatado na literatura a presença dos patótipos 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 no estado de Minas Gerais. Quanto aos patótipos 55-15, 63-25 e 63-27, foi o primeiro relato da ocorrência dos patótipos no Brasil.

Todos os patótipos (63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) identificados neste estudo, exceto o patótipo 55-15, causam doença em todas as cultivares andinas (Tabela 2). Este trabalho revelou a existência de isolados altamente patogênicos em ambos os conjuntos de cultivares diferenciadoras (andinas e mesoamericanas), e, como a quase totalidade dos isolados foram coletados em cultivares de feijão que apresentavam sementes pequenas ou médias, pode-se considerar que todos os isolados estudados pertencem ao conjunto gênico mesoamericano. Estes resultados reafirmam os trabalhos de Pastor-Corrales (1995) sobre a co-evolução patógeno-hospedeiro, e neste caso, especificamente dos isolados provenientes de Alterosa, Jaci e Lavras com feijões do grupo mesoamericano. No estado de Minas Gerais, a maioria dos produtores cultiva grãos tipo Carioca, favorecendo a seleção de patótipos de origem mesoamericana, devido à pressão de seleção do hospedeiro sobre o patógeno. Pesquisas realizadas com isolados coletados no Brasil (Nietsche et al., 2001; Nietsche et al., 2002; Sartorato, 2002; Sartorato, 2004; Vital, 2006) evidenciaram a ocorrência de reações compatíveis entre os isolados e as

cultivares andinas e mesoamericanas, classificando-os como isolados de origem mesoamericana.

A ocorrência de co-evolução entre patógeno e hospedeiro reflete diretamente nas estratégias a serem propostas em um programa de melhoramento que vise à obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular (Miklas et al., 2006), visto que somente a incorporação de fontes de resistência de cultivares andinas ou mesoamericanas pode não ser eficiente para controlar a mancha-angular, como proposto por Miklas et al. (2006).

O sucesso de cultivares resistentes à doença depende, em grande parte, do seu uso estratégico, isto é, do manejo da resistência. Processos dinâmicos que afetam a população de fitopatógenos podem reduzir a efetividade de alelos de resistência, por permitirem a alteração de suas proporções numa população; a introdução de genes não presentes numa população por fluxo gênico de uma para outra; a alteração ao acaso na frequência de alelos de uma população pela deriva genética e a predominância de determinados genótipos, advinda da seleção de indivíduos mais adaptados (Mizubuti, 2002).

Considerando que a resistência genética à mancha-angular seja monogênica, a piramidação de alelos de resistência de ambos os conjuntos gênicos, como proposta por alguns pesquisadores (Mahuku et al., 2002a; Sartorato, 2004; Miklas et al., 2006), pode ser uma estratégia de controle eficiente.

Além da piramidação, o emprego de multilinhas, embora o princípio seja semelhante ao da piramidação, pode ser utilizado como estratégia eficiente de controle, pois atua reduzindo a quantidade inicial de inóculo, a taxa de progressão do aumento do inóculo e atua como barreira física. Adicionalmente, permite um controle mais eficiente do aparecimento de patótipos com amplo espectro de virulência, os superpatótipos (Casela, 2002).

Considerando que exista também resistência quantitativa, estratégias diferentes às que vêm sendo aplicadas devem ser priorizadas. Surge, então, como uma boa alternativa, a seleção recorrente, que proporciona o acúmulo de alelos favoráveis para resistência em uma mesma linhagem (Ramalho et al., 2001). Amaro et al. (2007) avaliaram a eficiência da seleção recorrente fenotípica na obtenção de linhagens resistentes à mancha-angular e observaram, ao final de cinco ciclos de seleção, ganhos em torno de 6,4% por ciclo seletivo. Estes ganhos são expressivos e reforçam a possibilidade de um controle mais complexo para esse caráter. Os autores enfatizam a ocorrência de variabilidade para seleção após o quinto ciclo de seleção recorrente, realçando a importância e eficiência desse método. Essa variabilidade pode ser mantida a longo prazo, visto que se pode introduzir novas fontes de resistência para serem recombinadas, juntamente com as progênies selecionadas a cada fase de recombinação (Amaro et al., 2007).

Os isolados Pg-24, Pg-25, Pg-27, Pg-34, Pg-35, Pg-36 e Pg-37, foram coletados nos experimentos de Amaro et al. (2007), na safra da seca, sob condições naturais de campo. Verificou-se que, exceto o isolado Pg-27 (patótipo 63-31), todos os outros foram classificados como patótipo 63-63, indicando o amplo espectro de virulência destes isolados, que pode ter sido resultado da alta pressão de seleção do hospedeiro sobre o patógeno, visto que foram utilizados 17 genótipos para se obter os híbridos biparentais e, entre estes, dez são, reconhecidamente, fontes de resistência.

Vale ressaltar que, entre os genótipos utilizados no programa de seleção recorrente visando resistência à mancha-angular, havia germoplasma de origem andina e mesoamericana. É necessário salientar que os genótipos sobre os quais foram coletados estes isolados já haviam passado por seleção em etapas anteriores. Portanto, sugere-se o uso de inoculação artificial para auxiliar no processo de seleção dos genótipos a serem recombinados a cada ciclo de seleção

recorrente, bem como a incorporação de novas fontes de resistência aos patótipos predominantes no estado de Minas Gerais. Uma das vantagens da seleção recorrente é permitir que novas fontes de resistência possam ser adicionadas ao longo dos ciclos seletivos, permitindo uma flexibilização ao programa de melhoramento (Amaro et al., 2007).

Pastor-Corrales et al. (1998) ao realizarem a avaliação de 22.832 acessos do CIAT, em experimentos de campo e casa de vegetação, verificaram que apenas 59 foram classificados como intermediários (notas de 4 a 6) e 64 foram considerados resistentes (notas de 2 a 3), e que, entre estes 123 acessos que foram classificados como intermediários ou resistentes em campo, somente 19 apresentaram reações similares, quando testados em casa de vegetação, os quais se constituem em valiosas fontes de germoplasma para serem utilizados em trabalhos futuros. Além disso, alguns desses acessos foram considerados imunes sob casa de vegetação. De acordo com os autores isto pode ter sido em função das plantas terem sido avaliadas com três semanas após a inoculação não atingindo a fase de maturação. Os autores enfatizam que os dois tipos de ensaios realizados simultaneamente fortalecem as conclusões sobre a resistência dos acessos.

A reação às raças 31-17, 63-19, 63-23 e 63-55 de *P. griseola*, foi testada sobre 58 cultivares de feijoeiro (Oliveira et al., 2004). Foi verificado que as cultivares Antioquia 8, CAL 143, Ecuador 299 e México 235 foram resistentes às quatro raças testadas. Os autores sugeriram que estas cultivares poderão ser úteis em programas de melhoramento que visem a incorporação de alelos de resistência de origem andina ou mesoamericana.

Os patótipos identificados em maior frequência foram os patótipos 63-31 e 63-63 (Figura 1), os quais correspondem a 25% e 47,92%, respectivamente, do total dos isolados estudados. Individualizando o levantamento realizado em cada

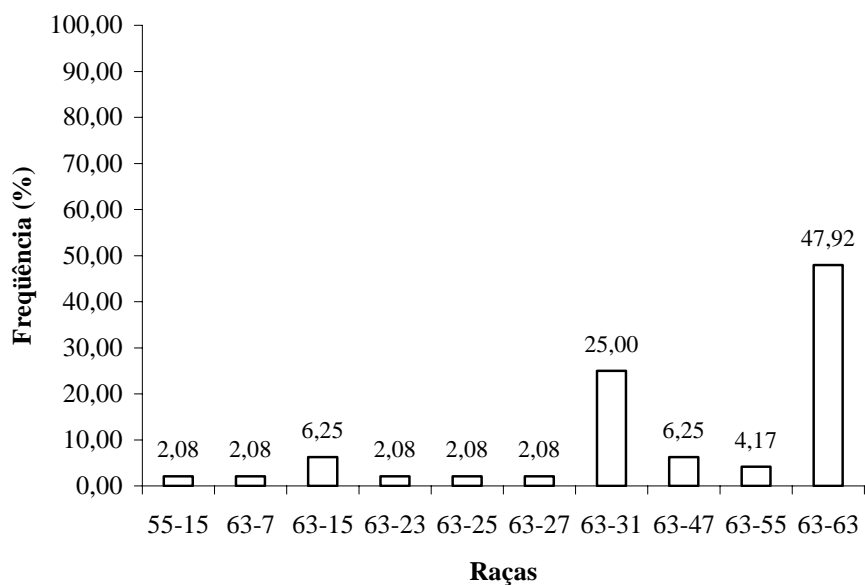


FIGURA 1 Patótipos identificados e suas respectivas frequências.

município, percebe-se que, em Lavras, o patótipo 63-63 foi o mais frequente, enquanto que em Ijaci foi o patótipo 63-31.

Como já evidenciado na literatura (Nietsche et al., 2002; Sartorato, 2002; Sartorato, 2004; Sartorato & Alzate-Marin, 2004), verifica-se que os patótipos 63-31 e 63-63 têm se destacado entre os mais frequentes no Brasil. Isso demonstra a ampla adaptação desses patótipos às diferentes regiões, facilitada pelo livre intercâmbio de grãos utilizados como sementes entre os estados. Além disso, a reutilização de grãos como sementes potencializa as chances de contaminação dos campos de produção.

A maior frequência do patótipo 63-63, detectada neste trabalho, é preocupante, do ponto de vista de melhoramento genético. O amplo espectro de patogenicidade deste patótipo sugere a necessidade de uma busca contínua por

novas fontes de resistência à mancha-angular (Nietsche et al., 2001; Sartorato, 2004).

Estudos realizados por Nietsche et al. (2002), indicam que dentre os patótipos obtidos o 63-39 apresentou a maior frequência, no município de Lavras, MG. No presente levantamento, não foi observada a presença deste patótipo, demonstrando a necessidade da realização de monitoramento nos campos de produção, em função das características de manejo, cultivares e condições ambientais específicas. Em contrapartida, Nietsche et al. (2002) verificaram a ocorrência dos patótipos 63-31 (dois isolados) e 63-63 (um isolado) em baixa frequência. Confrontando-se os resultados de Nietsche et al. (2002) com os deste estudo verifica-se, portanto, que, provavelmente, houve uma evolução do patógeno, pois, neste trabalho, os patótipos 63-31 e 63-63 são os mais frequentes.

O número de patótipos diferentes (10) reafirma a variabilidade patogênica existente. No entanto, objetivando conhecer melhor a evolução do patógeno, o número e a frequência de isolados infectando cada cultivar diferenciadora foram determinados (Tabela 2 e Figura 2). A Figura 2 representa uma comparação entre o padrão de infecção dos isolados sobre as cultivares diferenciadoras neste trabalho e de estudos realizados nos últimos anos, no estado de Minas Gerais (Nietsche et al., 2001; Nietsche et al., 2002; Sartorato, 2002). Esta comparação permite inferir que o fungo *P. griseola* tem adquirido novos alelos para virulência.

Associando-se os dados da Figura 2 com o aumento da frequência das patótipos 63-31 e 63-63, pode-se fazer alusão à idéia de Vanderplank (1968), em que a adaptação dos patótipos ocorre em função do número de alelos desnecessários para virulência. Neste caso, ocorreu a seleção direcional que consiste na seleção que ocorre na população do patógeno, aumentando a frequência do patótipo necessária para superar a resistência do hospedeiro.

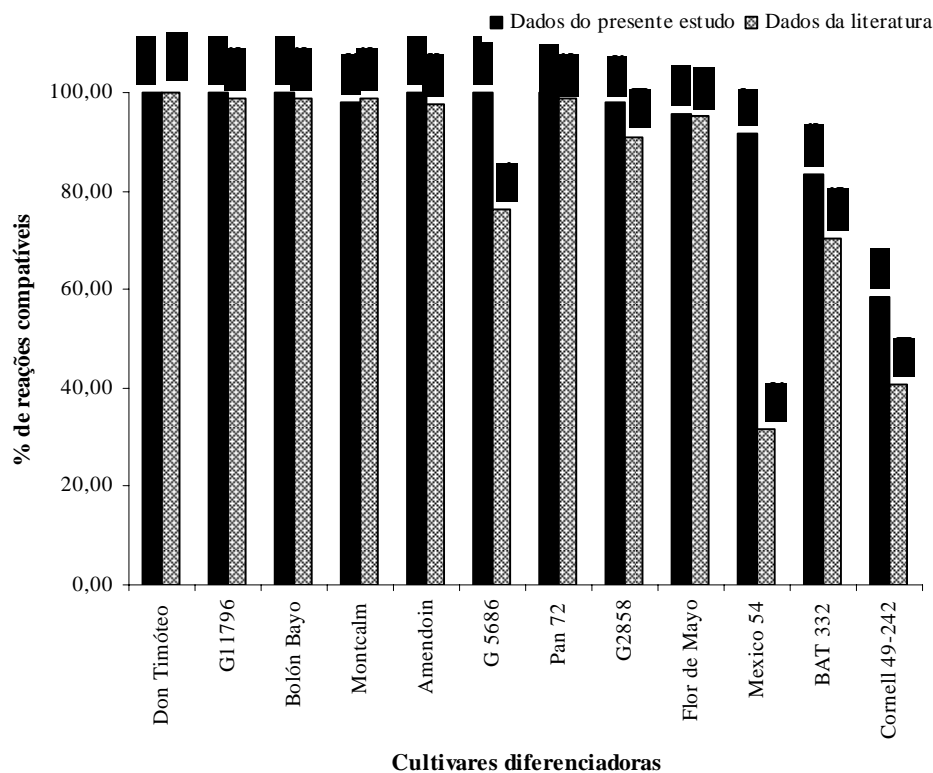


FIGURA 2 Percentagem de reações compatíveis entre as cultivares diferenciadoras e os isolados estudados. A – dados do presente trabalho. B – dados compilados de estudos sobre isolados de *P. griseola*, dos últimos 10 anos, em Minas Gerais.

Visualiza-se, na Figura 2, que as cultivares mesoamericanas BAT 332 e Cornell 49-242, possuidoras dos alelos de resistência *Phg-6²* e *Phg-3*, respectivamente, apresentam-se como fontes de resistência viáveis a serem utilizadas em programas de melhoramento, para esses locais. A combinação dos alelos presentes nessas duas cultivares oferece uma boa alternativa de estratégia para a o controle desta doença. Já Sartorato & Alzate-Marin (2004), ao

realizarem levantamento na literatura sobre a variabilidade patogênica de *P. griseola* no Brasil, entre os anos de 1996 e 2004, observaram que as cultivares mesoamericanas México 54 (*Phg-2*, *Phg-5* e *Phg-6*), Cornell 49-242 (*Phg-3*) e BAT 332 (*Phg-6*²) eram as cultivares mais resistentes no Brasil e a associação dos alelos presentes nestas três cultivares confere resistência a todos os patótipos identificados, exceto ao patótipo 63-63. Consideraram, ainda, que as cultivares andinas, G5686 e Amendoin, são importantes fontes de resistência.

Pode-se destacar, ainda, que o emprego cada vez mais intensivo de novas fontes de resistência pode ter favorecido a dinâmica populacional dos patótipos ao longo do tempo. Essa afirmação corrobora com o fato de estes isolados terem sido coletados, em sua maioria, em áreas experimentais, onde são cultivadas várias linhagens diferentes.

A seleção tem sido a força evolutiva mais estudada e, provavelmente, é a mais facilmente manejada em sistemas agrícolas. Quando um alelo para resistência é amplamente distribuído, ocorre uma forte seleção direcional que dirige o incremento na frequência de mutantes virulentos, até que a resistência deste alelo seja quebrada (McDonalds & Linde, 2002). As principais forças seletivas podem ser impostas pelo grau de especialização das interações patógeno-hospedeiro, medidas de controle ou limitações ambientais (Mahuku et al., 2002a). Estes fatores atuam gerando diferenças na distribuição genotípica e fenotípica da variação entre as populações de fitopatógenos, que podem levar a uma elevada variação genética. É possível que alguns fatores atuem, isolados ou em combinação, para gerar um novo patótipo, incrementando os níveis de diversidade genética (Mahuku et al., 2002a).

4 CONCLUSÕES

Foi constatada ampla variabilidade patogênica entre os isolados de *P. griseola* avaliados.

Os patótipos 55-15, 63-15, 63-25 e 63-27 não haviam sido detectados no estado de Minas Gerais. Este é o primeiro relato da ocorrência dos patótipos 55-15, 63-25 e 63-27 no Brasil.

Os patótipos 63-31 e 63-63 são predominantes na região estudada, portanto, esforços devem ser direcionados para a obtenção de fontes de resistência a estes patótipos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO, G. B.; ABREU, A. DE F. B.; RAMALHO, M. A. P.; AND SILVA, F. B. Phenotypic recurrent selection in the common bean with Carioca-type grains for resistance to *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, 2007. In Press.

BUSOGORO, J. P.; JIJAKLI, M. H.; LEPROIVE, P. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 559-569, Sept. 1999.

CARDONA-ALVAREZ, C.; WALKER, J. C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v. 16, n. 11, p. 610-615, Nov. 1956.

CASELA, C. R. Influência do hospedeiro na estrutura populacional de patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 35, ago. 2002, Suplemento.

CIAT. Standard System the Evaluation of Bean Germoplasm. van SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. compilers. Cali, Colômbia: CIAT, 1987. 54 p.

CORREA-VICTORIA, F. J.; PASTOR-CORRALES, M. A.; SAETTLER, A. W. Angular leaf spot. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean productions problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 59-76.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTAS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 600-607, May 1995.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, London, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, Sept. 1970.

JARA, C.; CASTELLANO, G.; MAHUKU, G. Estado actual y proyección de la investigación relacionada com la mancha angular del frijol (*Phaeoisariopsis griseola*). **Fitopatología Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2001.

- KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungifacts and perspectives. **BioEssays**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 652-659, Aug. 1998.
- KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.
- LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.
- MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 594-604, Oct. 2002a.
- MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the afro-andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, June 2002b.
- MAHUKU, G.; MONTROYA, C.; HENRÍQUEZ, M. A.; JARA, C.; TERAN, H.; BEEBE, S. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1817-1824, Sept./Oct. 2004.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, p. 163-180, 2002.
- MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, Jan. 2006.
- MIZUBUTI, E. S. G. O vértice – biologia de populações e manejo de doenças. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 37, ago. 2002. Suplemento.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 331-335, out./dez. 2002.

NIETSCHE, S.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A. DE; PAULA JR., T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wagening, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.

OLIVEIRA, E. J. de; ALZATE-MARIN, A. L.; BORÉM, A.; MELO, C. L. P.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 220-223, mar./abr. 2004.

OROZCO, S.; ARAYA, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 589-593, nov./dez. 2005.

PASTOR-CORRALES, M. A.; AGGARWAL, V. A.; CHIRWA, R. M.; BURUCHARA, R. A. Andean beans with resistance to angular leaf spot and virulence diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Southern and Eastern Africa. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 129-130, 2004.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 2, p. 161-171, 1998.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. dos. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 201-230.

SARTORATO, A. Identificarion of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five states in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 78-81, jan./mar. 2002.

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goias, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385-390, Aug. 2004.

SAROTATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 235-236, 2004.

SARTORATO, A.; THUNG, M. **Determinação da variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* e avaliação da mancha-angular**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_132/132_4.htm>. Acesso em: 05 jan. 2007.

SCHWARTZ, H. F.; CORREA, F. J.; PENEDA, P. A.; OTOYA, M. M.; KATHERMAN, M. J. Dry bean yields losses caused by Ascochyta, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 494-496, June 1981.

SILVEIRA, G. A. **Evaluación de la resistencia de frijol a la mancha angular: algunos aspectos fisiológicos de *Isariopsis griseola* Sacc. y patogenicidad de algunas cepas colectadas en Costa Rica**. 1967. 60 p. Tese (Mestrado) - Turrialba: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas da OEA.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 68, n. 4/6, p. 158-167, Apr./June 2006.

STENGLEIN, S. A.; FERMOSELLE, G. E.; BALATTI, P. A. Pathogenic and molecular studies of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 48, n. 1, p. 92-93, 2005.

VANDERPLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206 p.

VITAL, W. M. ***Phaeoisariopsis griseola*: caracterização fisiológica, fontes de resistência e reação do feijoeiro**, 2006. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP.

WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; KIMENJU, J. W.; BURUCHARA, R. A. Occurrence and distribution of Andean, Afro-Andean and Mesoamerican pathotypes of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 239-240, 2004.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Phaeoisariopsis* *griseola* POR MEIO DE MARCADORES RAPD

RESUMO

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores RAPD**. 2007. p. 77-111. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma das mais importantes doenças desta cultura no Brasil. O desenvolvimento de uma estratégia para controlar e ou reduzir o impacto do fungo *P. griseola* requer um conhecimento prévio da estrutura populacional do patógeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a diversidade genética e a estrutura genética de populações entre isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais e Goiás. Para este trabalho, foram selecionados 70 isolados de *P. griseola*, os quais foram caracterizados por meio de marcadores RAPD. Para a análise com os dados de marcadores moleculares, foram utilizados 19 *primers* de RAPD. Os *primers* amplificaram um total de 76 bandas polimórficas, totalizando, em média, quatro bandas polimórficas por *primer*. A similaridade genética entre os isolados variou de 0,301 a 0,993, com média de 0,746. As análises descritivas revelaram uma tendência de diferenciação dos isolados, por local de origem. A estimativa do índice de diversidade de Shannon revelou que, na cidade de Viçosa, MG, foi encontrada maior diversidade genética, enquanto que em Ijací, MG, a menor diversidade genética. A diversidade genética de Nei foi decomposta e verificou-se $H_T = 0,3535$. A diferenciação genética entre as populações estudadas foi de 0,1979 (G_{ST}). Portanto, 80,21% da variação deve-se a variação dentro das populações. A AMOVA demonstrou que 77,51% da variação está contida dentro de cidades e 22,49% entre cidades. Foi realizada uma comparação par a par dos 76 locos polimórficos estudados. Foram obtidos valores de desequilíbrio gamético significativamente diferente de zero para as populações estudadas (teste de Fisher, $P < 0,05$), mostrando que *P. griseola* mantém uma estrutura genética consistente com a reprodução assexual.

*Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

ABSTRACT

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Characterization of *Phaeoisariopsis griseola* isolates by RAPD markers**. 2007. p. 77-111. Thesis (Plant Genetics and Breeding Program) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Angular leaf spot disease of common bean (*Phaseolus vulgaris*), caused by *Phaeoisariopsis griseola*, is one of the most important of this crop in Brazil. The development of a strategy to control and or reduce the impact of *P. griseola* requires a previous knowledge of the population structure. Therefore, the purpose of this study was to investigate the genetic diversity and population's genetic structure among *P. griseola* isolates collected in Minas Gerais and Goiás state, Brazil. Seventy isolates were characterized by RAPD markers. Nineteen RAPD *primers* were used in the molecular analysis. The *primers* amplified a total of 76 polymorphic bands, with average of 4.0 polymorphic bands per *primer*. The genetic similarity among the isolates varied from 0.301 to 0.993, with average of 0.746. The descriptive analyses revealed a tendency of differentiation of isolates for origin areas. The Shannon diversity index revealed that Viçosa, MG, presented the largest genetic diversity, whereas Ijaci, MG, presented the smallest genetic diversity. The total Nei's genetic diversity was partitioned ($H_T = 0.3535$). The genetic differentiation among the populations was 0.1979 (G_{ST} value). Therefore, 80.21% of the genetic variation observed in this study was due to differentiation within populations. AMOVA demonstrated that 77.51% of the variation was contained within places and 22.49% among places. Pairwise comparisons of 76 polymorphic RAPD loci gave disequilibrium values that were all significantly different from zero (Fisher's exact test, $P < 0.05$) for studied populations, showing that *P. griseola* maintains a genetic structure consistent with asexual reproduction.

*Advisor: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

1 INTRODUÇÃO

Phaeoisariosis griseola (Sacc.) Ferraris é o agente causal da mancha angular do feijoeiro, doença que pode provocar perdas na produção superiores a 80% (Liebenberg & Pretorius, 1997; Schwartz et al., 1981; Saettler, 1991). A ocorrência desta doença foi relatada em mais de 78 países do mundo (Liebenberg & Pretorius, 1997). Nos últimos anos, ela se tornou uma das mais importantes no Brasil, podendo proporcionar perdas maiores que 80% na produção, dependendo da suscetibilidade das cultivares, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura (Sartorato, 2004). Em adição, são registradas perdas de qualidade das sementes e ou grãos, redução do valor de mercado e disponibilidade de sementes (Pastor-Corrales et al., 1998).

O uso de cultivares resistentes é a estratégia mais eficiente e econômica, além de não promover danos ao ambiente, para a obtenção de altas produtividades. O desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular é dificultado pela elevada variabilidade patogênica apresentada pelo fungo *P. griseola*. Assim, o entendimento da variabilidade genética do patógeno é um importante pré-requisito para o desenvolvimento e o emprego de cultivares resistentes à mancha-angular.

Não obstante ao elevado nível de variabilidade genética detectado entre isolados do fungo *P. griseola*, eles podem ser agrupados em dois conjuntos gênicos, andino e mesoamericano. Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales & Jara (1995) revelaram o processo de co-evolução entre o patógeno e o conjunto genético hospedeiro, de acordo com o centro de origem, ou seja, isolados de origem andina infectam cultivares do conjunto genético andino e, enquanto que, isolados de origem mesoamericana infectam cultivares do conjunto genético

mesoamericano, preferencialmente, mas também possuem capacidade de infectar, cultivares de origem andina.

Elevada variação genética foi registrada previamente, por meio de marcadores moleculares, em alguns estudos realizados no Brasil e no mundo (Busogoro et al., 1999; Mahuku et al., 2002b; Sartorato, 2004; Wagara et al., 2004). Busogoro et al. (1999) observaram elevada variabilidade genética entre isolados de *P. griseola* na África e a existência de padrões RAPD similares entre isolados coletados em diferentes locais, sugerindo uma possível ocorrência de migração entre isolados de diferentes locais. Mahuku et al. (2002b) verificaram níveis significativos de diferenciação genética ($G_{ST} = 0,39$) entre isolados andinos obtidos na África e América Latina. Falta de especificidade dos isolados de acordo com a sua região de origem foi observada por Sartorato (2004). Wagara et al. (2004) estudaram 50 isolados de *P. griseola*, obtidos no Kenya, verificaram alto nível de variabilidade genética entre os isolados e obtiveram baixo nível de diferenciação genética entre populações (9,3%) em detrimento da variação dentro das populações (90,7%).

Devido à elevada variabilidade do fungo *P. griseola*, o sucesso de um programa de melhoramento que vise à obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular requer o conhecimento da estrutura genética de populações de uma dada região. Tal conhecimento é crucial para determinar a adoção de estratégias para a obtenção de cultivares resistentes. Entretanto, no Brasil, existe uma carência de estudos que objetivem o conhecimento da estrutura populacional deste fungo.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a variabilidade genética de isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais por meio do uso do marcador molecular RAPD e fornecer informações sobre a estrutura genética da população amostrada, para orientar os programas de melhoramento genético que visam ao desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Phaeoisariopsis griseola*

Foram selecionados 70 isolados de *P. griseola*, dos quais 58 pertencem à micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e 12 foram cedidos pelo Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão – CNPAF/Embrapa. Estes isolados foram coletados de cultivares de feijão que apresentavam sintomas de mancha-angular em condições de campo e são provenientes de quatro municípios do estado de Minas Gerais e de um município do estado de Goiás (Tabela 1).

TABELA 1 Isolados, cultivares e município de origem dos isolados de *P. griseola*.

| Isolados | Cultivar | Município – Estado | TC ^{1/} | Patótipo |
|----------|--------------|--------------------|------------------|----------|
| Ig - 792 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 799 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Ig - 802 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Ig - 806 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 808 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Ig - 809 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 822 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Ig - 828 | Emgopa Ouro | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 854 | Jalo Precoce | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 860 | Jalo Precoce | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Ig - 865 | Jalo Precoce | Damolândia, GO | C | 63-31 |
| Ig - 868 | Jalo Precoce | Damolândia, GO | C | 63-63 |
| Pg - 01 | CV-13 | Ijaci, MG | E | 63-47 |
| Pg - 02 | CV-78 | Ijaci, MG | E | 63-15 |
| Pg - 03 | ESAL 507 | Ijaci, MG | E | 63-47 |
| Pg - 04 | Z-22 | Ijaci, MG | E | 63-63 |

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

| | | | | |
|---------|----------------------|-------------|---|-------|
| Pg - 05 | CV-78 | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 06 | MAI - 8-13 | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 07 | LH-10 | Ijaci, MG | E | 63-55 |
| Pg - 08 | CI - 257 | Ijaci, MG | E | 63-15 |
| Pg - 09 | ERIPARSA | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 10 | ERIPARSA | Ijaci, MG | E | 63-63 |
| Pg - 12 | RC-I-3 | Ijaci, MG | E | 63-23 |
| Pg - 15 | ESAL 502 | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 16 | - | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 17 | - | Ijaci, MG | E | 63-31 |
| Pg - 19 | - | Lavras, MG | E | 63-47 |
| Pg - 20 | - | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 21 | - | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 23 | Batatinha | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 24 | RC ^{2/} | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 25 | RC | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 26 | Batatinha | Lavras, MG | E | 63-31 |
| Pg - 27 | RC x Talismã | Lavras, MG | E | 63-31 |
| Pg - 28 | Jalo | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 31 | Jalo | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 32 | Jalo | Lavras, MG | E | 63-31 |
| Pg - 33 | F1 (PA3) | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 34 | RC | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 35 | RC | Lavras, MG | E | 63-63 |
| Pg - 41 | Mulatinho Vagem roxa | Lavras, MG | E | 63-31 |
| Pg - 45 | Talismã | Lavras, MG | C | 63-63 |
| Pg - 46 | Talismã | Lavras, MG | C | 63-63 |
| Pg - 47 | Talismã | Lavras, MG | C | 63-63 |
| Pg - 48 | Talismã | Ijaci, MG | E | 63-63 |
| Pg - 50 | CNFC 10443 | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 51 | CNFC 8065 | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 52 | CNFC 10453 | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 53 | Roxo 90 | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 54 | MN 3420 | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 55 | A-95 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 56 | A-114 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 57 | A-82 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 58 | A-97 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 59 | A-125 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 60 | A-118 | Lavras, MG | E | - |

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

| | | | | |
|---------|---------------|-------------|---|---|
| Pg - 61 | Small White | Lavras, MG | E | |
| Pg - 62 | Carioca MG | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 63 | Carioca MG | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 64 | VC-3 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 65 | RC | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 67 | RC | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 68 | RC | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 69 | OP-NS-331 | Lavras, MG | E | - |
| Pg - 70 | Roxo/vermelho | Viçosa, MG | E | - |
| Pg - 71 | Jalo/Pintado | Viçosa, MG | E | - |
| Pg - 72 | - | Viçosa, MG | E | - |
| Pg - 73 | Jalo | Viçosa, MG | E | - |
| Pg - 74 | - | Lambari, MG | E | - |
| Pg - 75 | - | Lambari, MG | E | - |

^{1/} TC: tipos de cultivo. C: campo de produção; E: campo experimental.

^{2/} RC: progênies oriundas do programa de seleção recorrente para resistência à mancha-angular.

2.2 Obtenção das culturas monospóricas

Foram obtidas culturas monospóricas a partir de cada isolado amostrado, totalizando 70 monocultivos (Sartorato, 2004). As culturas monospóricas foram realizadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e armazenadas à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e ausência de luz por, aproximadamente, 15 dias.

2.3 Obtenção de massa micelial

Após a obtenção da colônia monospórica, procedeu-se a retirada de cinco a seis pequenos discos de meio de cultura contendo micélio do fungo de cada um dos 70 isolados e posterior transferência para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido (200 g.L^{-1} de batata e 10 g.L^{-1} de

glucose). Estes frascos foram mantidos a 24°C em incubadora (Shaker), com agitação, na rotação de 110-120 RPM por, aproximadamente, 15 dias.

Após a obtenção de massa micelial foi realizada a filtração e por meio do uso de bomba a vácuo a umidade remanescente foi retirada. O micélio de cada cultura monospórica foi acondicionado em vidraria e congelado a -20°C.

2.4 Extração de DNA total

O DNA foi extraído de acordo com a metodologia desenvolvida por Raeder & Broda (1985) modificada. A massa micelial foi transferida para almofariz de porcelana e macerada em 10 ml de tampão de extração com CTAB a 65°C, juntamente com 30 µl de β-mercaptoetanol, com auxílio de areia esterilizada e nitrogênio líquido. O tampão de extração continha 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH = 8,0), 20 mM de EDTA (pH = 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona).

Após o procedimento de maceração, o material foi mantido em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos, sendo agitado, por suaves inversões, a cada 10 minutos; seguido de resfriamento durante cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 mL da solução clorofórmio: álcool isoamil (24:1), seguidos da homogeneização e centrifugação, durante 10 minutos, a 4.000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30 mL da solução álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e levado ao freezer (-20°C) por seis horas, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7). O DNA dissolvido foi submetido a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil, sendo o sobrenadante coletado e misturado com o triplo de seu volume com álcool a 95%:acetato de sódio 3M (20:1) e mantido no freezer (-20°C), por seis horas, no mínimo. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada e o DNA dissolvido em 50-100 µL de TE.

A quantificação de DNA foi realizada com auxílio de um fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100. Para isso, foram utilizados 2 μL da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4), juntamente com 0,1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE, para uma concentração de 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, para as reações RAPD.

2.5 Marcador RAPD

Foram avaliados 19 *primers*, sendo selecionados os seguintes: OP AN11, OP AP18, OP AQ01, OP AQ02, OP AQ03, OP AQ04, OP AQ08, OP AS03, OP AS04, OP AS05, OP AS06, OP AS07, OP AS08, OP AS11, OP AS15, OP AS19, OP AT19, OP BB06 e OP BB08. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331. O volume total da reação corresponde a 14 μL , correspondendo a 4 μL de água, 35 ng de DNA genômico, e 50 μM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,4 μM de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 50 mM de tris-HCl, pH 8,0, 2,0 mM de MgCl_2 ; 20 mM de KCl e 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase.

O processo de amplificação foi realizado da seguinte forma: 1) nos dois primeiros ciclos, a desnaturação do DNA foi feita a 94°C, por dois minutos, o anelamento a 37°C por 15 segundos e a alongação, a 72°C, por um minuto; 2) adicionalmente, mais 38 ciclos diferiram apenas no tempo de desnaturação (15 segundos). Após 40 ciclos, procedeu-se a extensão final por dois minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70 volts, durante 4,5 horas. Logo após, foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com a câmara fotográfica EDA - 290 da Kodak.

2.6 Estimativa da similaridade genética

Cada banda polimórfica foi tratada como um caráter único. Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1 (Tabela 1A), a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) das bandas polimórficas, presentes nas 70 amostras de DNA. A estimativa da similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de isolados, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da expressão (Rohlf, 1992).

$$sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

em que:

a : presença de bandas nos indivíduos i e j ;

b : presença de banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j ;

c : ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j .

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000). A matriz de similaridade genética gerada foi, então, usada para produzir um dendrograma pelo método da média das similaridades (UPGMA).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a seguinte expressão modificada de Skroch et al. (1992):

$$\text{Erro padrão estimado: } (s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \frac{1 - sg_{ij}}{n - 1}}$$

em que:

n é a soma de a , b e c , para cada par de isolados.

Os isolados geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma a partir da estimativa de valor máximo significativo de similaridade (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste de t , utilizando-se a seguinte expressão:

$$sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$$

em que:

t : é o valor tabelado da distribuição t de Student, a 1% de probabilidade, com $n-2$ graus de liberdade;

\bar{s}_{sg} : o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

A estimativa da diversidade dentro de cinco locais de coleta do patógeno, *P. griseola*, foi realizada utilizando-se o índice de Shannon, dado pela seguinte expressão:

$$H = -\sum p_i (\log_2 p_i)$$

em que:

p_i : é a proporção de indivíduos que possuem a banda em um determinado loco;

$\log_2 p_i$: é o logaritmo de p_i com base 2.

Foram obtidas as seguintes estatísticas descritivas: número e % de locos polimórficos (Lin et al., 1997) e heterozigosidade esperada (Nei, 1973). Estas análises foram realizadas no programa GDA (Genetic Data Analysis) versão 1.0 (Lewis & Zaikin, 2001).

Nei (1973) propõe a partição da diversidade genética em seus

componentes entre e dentro de populações.

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

em que:

H_T : diversidade total, estimada a partir das frequências alélicas médias de cada loco.

H_S : componente da diversidade dentro da população.

D_{ST} : componente da diversidade entre populações, dentro da espécie considerada.

A proporção da diversidade genética que é atribuída ao componente entre populações é estimada por:

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

2.7 Análise de variância molecular

A análise de variância molecular foi realizada com o auxílio do programa Arlequin 2.000 (Schneider et al., 2000). A análise foi realizada considerando-se uma estrutura hierárquica na qual os isolados coletados em cada município foram tratados como uma população. Um resumo desta análise de variância está apresentado na Tabela 2.

A variância genética total σ^2_T corresponde a: $\sigma^2_a + \sigma^2_b$.

TABELA 2 Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).

| Fonte de variação | Graus de liberdade | E(QM) |
|----------------------|--------------------|----------------------------|
| Entre categorias | $A - 1$ | $\sigma^2_b + n\sigma^2_a$ |
| Dentro de categorias | $N - A$ | σ^2_b |
| Total | $N - 1$ | σ^2_T |

A : Número de municípios amostrados; N : número total de isolados amostrados;

σ^2_a : componente de variância devido às diferenças entre municípios;

σ^2_b : componente de variância devido às diferenças entre amostras dentro de municípios;

n : valor ponderado em função do número diferente de indivíduos para cada

município de coleta. $n = \frac{N - \sum \frac{N_a^2}{N}}{A - 1}$, em que N_a^2 : número de indivíduos na população A (municípios).

Fonte: Adaptado de (Schneider et al., 2000).

Os componentes de variância foram testados a partir do coeficiente ϕ_{ST} , obtido pela expressão:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T}$$

em que:

ϕ_{ST} = corresponde à razão da variância entre categorias (municípios) pela variância total; representa o valor de indivíduos tomados ao acaso dentro de áreas de coleta, em relação a indivíduos tomados ao acaso em toda a amostra.

Na tentativa de esclarecer melhor a estrutura populacional deste patógeno, foi estimado o desequilíbrio de ligação dentro das populações de *P. griseola* que foram coletadas nos municípios de Ijaci (safra da seca/2005) e Lavras (safras da seca e inverno/2005). As bandas RAPD foram consideradas como locos únicos e a presença ou a ausência de bandas consideradas como alelos. O desequilíbrio de ligação foi calculado utilizando-se o programa Arlequin 2.000 (Schneider et al., 2000).

Para cada associação de locos estudada, a probabilidade foi testada pelo teste de Fisher e o método da cadeia de Markov. Uma associação foi considerada significativamente diferente de zero se o teste resultou em uma probabilidade menor que 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de marcadores moleculares

A análise da diversidade entre isolados de *P. griseola* foi realizada por meio de marcadores RAPD. Todas as reações, para cada *primer*, foram realizadas duas vezes e 19 *primers* foram selecionados para analisar a diversidade do fungo. Foram amplificadas, no total, 76 bandas polimórficas, as quais foram utilizadas para avaliação dos 70 isolados de *P. griseola* (Tabela 3). Número de bandas polimórficas idêntico foi utilizado por Stenglein & Balatti (2006), ao caracterizarem a variabilidade genética de isolados de *P. griseola* de 45 isolados coletados na Argentina. Número de bandas polimórficas inferior (14 bandas) a este foi usado por Sartorato (2004), ao estudar a variabilidade genética de isolados de dois municípios do estado de Goiás. Já Nietzsche et al. (2001) fizeram inferências a respeito da variabilidade genética no estado de Minas Gerais, utilizando um total de 26 bandas polimórficas.

Foram geradas, em média, quatro bandas polimórficas por *primer*. Já Stenglein & Balatti (2006) obtiveram média de 10,86 bandas polimórficas por *primer*, utilizando isolados procedentes da Argentina.

3.2 Avaliação da variabilidade genética

Foi construída uma matriz de similaridades genéticas por meio do coeficiente de similaridade de Dice, com base nas 76 bandas polimórficas (Tabela 2A). A similaridade genética entre os isolados variou de 0,301 a 0,993, com média de 0,746. Silva et al. (2007) obtiveram uma amplitude de 0,65 a 0,99 nas estimativas de similaridades genética para isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, o que indica que o fungo *P. griseola* possui maior variabilidade patogênica dentre os dois patógenos mais comuns do feijoeiro em Minas Gerais.

TABELA 3 Primers de RAPD que detectaram polimorfismo nos isolados de *P.griseola*, com suas respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas.

| Primer | Seqüências | N.º de bandas polimórficas |
|---------|------------------|----------------------------|
| OP AN11 | 5' GTCCATGCAG 3' | 5 |
| OP AP18 | 5' GTCGTCGACA 3' | 2 |
| OP AQ01 | 5' GGCAGGTGGA 3' | 3 |
| OP AQ02 | 5' ACCCTCGGAC 3' | 4 |
| OP AQ03 | 5' GAGGTGTCTG 3' | 4 |
| OP AQ04 | 5' GACGGCTATC 3' | 4 |
| OP AQ08 | 5' TCGGTAGACC 3' | 4 |
| OP AS03 | 5' ACGGTTCCAC 3' | 4 |
| OP AS04 | 5' GTCTTGGGCA 3' | 3 |
| OP AS05 | 5' GTCACCTGCT 3' | 2 |
| OP AS06 | 5' GGCGCGTTAG 3' | 3 |
| OP AS07 | 5' CACGAGCAGG 3' | 4 |
| OP AS08 | 5' GGCTGCCAGT 3' | 3 |
| OP AS11 | 5' ACCGTGCCGT 3' | 6 |
| OP AS15 | 5' CTGCAATGGG 3' | 5 |
| OP AS19 | 5' TGACAGCCCC 3' | 5 |
| OP AT19 | 5' ACCAAGGCAC 3' | 7 |
| OP BB06 | 5' CTGAAGCTGG 3' | 4 |
| OP BB08 | 5' TCGTCGAAGG 3' | 4 |
| Total | | 76 |

Na Figura 1 está representado o dendrograma construído a partir dos dados de similaridade genética e posterior agrupamento realizado pelo método

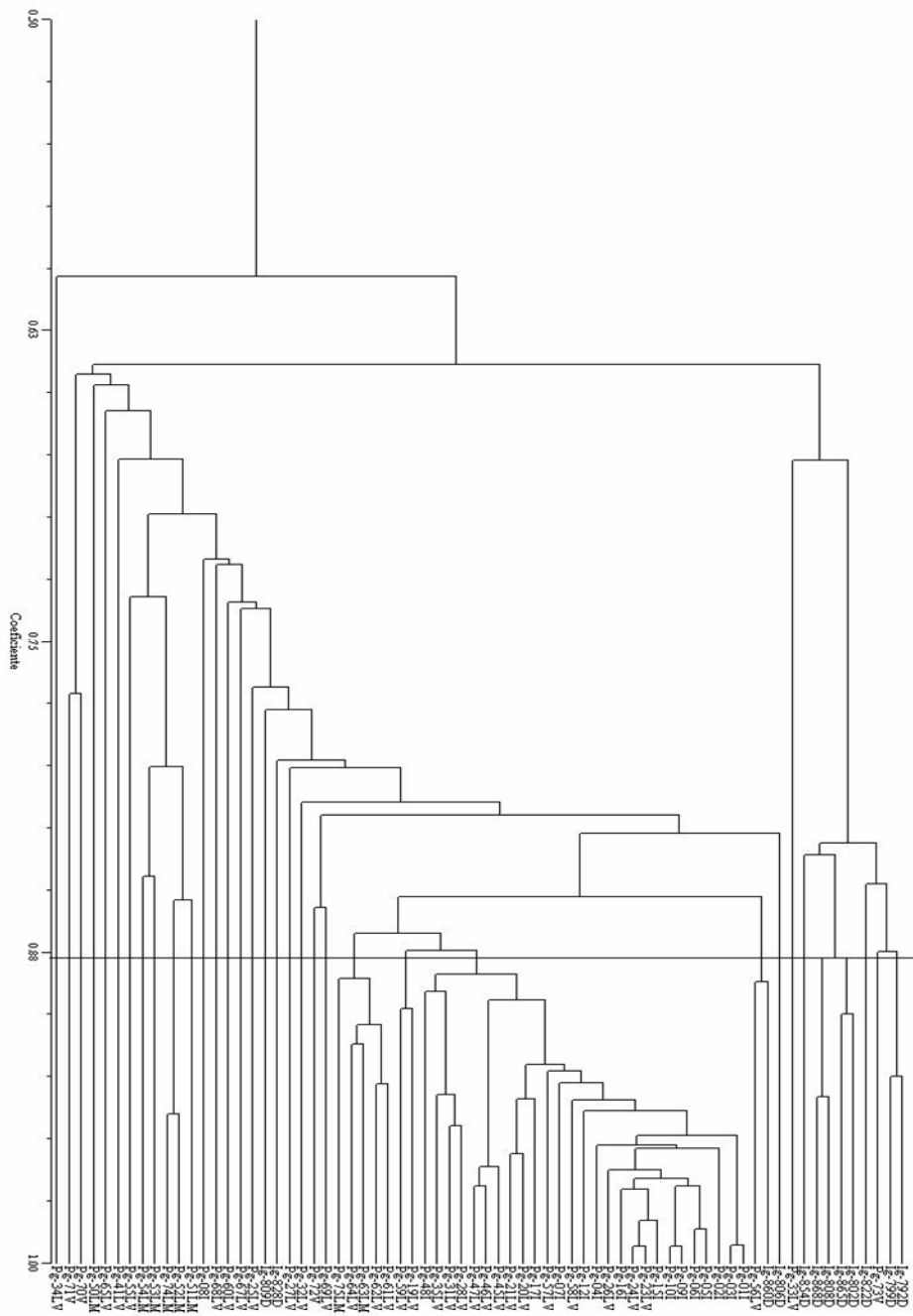


FIGURA 1 Dendrograma obtido para os 70 isolados de *P.griseola*.

UPGMA. A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sg_m), à direita (acima) da qual os acessos são considerados semelhantes. O sg_m a 1% de probabilidade foi de 0,882. Por meio do dendrograma, foi possível verificar a formação de 33 grupos (com, pelo menos, dois isolados). Os grupos formados são apresentados na Tabela 4 e Figura 1. Entre os isolados avaliados, 26 não agruparam com nenhum outro isolado dentro do intervalo estabelecido. Os isolados coletados no município de Viçosa, MG, não se agruparam com os outros isolados no nível de similaridade estabelecido (0,882).

O Grupo I é formado por dois isolados, Ig-792 e Ig-799, oriundos do município de Damolândia, GO, sendo caracterizados como patótipo 63-31 e 63-63, respectivamente. Importante mencionar, também, que estes isolados foram coletados infectando uma mesma cultivar (Emgopa Ouro). Situação análoga foi observada no Grupo II, no qual os quatro isolados foram coletados no município de Damolândia, GO. Dois destes isolados, Ig-802 e Ig-808, pertencem ao patótipo 63-63 e foram coletados sobre a cultivar Emgopa Ouro. Os isolados Ig-865 (patótipo 63-31) e Ig-868 (patótipo 63-63) quebraram a resistência da cultivar Jalo Precoce. A partir dos resultados dos Grupos I e II, pode-se observar tendência de evolução localizada do patógeno, visto que os isolados coletados no estado de Goiás (Damolândia) foram agrupados juntos e, em geral, apresentam baixa similaridade com os isolados obtidos no estado de Minas Gerais. Ausência de especificidade entre os isolados e sua região geográfica de origem foi observada por Sartorato (2004), no entanto, o autor observou formação de subgrupos formados por isolados de apenas um local.

Estes dados e outros já relatados enfatizam a necessidade da realização de monitoramento por local ou região de plantio, para que as estratégias de melhoramento sejam eficientes. O estudo da variabilidade genética deste fungo por meio de marcadores moleculares, refletem melhor a dinâmica populacional

TABELA 4 Grupos de isolados considerando os resultados da análise de agrupamento (UPGMA) e do dendrograma, referentes aos 70 isolados estudados (Figura 1A).

| GRUPO I | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|----|-------|----|
| Isol. ^{1/} | C ^{2/} | Isol. | C | | | | | | |
| Ig-792 | D ^{3/} | Ig-799 | D | | | | | | |
| GRUPO II | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | | |
| Ig-802 | D | Ig-865 | D | Ig-808 | D | Ig-868 | D | | |
| GRUPO III | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | | | | | | |
| Ig-860 | D | Pg-56 | LV ^{4/} | | | | | | |
| GRUPO IV | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-01 | I ^{5/} | Pg-03 | I | Pg-02 | I | Pg-05 | I | Pg-06 | I |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-09 | I | Pg-10 | I | Pg-15 | I | Pg-23 | LV | Pg-24 | LV |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-16 | I | Pg-26 | LV | Pg-04 | I | Pg-12 | I | Pg-58 | LV |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-07 | I | Pg-57 | LV | Pg-17 | I | Pg-20 | LV | Pg-21 | LV |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-45 | LV | Pg-46 | LV | Pg-47 | LV | Pg-28 | LV | Pg-31 | LV |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-35 | LV | Pg-48 | I | | | | | | |
| GRUPO V | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | | | | | | |
| Pg-19 | LV | Pg-59 | LV | | | | | | |
| GRUPO VI | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C | Isol. | C |
| Pg-61 | LV | Pg-62 | LV | Pg-63 | LM ^{6/} | Pg-64 | LV | Pg-75 | LM |
| GRUPO VII | | | | | | | | | |
| Isol. | C | Isol. | C | | | | | | |
| Pg-52 | LM | Pg-74 | LM | | | | | | |

^{1/} Isol.: Isolados;

^{2/} C: Municípios de origem;

^{3/} D: Damolândia, GO;

^{4/} LV: Lavras, MG;

^{5/} I: Ijaci, MG;

^{6/} LM: Lambari, MG.

do patógeno, permitindo um estudo mais completo do genoma de *P. griseola* em relação à avaliação do caráter virulência, mas não permitem a identificação de locos ligados a genes de virulência no fungo (Sartorato, 2004).

Dois isolados formam o Grupo III, sendo que um, Ig-860, é oriundo de Damolândia, GO e o outro (Pg-56), de Lavras, MG. Entre os 27 isolados que foram agrupados no Grupo IV estão 14 dos 15 isolados coletados em Ijací, MG. Portanto, há uma relação entre as seqüências de DNA amplificadas e o local de coleta dos isolados, presentes nos Grupos I, II e IV, independentemente do patótipo ao qual pertence o isolado. Trabalhos futuros precisam ser desenvolvidos priorizando o levantamento de informações acerca da variabilidade em diferentes regiões para que dados sobre a evolução do patógeno possam ser acumulados.

No Grupo IV encontram-se, também, os pares de isolados: Pg-09 (patótipo 63-31) e Pg-10 (patótipo 63-63), Pg-23 (patótipo 63-63) e Pg-24 (patótipo 63-63), que apresentaram maior similaridade genética (0,993). Destaca-se os isolados Pg-09 e Pg-10 que foram coletados infectando uma mesma cultivar, (Eriparsa), em plantas dentro de uma mesma parcela em campo experimental. Embora tenha sido detectada alta similaridade por meio de marcadores RAPD, existe diferença quanto ao padrão de virulência apresentado pelos isolados, sendo que no mesmo campo experimental ocorre variação entre os isolados. Elevada similaridade genética (0,992) foi detectada entre os isolados do patótipo 63-47 (Pg-01 e Pg-03), sendo os mesmos oriundos do município de Ijací e coletados sobre as cultivares CV-13 e ESAL-507. Em campos experimentais, ocorre fluxo contínuo de pessoas, o qual, certamente, propicia o transporte de esporos do fungo de um local para outro ou de uma cultivar para outra, propiciando alta disseminação do fungo no campo de produção.

O Grupo IV caracteriza-se pela ocorrência de isolados que foram coletados a partir de materiais do Programa Melhoramento de Feijão, realizado

pela Universidade Federal de Lavras. Os hospedeiros caracterizam-se por apresentar constituição genética comum o que, provavelmente, também interfere na alta similaridade entre os isolados.

Três isolados (Pg-45, Pg-46 e Pg-47) formaram um subgrupo dentro do Grupo IV. Todos estes isolados pertencem ao patótipo 63-63 e foram coletados sobre uma mesma folha, porém, em lesões diferentes. Inicialmente, acreditava-se que a similaridade entre estes isolados seria a máxima, o que não aconteceu. Foi observada similaridade média de 0,964 entre os três isolados, indicando que podem ter ocorrido mecanismos de geração de variabilidade nestes isolados. Por outro lado, este resultado pode estar caracterizando uma possível contaminação advinda de outras parcelas, em virtude da intensa movimentação de pessoas entre as parcelas experimentais. Guzmán et al. (1999) observaram a ocorrência de isolados de origem mesoamericana e andina infectando uma mesma lesão, sugerindo que algumas lesões podem resultar da ação combinada de múltiplos conídios e que isolados de dois grupos de *P. griseola* podem coexistir em uma mesma folha.

O Grupo V é constituído por dois isolados (Pg-19 e Pg-59) coletados no município de Lavras, MG. Embora estes isolados tenham sido coletados em Lavras e no mesmo campo experimental, as safras de coleta foram diferentes; o Pg-19 foi coletado na safra da seca e o Pg-59 na safra das águas. Provavelmente, o isolado Pg-59 pode ter permanecido na área, sob restos culturais, após a colheita da safra anterior.

Cinco isolados, sendo três de Lavras e dois de Lambari, formaram o Grupo VI. Os isolados Pg-61 e Pg-64, embora tenham sido coletados infectando cultivares diferentes, Small White e VC-3, respectivamente, foram coletados em casa de vegetação no mesmo dia, o que pode justificar a alta similaridade (0,894) entre esses isolados. O Grupo VII foi formado por apenas dois isolados do município de Lambari.

Observando-se os agrupamentos gerados, pode-se fazer uma inferência, com cautela, a respeito dos mecanismos que propiciam o aumento da variabilidade neste patógeno. Percebe-se que, na maioria dos casos, como observado nos grupos I, II e IV, podem ter ocorrido eventos de mutação pontual em regiões diferentes das amplificadas via marcadores RAPD, pois apesar de comporem o mesmo grupo são classificados como patótipos diferentes. Outra possibilidade é a movimentação constante de pessoas no campo experimental, podendo transportar esporos de uma parcela a outra, no campo de produção.

Estudos sobre os mecanismos que geram essa variabilidade em *P. griseola* são escassos. Além disso, não há relatos sobre a ocorrência da forma sexual deste patógeno (Busogoro et al., 1999; Mahuku et al., 2002a). Alguns mecanismos relatados por Burdon & Roelfs (1985), Drenth et al. (1996) e Leung et al. (1993) que levam ao aparecimento de diversidade dentro de populações do patógeno, são: mutações pontuais, migração e recombinação sexual. Adicionalmente, McDonald & Linde (2002) propõem a ocorrência de seleção e deriva genética como forças evolutivas que atuam sobre a população de patógenos. As forças seletivas podem ser impostas pelo grau de especialização das interações patógeno-hospedeiro, medida de controle e limitações ambientais (Mahuku et al., 2002a). Estes fatores atuam gerando diferenças na distribuição da variação fenotípica e genotípica entre os fitopatógenos, que podem levar à alta variação genética. É possível que esses fatores atuem isolados ou em conjunto, levando à ocorrência de novos patótipos e, conseqüentemente, aumentando os níveis de diversidade genética.

Em geral, a análise de agrupamento entre os isolados revelou a tendência de formação de grupos de acordo com o local de origem. Isso reforça a idéia de que o patógeno co-evoluiu com a população de hospedeiros do local e que ênfase deve ser dada ao monitoramento populacional na região específica de produção.

Levando-se em consideração o caráter patogenicidade, não foi possível

observar relação direta entre esses e o agrupamento fornecido por marcadores RAPD. A probabilidade das regiões amplificadas estarem associadas aos locos para patogenicidade é praticamente nula. Isto pode ser atribuído ao fato de que marcadores moleculares são neutros e não dependem da interação que ocorre entre os alelos de avirulência, no patógeno e os alelos de resistência, na planta, a qual pode ser influenciada pelo tipo de inóculo e pelas condições ambientais (Mahuku et al., 2002b). Resultado similar foi observado por Busogoro et al. (1999), Mahuku et al. (2002a,b) e Wagara et al. (2004).

3.3 Diversidade genética

Os índices para cada município estão resumidos na Tabela 5. O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera que, quanto mais próximo o valor for de zero, menor é a diversidade. Os índices de diversidade variaram de 0,1156 (Ijaci, MG) a 0,3486 (Viçosa, MG). Estes valores, quando comparados aos relatados na literatura, para *P. griseola*, podem ser considerados altos. Esta diversidade pode ser explicada pelo amplo espectro de patogenicidade dos isolados mesoamericanos, os quais são capazes de infectar tanto as cultivares mesoamericanas quanto as andinas. Foi possível visualizar, neste trabalho, índices de diversidade superiores ao obtidos por Wagara et al. (2004). Estes autores, ao estudarem a diversidade genética entre populações, mesoamericana, andina e afro-andina, de *P. griseola*, obtiveram os índices de diversidade: 0,231, 0,169 e 0,188, respectivamente. Silva (2004) estimou o índice de diversidade para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e observou que, para o estado de Minas Gerais, ele foi de 0,1894. Em média, este valor é inferior ao observado para o fungo *P. griseola*.

TABELA 5 Índices de diversidade de Shannon (D), amplitude, média e variância das similaridades genéticas para cinco municípios de coleta de isolados de *P. griseola*.

| Municípios | D | Amplitude das similaridades | Média das similaridades | Variâncias das similaridades |
|------------|--------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Damolândia | 0,2992 | 0,4810-0,9333 | 0,6969 | 0,0096 |
| Ijaci | 0,1156 | 0,4706-0,9932 | 0,8137 | 0,0126 |
| Lambari | 0,2955 | 0,3750-0,9400 | 0,7035 | 0,0101 |
| Lavras | 0,2787 | 0,3014-0,9933 | 0,7523 | 0,0140 |
| Viçosa | 0,3486 | 0,3750-0,8889 | 0,6690 | 0,0094 |

A maior média de similaridade (0,8137) foi observada para Ijaci, MG, indicando que a diversidade é menor neste local e corrobora com os dados de diversidade de Shannon. Resultado similar foi observado para Viçosa, MG em que a maior diversidade entre os isolados refletiu diretamente na menor média de similaridade (0,6690). Os resultados observados para média de similaridade e o índice de Shannon indicam uma correlação negativa, alta e significativa ($r = -0,9487$), demonstrando que, quanto menor a média da similaridade, maior será a diversidade genética. Resultado similar foi observado por Silva (2004), o qual relatou uma correlação de -0,89, entre a média das similaridades e o índice de diversidade.

Embora a amplitude e a variância das similaridades genéticas tenham sido maiores para o município de Lavras, MG, isto não refletiu diretamente na ampliação da diversidade genética, indicando que muitos isolados estão muito próximos geneticamente.

Na Tabela 6 são apresentadas algumas estatísticas descritivas estimadas por população (município). A maior porcentagem de locos polimórficos foi observada para o município de Lavras, enquanto a menor foi observada para o município de Ijaci.

TABELA 6 Número e porcentagem de locos polimórficos e heterozigidade esperada.

| Municípios | Nº de locos polimórficos | % de locos polimórficos | Heterozigidade esperada |
|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Damolândia | 61 | 80,26 | 0,2777 |
| Ijaci | 48 | 63,16 | 0,1447 |
| Lambari | 60 | 78,95 | 0,3013 |
| Lavras | 76 | 100,00 | 0,3368 |
| Viçosa | 59 | 77,63 | 0,3741 |
| Média | 60,80 | 80,00 | 0,2869 |

A heterozigidade esperada foi maior no município de Viçosa e menor no município de Ijaci. A maior estimativa da heterozigidade para Viçosa deve ser observada com cautela, visto que apenas quatro isolados foram amostrados. Em média, 80,00% dos locos foram polimórficos e, considerando que todos os isolados deste estudo são de origem mesoamericana, pode-se fazer uma comparação com os estudos realizados na África por Wagara et al. (2004b), os quais identificaram maior percentual de locos polimórficos (91,6%) para isolados de origem mesoamericana.

A diversidade genética de Nei (1973) foi decomposta e verificou-se que a diversidade total entre as populações (municípios) foi de 0,3535 (H_T), indicando que 35,35% dos isolados são únicos.

Uma análise da partição da diversidade genética, para todos os 76 locos polimórficos, apresentou uma moderada diferenciação genética entre as populações estudadas ($G_{ST} = 0,1979$). Isso indica que, em média, 19,79% da variação genética observada neste estudo foi devido à diferenciação entre as populações, enquanto que 80,21% foi devido à variação dentro das populações. Wagara et al. (2004) subdividiram as populações de acordo com sua virulência e

obtiveram estimativas similares, verificando que, entre os isolados estudados, 21,6% eram únicos e 9,3% da variação observada foi devido a diferenças entre as três populações estudadas, quando comparada a 90,7% da variação dentro das populações.

3.4 Análise de variância molecular

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a ocorrência de variação genética. Na Tabela 7 encontra-se o resumo da análise de variância molecular dos resultados (50000 permutações) obtidos a partir de uma hierarquização feita em locais, em que cada local foi considerada como uma população.

A diferenciação genética existente entre os locais amostrados é altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0,2249$, $p < 0,000$), estando 22,49% da variação genética contida entre locais e 77,51% da variação existente encontra-se dentro dos locais (Tabela 7). Provavelmente, a maior parte da variação entre locais deve ter sido provocada pela presença dos isolados do município de Damolândia, GO, visto que este local é distante geograficamente e dos outros municípios do estado de Minas Gerais e não há troca de materiais entre esses locais. Percebe-se que estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, quando foi realizada a partição da diversidade de Nei (1973), nos quais foi observada uma maior variação dentro (80,21%), em detrimento da variação entre (19,79%). Estes resultados são similares aos apresentados por Mahuku et al. (2002a), os quais verificaram que a maior parte da diversidade (81%) resultou de diferenças existentes dentro de populações e 19% de diferenças entre populações.

Wagara et al. (2004) verificaram um baixo nível de diferenciação genética entre populações. Em média, 90,7% da variação genética foi devido a diferenças dentro das populações e apenas 9,3% da variação foi devido a

TABELA 7 Resumo da análise de variância molecular para cinco locais de ocorrência do fungo (*P. griseola*), analisados por marcadores RAPD.

| F.V. | GL | SQ | Comp. de variância | % Total | Φ_{ST} | P |
|------------------|----|---------|--------------------|---------|-------------|-------|
| Entre locais | 4 | 206,593 | 3,2463 | 22,49 | 0,2249 | 0,000 |
| Dentro de locais | 65 | 727,079 | 11,1858 | 77,51 | | |
| Total | 69 | 933,672 | 14,4321 | 100,00 | | |

diferenças entre populações. Estes autores ressaltaram que uma possível ocorrência de recombinação parassexual pode ter proporcionado um aumento na diversidade dentro das populações.

Resultado aparentemente divergente foi observado por Stenglein & Balatti (2006) que, ao estudarem populações de isolados de *P. griseola* de origem andina e mesoamericana, verificaram que a maior parte da variação resultou de diferenças genéticas entre grupos (79,68%) em contraposição a 20,32% de diferença dentro do grupo. Os resultados de Stenglein & Balatti (2006) são esperados, pois, ao agrupar os isolados em seus conjuntos gênicos, torna-se evidente que as diferenças entre eles serão maiores que as diferenças dentro, devido à gama de hospedeiros que cada grupo tem a capacidade de infectar.

Estudo realizado com o patossistema *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris* por Silva et al. (2007), no estado de Minas Gerais, mostrou que apenas 3,94% da variação estava contida entre as sub-regiões (Sul de Minas Gerais, Alto do Paranaíba e Zona da Mata) e 96,06% da variação está contida dentro das sub-regiões. Os autores ressaltaram a possibilidade do livre intercâmbio de sementes entre as sub-regiões, e que pode ter contribuído substancialmente para o incremento da variabilidade dentro em detrimento da variabilidade entre sub-

regiões.

Fica, portanto, evidenciado que existe grande variação entre os isolados dentro de locais, o que fornece subsídios aos trabalhos que ressaltam o grande potencial deste fungo em gerar variabilidade.

Para entender melhor a estrutura populacional deste patógeno, foi realizada uma comparação par a par dos 76 locos polimórficos estudados, para três populações diferentes (Tabela 8). O maior e menor desequilíbrio gamético foi detectado para as populações coletadas no município de Lavras nas safras do inverno e da seca, na qual foram obtidos 2.175 (76,32%) e 1.658 (58,18%), respectivamente, valores de desequilíbrio gamético significativamente diferente de zero (teste de Fisher, $P < 0,05$). O número de combinações dos locos foi de $76(76-1)/2 = 2850$. Portanto, existe desequilíbrio de ligação nas populações de *P. griseola* estudada, mostrando que este fungo mantém uma estrutura genética que é consistente com a reprodução assexual (McDonald et al., 1994). Estes resultados dão suporte à observação da ausência de reprodução sexual em *P. griseola*. Segundo McDonald et al. (1994), o desequilíbrio gamético pode surgir do efeito do fundador, pressão de seleção e cruzamentos não aleatórios, incluindo reprodução assexual. Devido ao pequeno tamanho das amostras, estes resultados devem ser interpretados com cautela.

Estes dados estão de acordo com os resultados apresentados por Mahuku et al. (2002a). Utilizando populações de origem andina e mesoamericana, estes autores obtiveram 81% dos valores de desequilíbrio significativamente diferente de zero, revelando que as populações de *P. griseola* reproduzem-se assexuadamente. O conhecimento da biologia de *P. griseola* indica que a reprodução assexual é o principal mecanismo de reprodução (Liebenberg & Pretorius, 1997).

TABELA 8 Locais e safras de coleta dos isolados de *P. griseola* e desequilíbrio gamético para os 76 locos polimórficos estudados.

| Locais | Safra/Ano | Nº de indivíduos | Desequilíbrio |
|--------|--------------|------------------|---------------|
| Ijaci | Seca/2005 | 14 | 62,44% |
| Lavras | Inverno/2005 | 13 | 76,32% |
| | Seca/2005 | 18 | 58,18% |

Uma questão importante a ser levantada é: qual a origem desta diversidade? Para um patógeno sem um ciclo sexual conhecido (Liebenberg & Pretorius, 1997), a diversidade não pode ser explicada pela recombinação sexual. McDonald & Linde (2002) propuseram a existência de cinco forças evolutivas: mutação, deriva genética, fluxo gênico, reprodução e seleção. Mutações pontuais, como aberrações cromossômicas (deleções, translocações e perdas cromossômicas) (Klister & Miao, 1992) e a presença de transposons (Kempken & Kück, 1998), podem incrementar a variabilidade patogênica.

4 CONCLUSÕES

Marcadores RAPD identificaram, eficientemente, elevada variabilidade entre os isolados estudados.

Foi constatado que o fungo *P. griseola* mantém uma estrutura consistente com a reprodução assexual, visto que a maior parte da variação ocorre dentro das populações e as populações estão em desequilíbrio de ligação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSHOFF, W. H. P.; SWART, W. J.; PRETORIUS, Z. A.; LIEBENBERG, M. M.; CROUS, P. W. Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in southern Africa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 344-349, Apr. 1996.

BURDON, J. J.; ROELFS, A. P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 8, p. 907-913, Aug. 1985.

BUSOGORO, J. P.; JIJAKLI, M. H.; LEPROIVE, P. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 559-569, Sept. 1999.

DRENTH, A.; WHISSON, S. C.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A. G.; OBST, N. R.; RYLEY, M. J. The evolution of races of *Phytophthora sojae* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 2, p. 163-169, Feb. 1996.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 37-42, jan./1999.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTAS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 600-607, May 1995.

KEMPEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungifacts and perspectives. **BioEssays**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 652-659, Aug. 1998.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.

LEUNG, H.; NELSON, R. J.; LEACH, J. E. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: ANDREWS, J.; TOMMEROP, I. (Ed.).

Advances in plant pathology. New York: Academic Press, 1993. V. 10, p. 157-205.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001>. Acesso em: 2007.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.

LIN, T. P.; CHENG, Y. P.; HUANG, S. G. Allozyme variation in four geographical areas of *Cinnamomum kanehirae*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 88, n. 5, p. 433-438, Sept./Oct. 1997.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 594-604, Oct. 2002a.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the afro-andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, June 2002b.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 1/2, p. 163-180, Jan. 2002.

MCDONALD, B. A.; MILES, J.; NELSON, L. R.; PETTWAY, R. E. Genetic variability in nuclear DNA in field populations of *Stagonospora nodorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 250-255, Mar. 1994.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, Jan. 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy Science United States of America**, Washington, v. 70, n. 17, p. 3321-3323, Aug. 1973.

NIETSCHÉ, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Pauli, v. 28, n. 4, p. 331-335, out./dez. 2002.

NIETSCHÉ, S.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A. DE; PAULA JR., T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.

OROZCO, S.; ARAYA, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 589-593, nov./dez. 2005.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Patogenic variation in, souces of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 2, p. 161-171, 1998.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan. 1985.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 1992. 470 p.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and mutivariate analysis system**. New York, 2000. 470 p.

SAETTLER, A. W. Angular leaf spot. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St Paul, USA: APS Press, 1991. p. 15-16

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goias, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385-390, Aug. 2004.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2. 000**: a software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SCHWARTZ, H. F.; CORREA, F. J.; PENEDA, P. A.; OTOYA, M. M.; KATHERMAN, M. J. Dry bean yields losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 494-496, June 1981.

SILVA, K. J. D. e. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v.155, p. 241-247, Apr. 2007.

SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 68, n. 4/6, p. 158-167, Apr./June 2006.

WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; KIMENJU, J. W.; BURUCHARA, R. A.; JAMNADASS, R.; MAJIWA, P. A. O. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as revealed by AFLP and Group-specific primers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 235-242, Apr. 2004.

CAPÍTULO 4

GRUPOS DE ANASTOMOSE ENTRE ISOLADOS DE

Phaeoisariopsis griseola

RESUMO

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Grupos de anastomose entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola***. 2007. p. 112-130. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O fungo *Phaeoisariopsis griseola* é o agente causal da mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), a qual pode provocar perdas de até 80% na produção. A estratégia de controle mais eficiente é o emprego da resistência genética. O sucesso do desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular depende do entendimento dos níveis de variabilidade das populações do patógeno. Tradicionalmente, a elevada variação genética e patogênica apresentada pelo fungo *P. griseola* tem sido detectada pela utilização do conjunto de cultivares diferenciadoras e por meio de marcadores moleculares. Existe, portanto, uma necessidade de explicar a ampla variação genética e patogênica. A parassexualidade tem sido relatada como um dos mecanismos utilizados por fungos que apresentam reprodução assexual e para que ocorra é necessária a formação de anastomoses entre hifas. A ocorrência de anastomose entre hifas pode ser utilizada como um caráter para a realização de estudos populacionais. O objetivo deste trabalho foi identificar a variação entre isolados do fungo *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais por meio de grupos de anastomoses. Observou-se a ocorrência de pontes de anastomose em forma de H. Todos os isolados formaram anastomose, porém, três isolados apresentaram 85% de compatibilidade, ou seja, foram compatíveis com 17 isolados. Este é o primeiro relato da ocorrência de anastomose entre hifas para o fungo *P. griseola*. As estimativas de similaridade para os dados de anastomose variaram de 0,15 a 0,85, evidenciando elevada capacidade de variação para o caráter em questão. Foi observada a formação de 16 grupos. Exceto o grupo que foi formado pelos isolados Pg 01, Pg 02, Pg 07, Pg 08 e Pg 12, todos os outros grupos eram constituídos por apenas um isolado dentro de cada grupo. Isolados pertencentes a grupos diferentes podem apresentar formação de anastomose entre hifas. Foi constatada elevada variabilidade para a ocorrência de anastomoses entre hifas e a ausência de agrupamento entre os isolados para a formação de anastomose demonstra a existência de variabilidade genética para os locos envolvidos com o controle deste caráter.

*Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

ABSTRACT

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Anastomosis group among *Phaeoisariopsis griseola* isolates.** 2007. p. 112-130. Thesis (Plant Genetics and Breeding Program) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The fungus *Phaeoisariopsis griseola* is the causal agent of angular leaf spot, a disease of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Yield losses can be as high as 80%. Breeding for disease resistance is the most effective strategy to control the bean angular leaf spot disease. The successful development of angular leaf spot-resistant cultivars depends on understanding the levels of variability among populations of the pathogen. Traditionally, the high pathogenic and genetic variation has been evaluated by differential cultivars and molecular markers. There is a need to explain the wide pathogenic and genetic variability. The parasexuality has been presented as a mechanism used by asexual fungi and for its occurrence it is needed the formation of anastomosis among hyphae. The anastomosis occurrence among hyphae can be taken into consideration as a trait for population studies. The aim of this work was to identify the variation among isolates of *P. griseola* fungus collected in Minas Gerais state, Brazil, by anastomosis groups. Anastomosis bridges were observed in H form. Anastomosis were observed for all the isolates, however three isolates presented 85% of compatibility, in other words, were compatible with 17 isolates. This is the first report of the anastomosis occurrence among hyphae for the *P. griseola* fungus. The similarity estimates for the anastomosis data varied from 0.15 to 0.85, evidencing high variability. Sixteen anastomosis groups were observed. All the groups were formed for a single isolate, except, one group that formed by Pg 01, Pg 02, Pg 07, Pg 08 and Pg 12 isolates. Isolates from different groups can present anastomosis among hyphae. High variability for anastomosis occurrence among hyphae and auster clustering among isolates for formation of anastomosis among hyphae demonstrating the existence of genetic variability for loci involved with control this trait.

*Advisor: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

1 INTRODUÇÃO

A macha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) é uma doença causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, considerada uma das mais importantes em condições tropicais e subtropicais. As perdas na produção provocadas por esta doença podem chegar a 80%, dependendo das condições ambientais, da suscetibilidade das cultivares e do estágio de desenvolvimento da cultura (Mahuku et al., 2002a).

Várias estratégias de controle têm sido propostas para este patógeno. No entanto, a estratégia mais comumente usada é o emprego da resistência genética. O sucesso do desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular depende do entendimento dos níveis de variabilidade das populações do patógeno. Tradicionalmente, a variação tem sido avaliada pela determinação do padrão de infecção dos isolados sobre um conjunto de cultivares diferenciadoras. A adoção de um sistema de nomenclatura padrão (Pastor-Corrales & Jara, 1995) permitiu uma comparação consistente dos dados obtidos por diferentes pesquisadores. No Brasil, mais de 50 patótipos já foram identificados (Sartorato & Alzate-Marin, 2004), o que reflete o alto nível de variabilidade que tem sido observado para este patógeno.

A variabilidade genética tem sido avaliada por meio de marcadores moleculares, indicando que a variabilidade genética é muito maior que a variabilidade patogênica entre isolados (Busogoro et al., 1999; Nietsche et al., 2001; Mahuku et al., 2002a; Sartorato, 2004; Stenglein & Balatti, 2006). Os mecanismos responsáveis pela produção de tão alto nível de variabilidade neste fungo não têm sido estudados. Busogoro et al. (1999) sugeriram a ocorrência de migração entre isolados de uma região para outra. Já Mahuku et al. (2002a) propuseram a ocorrência de seleção seguida de mutação em um loco específico.

A formação de anastomoses entre hifas pode ser mais um caráter a ser levado em consideração em estudos de estrutura populacional do patógeno, fortalecendo as conclusões a respeito da variabilidade do patógeno e propiciando melhores informações sobre como manusear a população hospedeira. A anastomose é a fusão entre hifas, podendo ser de dois tipos: em forma de H e adjacente. As anastomoses são importantes para a comunicação intra-hifas e homeostase da colônia, durante o crescimento e reprodução (Saupe, 2000), além de permitir a troca de material citoplasmático e genético (Roca, 2004).

A formação de anastomoses entre hifas é o primeiro passo para que ocorra a heterocariose e, conseqüentemente, a recombinação parassexual. Segundo Hastie (1981), o ciclo parassexual é um mecanismo potencial para a recombinação genética em fungos, o que pode levar ao incremento da variabilidade genética.

Alguns mecanismos genéticos atuam, impedindo a formação do heterocário (Glass et al., 2000). São necessárias quatro etapas diferentes na reação de incompatibilidade do heterocário (Leslie & Zeller, 1996): i) pré-fusão – está sob o controle de genes *hsi*, que estariam envolvidos na produção do feromônio e receptores; ii) fusão – é controlada por genes *het*; iii) pós-fusão – ocorre uma cascata de reações desde o não-auto-reconhecimento até a morte celular, devendo ser influenciada por diversos genes, entre eles os genes supressores (*sup*), que modificam o sinal e, finalmente, genes apoptóticos levam à morte celular.

No patossistema *Phaeoisariopsis griseola-Phaseolus vulgaris*, nenhum relato sobre a ocorrência de grupos de anastomoses foi documentado ou registrado. No entanto, alguns estudos têm sido realizados para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo que vários grupos de anastomoses foram identificados em populações naturais de *C. lindemuthianum* (Rodriguez-Guerra et al., 2003). Segundo estes autores, a ocorrência de anastomoses pode ser um

mecanismo importante que pode levar à formação de diferentes linhagens clonais de *C. lindemuthianum*. Ishikawa (2004) verificou que isolados de *C. lindemuthianum* geneticamente diferentes têm a capacidade de formar anastomose entre si, podendo contribuir para a ampliação da variabilidade genética.

O objetivo deste trabalho foi identificar a variação entre isolados do fungo *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais, por meio de grupos de anastomoses.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Phaeoisariopsis griseola*

Foram utilizados 20 isolados de *P. griseola* (Tabela 1) coletados no estado de Minas Gerais e pertencentes à micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças do Departamento de Biologia da UFLA.

2.2 Anastomoses entre hifas

Os confrontos entre os isolados (Tabela 1) foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Rodríguez-Guerra et al. (2003), com modificações. No interior de uma placa de Petri esterilizada, foi colocada uma lâmina estéril, sobre a qual foi adicionada uma fina camada de meio M3 (Junqueira et al., 1984). Sobre o meio foram colocados dois discos de micélio com, aproximadamente 5mm de diâmetro, um de cada isolado, a uma distância de 5mm. Cada confronto foi repetido duas vezes, totalizando 420 confrontos.

Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora BOD, a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ por, aproximadamente, 15 dias. Após este período, a lâmina foi retirada da placa e os fragmentos removidos. A lâmina contendo somente as hifas foi corada com corante vital azul tripan-glicerina-ácido láctico e coberta com uma lamínula e visualizada em microscópio de luz. A ocorrência de anastomose foi confirmada pela localização visual da origem das células com anastomose. Anastomoses foram classificadas como positivas (reação compatível) quando a fusão de hifas de ambos os isolados foi observada e ambos os isolados foram considerados como pertencentes ao mesmo grupo de anastomose.

TABELA 1 Descrição dos isolados, cultivares hospedeiras, município/estado de origem e patótipo dos isolados de *P. griseola*.

| Isolados | Cultivar | Município – Estado | Patótipo |
|----------|----------------------|--------------------|----------|
| Pg – 01 | CV-13 | Ijaci - MG | 63-47 |
| Pg – 02 | CV-78 | Ijaci - MG | 63-15 |
| Pg – 03 | ESAL 507 | Ijaci - MG | 63-47 |
| Pg – 07 | LH-10 | Ijaci - MG | 63-55 |
| Pg – 08 | CI - 257 | Ijací - MG | 63-15 |
| Pg – 12 | RC-I-3 | Ijaci - MG | 63-23 |
| Pg – 16 | - | Ijaci - MG | 63-31 |
| Pg – 19 | - | Lavras - MG | 63-47 |
| Pg – 24 | RC ^{1/} | Lavras - MG | 63-63 |
| Pg – 35 | RC | Lavras - MG | 63-63 |
| Pg – 41 | Mulatinho Vagem roxa | Lavras - MG | 63-31 |
| Pg – 45 | Talismã | Lavras - MG | 63-63 |
| Pg – 46 | Talismã | Lavras - MG | 63-63 |
| Pg – 48 | Talismã | Ijaci - MG | 63-63 |
| Pg – 52 | CNFC 10453 | Lambari - MG | 63-47 |
| Pg – 53 | Roxo 90 | Lambari - MG | 63-63 |
| Pg – 54 | MN 3420 | Lambari - MG | - |
| Pg – 55 | A-95 | Lavras - MG | - |
| Pg – 63 | Carioca MG | Lambari - MG | - |
| Pg – 65 | RC | Lavras - MG | - |

^{1/} RC: Progênes oriundas do programa de seleção recorrente para resistência à mancha-angular.

2.3 Análises estatísticas

Foi construída uma matriz de 0's e 1's com os dados de compatibilidade, considerando 0 para as reações de incompatibilidade e 1 para as reações compatíveis. Para estimativa da similaridade, foi utilizado o coeficiente de Russel & Rao (1940), por meio da seguinte expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c + d}$$

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000). A matriz de similaridade genética gerada foi, então, usada para produzir um dendrograma, pelo método da média das similaridades (UPGMA).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a seguinte expressão modificada de Skroch et al. (1992):

$$\text{Erro padrão estimado: } (s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \frac{1 - sg_{ij}}{n - 1}}$$

em que:

n é a soma de a , b e c e d para cada par de isolados.

Os isolados geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma, a partir da estimativa de valor máximo significativo de similaridade (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste de t , utilizando-se a seguinte expressão:

$$sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$$

em que:

t : é o valor tabelado da distribuição t de Student, a 1% de probabilidade, com $n-2$ graus de liberdade;

\bar{s}_{sg} : o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises das anastomoses

Todos os isolados evidenciaram sua capacidade de formar anastomose. Percebe-se, na Figura 1, a ocorrência de pontes de anastomose em forma de H. Os isolados Pg-02, Pg-07 e Pg-08 coletados no município de Ijaci, MG, na mesma safra, mas sobre genótipos diferentes apresentaram maior percentual (85,0%) de reações compatíveis em relação aos demais isolados (Tabela 2). Este é o primeiro relato da ocorrência de anastomose entre hifas para o fungo *P. griseola*. Ishikawa (2006) estudou treze isolados de *C. lindemuthianum* e observou que um isolado (LV 61) apresentou 100% de compatibilidade com os outros isolados estudados. Observou-se que as reações foram diferentes quando se compararam estes isolados, o que indica que, provavelmente, eles apresentaram genótipos diferentes para os locos envolvidos no controle deste caráter.

O isolado Pg-48, também coletado no município de Ijaci, MG, apresentou menor percentual (45,0%) de formação de anastomose com os outros isolados. Saupe (2000) relata que interações incompatíveis podem ocorrer frequentemente entre isolados de uma mesma população ou de populações distintas. Esta incompatibilidade pode estar relacionada a um sistema de autodefesa (Glass et al., 2000).

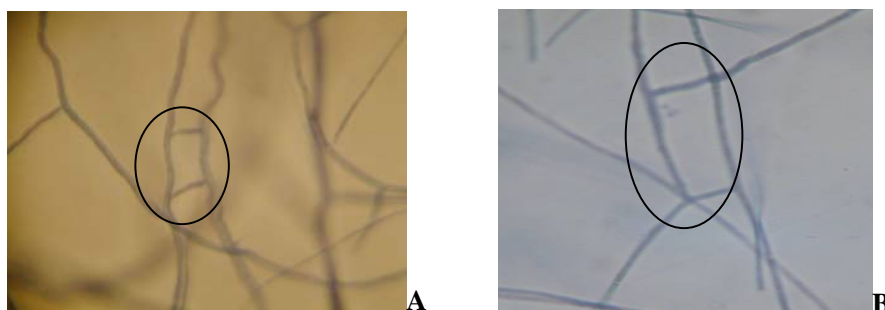


FIGURA 1 Anastomoses em H entre hifas dos isolados Pg-01 e Pg-08 (A) e Pg-16 e Pg-52(B).

A fusão de hifas pode levar à formação do heterocário e gerar a variação dentro da população do patógeno. A ocorrência de anastomoses entre hifas é o primeiro passo para a ocorrência de ciclo parassexual. Segundo Hastie (1981), o ciclo parassexual é um mecanismo potencial para a recombinação genética em fungos, o que pode levar ao incremento da variabilidade genética.

As estimativas de similaridade variaram de 0,15 a 0,85. Na Figura 2 está apresentado o dendrograma e o valor máximo significativo de similaridade (sg_m), a 1% de probabilidade, foi de 0,69. Constatou-se que foram formados 16 grupos e verificou-se que apenas cinco isolados (Pg-01, Pg-02, Pg-07, Pg-08 e Pg-12) situam-se abaixo da linha de corte, os quais formam somente um grupo. Cada um dos 15 isolados remanescentes foi agrupado isoladamente.

O elevado número de grupos de anastomose entre os isolados analisados corrobora com os resultados obtidos por Rodriguez-Guerra et al. (2003) que observaram baixa variabilidade entre os isolados estudados, porém constataram uma grande variação no número de grupos de anastomose.

TABELA 2 Reações de compatibilidade (anastomoses entre hifas) entre os isolados e proporção de reações compatíveis (%) para cada isolado.

| Isolados | Pg 01 | Pg 02 | Pg 03 | Pg 07 | Pg 08 | Pg 12 | Pg 16 | Pg 19 | Pg 24 | Pg 35 | Pg 41 | Pg 45 | Pg 46 | Pg 48 | Pg 52 | Pg 53 | Pg 54 | Pg 55 | Pg 63 | Pg 65 | % |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Pg-01 | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | 75,0 |
| Pg-02 | | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | 85,0 |
| Pg-03 | | | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | 75,0 |
| Pg-07 | | | | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | 85,0 |
| Pg-08 | | | | | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | 85,0 |
| Pg-12 | | | | | | + | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | 80,0 |
| Pg-16 | | | | | | | + | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | + | + | - | 60,0 |
| Pg-19 | | | | | | | | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | 60,0 |
| Pg-24 | | | | | | | | | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | 75,0 |
| Pg-35 | | | | | | | | | | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | 80,0 |
| Pg-41 | | | | | | | | | | | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | 80,0 |
| Pg-45 | | | | | | | | | | | | + | + | - | + | - | + | - | + | + | 70,0 |
| Pg-46 | | | | | | | | | | | | | + | + | + | + | - | + | - | + | 75,0 |
| Pg-48 | | | | | | | | | | | | | | + | - | - | - | + | - | - | 45,0 |
| Pg-52 | | | | | | | | | | | | | | | + | + | + | - | + | + | 65,0 |
| Pg-53 | | | | | | | | | | | | | | | | + | - | - | + | - | 55,0 |
| Pg-54 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | - | + | - | 65,0 |
| Pg-55 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | + | 75,0 |
| Pg-63 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | 80,0 |
| Pg-65 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 70,0 |

+ compatível; - incompatível.

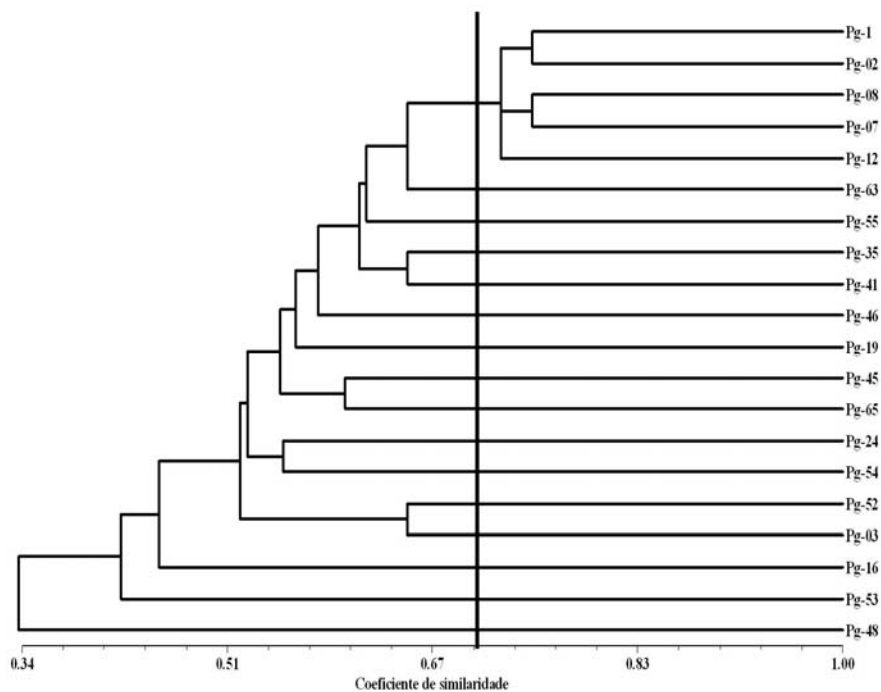


FIGURA 2 Dendrograma de similaridade para a formação de anastomoses entre os 20 isolados de *P. griseola*.

O isolado Pg-48 também foi o que apresentou menor coeficiente de similaridade, reafirmando os resultados já obtidos quanto ao percentual de reações compatíveis. Assim, como para o caráter patogenicidade elevada variabilidade para o caráter formação de anastomose foi constatada entre os isolados de *P. griseola* estudados, embora não haja correlação entre estes caracteres.

No patossistema *Colletotrichum lindemuthianum-Phaseolus vulgaris* a ocorrência de anastomose foi reportada, pela primeira vez, em 2003, por Rodriguez-Guerra e colaboradores. Vários grupos de anastomoses foram identificados em populações naturais de *C. lindemuthianum* (Rodriguez-Guerra

et al., 2003). Segundo estes autores a anastomose pode ser um mecanismo importante para a formação de diferentes linhagens clonais de *C. lindemuthianum*.

É necessário ressaltar que, embora a maioria dos isolados não tenha sido agrupada, isso não limita a formação de pontes de anastomose de isolados de um grupo com os demais. Por exemplo, o isolado Pg-48, embora tenha apresentado menor similaridade, é compatível com outros oito isolados (Tabela 2), evidenciando a capacidade de troca de informações com outros isolados. Rodriguez-Guerra et al. (2003) verificaram que um isolado é capaz de formar anastomoses com isolados de diferentes grupos de anastomoses, sendo considerado como um isolado “ponte”, permitindo a troca de informações genéticas entre dois grupos (Ebihara et al., 1999).

Saupe (2000) cita que o confronto entre isolados de uma mesma população ou de populações distintas resulta, freqüentemente, em interações de incompatibilidade. A incompatibilidade seria um mecanismo de auto-defesa em fungos filamentosos, para limitar a passagem de elementos infecciosos, prevenir a exploração por núcleos mal adaptados e ou prevenir que recursos sejam retirados durante a reprodução sexual (Glass et al., 2000).

Espera-se que a separação das populações em grupos de anastomose possa limitar a variação, embora isolados dentro de um mesmo grupo de anastomose possam proporcionar ampliação da variação genética (Rodriguez-Guerra et al., 2003).

A etapa denominada de pré-fusão consiste na fusão das hifas e posterior formação do heterocário. Esta etapa está sob o controle dos genes *hsi* (auto-incompatibilidade do heterocário), genes *het* (fusão), dos genes *sup* (supressores) e dos genes apoptóticos, que levam à morte celular (Leslie & Zeller, 1996). Percebe-se, então, que o simples fato da ocorrência de anastomose

não implica na formação do heterocário e também da formação de grupo de compatibilidade vegetativa.

Associada ao não conhecimento da reprodução sexuada no fungo *P. griseola* (Liebenberg & Pretorius, 1997; Stenglein et al., 2003), a ocorrência de grupos de anastomose distintos em um mesmo local sugere que as variações encontradas podem ser devidas a mutações ou, possivelmente, a recombinação parassexual.

4 CONCLUSÕES

Foi constatada elevada variabilidade entre os isolados para a ocorrência de anastomoses entre hifas.

A ausência de agrupamentos entre os isolados para a formação de anastomose demonstra a existência de variabilidade genética para os locos envolvidos com o controle deste caráter.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSOGORO, J. P.; JIJAKLI, M. H.; LEPROIVE, P. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 559-569, Sept. 1999.

EBIHARA, Y.; NAGAO, H.; KOIKE, M.; SHIRAISHI, T.; LIJIMA, T. How do Japanese isolates of *Verticillium dahliae* correspond with standardizes VCG testers? **Mycoscience**, Tokyo, v. 40, p. 333-343, 1999.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, p. 165-186, 2000.

HASTIE, A. C. The genetics of conidial fungi. In: COLE, G. T.; KENDRICK, B. (Ed.). **Biology of conidial fungi**. New York: Academic, 1981. v. 2, p. 511-547.

ISHIKAWA, F. H. **Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses**. 2006. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIN, L.; ROMERO, R. das. GASPAROTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 31, n. 177, p. 322- 331, set. 1984.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 75, n. 3, p. 415-424, Dec. 1996.

LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.

MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its

implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 594-604, Oct. 2002a.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A. DE; PAULA JR., T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, L. M.; MENDES-COSTA, M. C.; SCHWAN, R. and WHEALS A. E. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, New York, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, Nov. 2004.

RODRIGUEZ-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M. T.; MARTINEZ, O.; SOMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 228-235, Apr. 2003.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 2000. 470 p.

RUSSEL, P. F.; RAO, T. R. On habit and association of species of anopheline larvae in south-estern. **Madras Journal**, India, v. 3, p. 153-178, 1940.

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goias, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385-390, Aug. 2004.

SAROTATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 235-236, 2004.

SAUPE, S. J. Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, Sept. 2000.

SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO

PLANT BREEDING, 1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2006, doi:10. 1016/j. pmpp. 2006. 10. 001.

STENGLEIN, S.; PLOPER, L. D.; VIZGARRA, O.; BALATTI, P. Angular leaf spot: A disease caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**, London, v. 52, p. 209-243, 2003.

ANEXOS

| ANEXO A | Página |
|---|--------|
| TABELA 1A Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos 70 isolados (Isol.) de <i>P. griseola</i> | 132 |
| TABELA 2A Matriz de similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Nei e Li para 70 isolados (Isol.) de <i>P. griseola</i> | 140 |

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pg - 47 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 48 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 50 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 52 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 53 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 54 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 56 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 58 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 59 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 61 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 62 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 63 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 64 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 65 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Pg - 67 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 68 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 69 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 70 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 71 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 72 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 73 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 74 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 75 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |

“...continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pg - 53 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 54 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 55 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 56 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 57 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 58 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 60 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 61 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 62 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 63 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 64 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 65 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 67 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 68 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 69 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 70 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 71 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 72 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 73 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 74 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 75 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |

“...continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pg - 53 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 54 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 55 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 56 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 58 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 60 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 61 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 62 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 63 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 64 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 65 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Pg - 67 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 68 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 69 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 72 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 73 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 74 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Pg - 75 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

“...continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| Amost. | Dados binários | | | | | | | | | |
|----------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ig - 792 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 799 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 802 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 806 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 808 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 809 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 822 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 828 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 854 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 860 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Ig - 865 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Ig - 868 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 01 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 02 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 03 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 04 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 05 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 06 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 07 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 08 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 09 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 17 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 20 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 21 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 24 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 25 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 26 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 27 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 28 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 31 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 32 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Pg - 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pg - 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 35 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 41 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 45 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 46 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 47 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 48 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 50 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pg - 52 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

“...continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pg - 53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 55 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 56 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Pg - 58 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 59 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 60 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 61 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 62 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 63 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 64 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 65 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pg - 67 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 68 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Pg - 69 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Pg - 70 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 71 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 72 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 73 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 74 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pg - 75 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Ig - 792 | Ig - 799 | Ig - 802 | Ig - 806 | Ig - 808 | Ig - 809 | Ig - 822 | Ig - 828 | Ig - 854 | Ig - 860 | Ig - 865 |
| Pg - 48 | 0,621 | 0,614 | 0,592 | 0,807 | 0,606 | 0,748 | 0,737 | 0,763 | 0,653 | 0,803 | 0,679 |
| Pg - 50 | 0,557 | 0,545 | 0,541 | 0,632 | 0,587 | 0,615 | 0,600 | 0,596 | 0,597 | 0,592 | 0,634 |
| Pg - 51 | 0,550 | 0,487 | 0,507 | 0,646 | 0,553 | 0,500 | 0,549 | 0,547 | 0,513 | 0,626 | 0,530 |
| Pg - 52 | 0,688 | 0,637 | 0,636 | 0,734 | 0,674 | 0,667 | 0,712 | 0,667 | 0,637 | 0,696 | 0,688 |
| Pg - 53 | 0,602 | 0,568 | 0,538 | 0,707 | 0,582 | 0,568 | 0,596 | 0,592 | 0,568 | 0,608 | 0,558 |
| Pg - 54 | 0,584 | 0,552 | 0,524 | 0,724 | 0,588 | 0,614 | 0,600 | 0,635 | 0,529 | 0,685 | 0,543 |
| Pg - 55 | 0,568 | 0,532 | 0,526 | 0,639 | 0,571 | 0,581 | 0,543 | 0,625 | 0,532 | 0,580 | 0,500 |
| Pg - 56 | 0,667 | 0,641 | 0,620 | 0,777 | 0,614 | 0,769 | 0,741 | 0,800 | 0,660 | 0,887 | 0,685 |
| Pg - 57 | 0,624 | 0,617 | 0,615 | 0,816 | 0,610 | 0,777 | 0,750 | 0,823 | 0,636 | 0,859 | 0,696 |
| Pg - 58 | 0,673 | 0,648 | 0,610 | 0,857 | 0,660 | 0,787 | 0,760 | 0,832 | 0,667 | 0,868 | 0,690 |
| Pg - 59 | 0,705 | 0,699 | 0,700 | 0,843 | 0,733 | 0,803 | 0,793 | 0,817 | 0,718 | 0,823 | 0,778 |
| Pg - 60 | 0,659 | 0,628 | 0,578 | 0,788 | 0,643 | 0,740 | 0,667 | 0,738 | 0,651 | 0,654 | 0,615 |
| Pg - 61 | 0,680 | 0,653 | 0,694 | 0,790 | 0,687 | 0,783 | 0,754 | 0,780 | 0,673 | 0,803 | 0,755 |
| Pg - 62 | 0,635 | 0,608 | 0,626 | 0,800 | 0,640 | 0,793 | 0,730 | 0,790 | 0,647 | 0,813 | 0,692 |
| Pg - 63 | 0,648 | 0,583 | 0,600 | 0,793 | 0,614 | 0,752 | 0,741 | 0,783 | 0,621 | 0,806 | 0,667 |
| Pg - 64 | 0,627 | 0,600 | 0,598 | 0,780 | 0,592 | 0,772 | 0,726 | 0,769 | 0,620 | 0,810 | 0,667 |
| Pg - 65 | 0,506 | 0,519 | 0,487 | 0,646 | 0,481 | 0,568 | 0,638 | 0,633 | 0,494 | 0,667 | 0,558 |
| Pg - 67 | 0,622 | 0,614 | 0,588 | 0,736 | 0,605 | 0,745 | 0,693 | 0,724 | 0,614 | 0,679 | 0,688 |
| Pg - 68 | 0,629 | 0,621 | 0,595 | 0,724 | 0,612 | 0,673 | 0,680 | 0,673 | 0,575 | 0,648 | 0,652 |
| Pg - 69 | 0,660 | 0,632 | 0,587 | 0,779 | 0,581 | 0,752 | 0,759 | 0,786 | 0,632 | 0,776 | 0,640 |
| Pg - 70 | 0,554 | 0,568 | 0,590 | 0,667 | 0,557 | 0,611 | 0,681 | 0,633 | 0,543 | 0,706 | 0,605 |
| Pg - 71 | 0,537 | 0,550 | 0,494 | 0,673 | 0,538 | 0,574 | 0,667 | 0,639 | 0,500 | 0,693 | 0,565 |
| Pg - 72 | 0,619 | 0,611 | 0,587 | 0,796 | 0,581 | 0,734 | 0,741 | 0,786 | 0,653 | 0,793 | 0,640 |
| Pg - 73 | 0,889 | 0,861 | 0,789 | 0,722 | 0,831 | 0,710 | 0,804 | 0,771 | 0,861 | 0,620 | 0,810 |
| Pg - 74 | 0,652 | 0,598 | 0,643 | 0,724 | 0,659 | 0,653 | 0,680 | 0,654 | 0,644 | 0,685 | 0,674 |
| Pg - 75 | 0,614 | 0,606 | 0,604 | 0,821 | 0,619 | 0,814 | 0,732 | 0,776 | 0,646 | 0,783 | 0,654 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Ig - 868 | Pg - 01 | Pg - 02 | Pg - 03 | Pg - 04 | Pg - 05 | Pg - 06 | Pg - 07 | Pg - 08 | Pg - 09 | Pg - 10 |
| Pg - 50 | 0,579 | 0,704 | 0,697 | 0,710 | 0,630 | 0,679 | 0,691 | 0,642 | 0,619 | 0,649 | 0,643 |
| Pg - 51 | 0,545 | 0,624 | 0,673 | 0,630 | 0,679 | 0,673 | 0,685 | 0,692 | 0,635 | 0,679 | 0,673 |
| Pg - 52 | 0,622 | 0,754 | 0,797 | 0,760 | 0,803 | 0,794 | 0,806 | 0,783 | 0,673 | 0,800 | 0,810 |
| Pg - 53 | 0,575 | 0,714 | 0,726 | 0,721 | 0,696 | 0,724 | 0,737 | 0,727 | 0,682 | 0,713 | 0,707 |
| Pg - 54 | 0,558 | 0,746 | 0,790 | 0,752 | 0,746 | 0,770 | 0,767 | 0,793 | 0,660 | 0,777 | 0,770 |
| Pg - 55 | 0,564 | 0,673 | 0,667 | 0,679 | 0,655 | 0,702 | 0,696 | 0,704 | 0,605 | 0,690 | 0,684 |
| Pg - 56 | 0,627 | 0,925 | 0,889 | 0,917 | 0,881 | 0,913 | 0,897 | 0,864 | 0,709 | 0,920 | 0,913 |
| Pg - 57 | 0,623 | 0,913 | 0,906 | 0,905 | 0,928 | 0,944 | 0,929 | 0,897 | 0,737 | 0,950 | 0,944 |
| Pg - 58 | 0,673 | 0,921 | 0,914 | 0,913 | 0,921 | 0,951 | 0,936 | 0,891 | 0,730 | 0,958 | 0,951 |
| Pg - 59 | 0,745 | 0,910 | 0,874 | 0,902 | 0,866 | 0,913 | 0,912 | 0,864 | 0,691 | 0,905 | 0,899 |
| Pg - 60 | 0,682 | 0,786 | 0,729 | 0,776 | 0,701 | 0,777 | 0,773 | 0,748 | 0,559 | 0,750 | 0,744 |
| Pg - 61 | 0,680 | 0,894 | 0,872 | 0,885 | 0,879 | 0,897 | 0,896 | 0,846 | 0,667 | 0,904 | 0,897 |
| Pg - 62 | 0,634 | 0,902 | 0,866 | 0,894 | 0,872 | 0,920 | 0,919 | 0,840 | 0,716 | 0,912 | 0,905 |
| Pg - 63 | 0,608 | 0,881 | 0,874 | 0,872 | 0,881 | 0,913 | 0,912 | 0,848 | 0,709 | 0,920 | 0,913 |
| Pg - 64 | 0,606 | 0,870 | 0,848 | 0,862 | 0,870 | 0,904 | 0,902 | 0,853 | 0,692 | 0,896 | 0,889 |
| Pg - 65 | 0,500 | 0,732 | 0,726 | 0,721 | 0,714 | 0,724 | 0,719 | 0,691 | 0,568 | 0,713 | 0,707 |
| Pg - 67 | 0,644 | 0,739 | 0,733 | 0,729 | 0,739 | 0,764 | 0,760 | 0,769 | 0,589 | 0,754 | 0,764 |
| Pg - 68 | 0,628 | 0,763 | 0,756 | 0,752 | 0,746 | 0,754 | 0,733 | 0,724 | 0,660 | 0,744 | 0,754 |
| Pg - 69 | 0,638 | 0,841 | 0,850 | 0,848 | 0,857 | 0,846 | 0,859 | 0,839 | 0,706 | 0,868 | 0,862 |
| Pg - 70 | 0,575 | 0,679 | 0,673 | 0,685 | 0,732 | 0,707 | 0,702 | 0,709 | 0,545 | 0,730 | 0,724 |
| Pg - 71 | 0,582 | 0,703 | 0,679 | 0,691 | 0,703 | 0,713 | 0,690 | 0,661 | 0,529 | 0,719 | 0,713 |
| Pg - 72 | 0,596 | 0,810 | 0,835 | 0,816 | 0,810 | 0,846 | 0,859 | 0,806 | 0,745 | 0,837 | 0,831 |
| Pg - 73 | 0,821 | 0,709 | 0,703 | 0,716 | 0,673 | 0,684 | 0,696 | 0,667 | 0,581 | 0,673 | 0,667 |
| Pg - 74 | 0,605 | 0,729 | 0,756 | 0,735 | 0,780 | 0,770 | 0,783 | 0,759 | 0,660 | 0,777 | 0,770 |
| Pg - 75 | 0,633 | 0,862 | 0,855 | 0,853 | 0,831 | 0,896 | 0,894 | 0,813 | 0,736 | 0,872 | 0,866 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 12 | Pg - 15 | Pg - 16 | Pg - 17 | Pg - 19 | Pg - 20 | Pg - 21 | Pg - 23 | Pg - 24 | Pg - 25 | Pg - 26 |
| Pg - 50 | 0,630 | 0,649 | 0,631 | 0,679 | 0,634 | 0,635 | 0,648 | 0,679 | 0,673 | 0,667 | 0,685 |
| Pg - 51 | 0,697 | 0,679 | 0,661 | 0,710 | 0,667 | 0,686 | 0,679 | 0,673 | 0,667 | 0,593 | 0,679 |
| Pg - 52 | 0,787 | 0,800 | 0,800 | 0,767 | 0,783 | 0,729 | 0,787 | 0,794 | 0,803 | 0,654 | 0,784 |
| Pg - 53 | 0,714 | 0,713 | 0,713 | 0,764 | 0,705 | 0,759 | 0,750 | 0,707 | 0,701 | 0,660 | 0,713 |
| Pg - 54 | 0,780 | 0,777 | 0,777 | 0,793 | 0,721 | 0,789 | 0,797 | 0,754 | 0,764 | 0,700 | 0,760 |
| Pg - 55 | 0,709 | 0,690 | 0,690 | 0,685 | 0,660 | 0,679 | 0,709 | 0,667 | 0,678 | 0,587 | 0,708 |
| Pg - 56 | 0,866 | 0,891 | 0,891 | 0,864 | 0,819 | 0,831 | 0,866 | 0,899 | 0,906 | 0,724 | 0,891 |
| Pg - 57 | 0,899 | 0,922 | 0,922 | 0,897 | 0,885 | 0,866 | 0,899 | 0,930 | 0,937 | 0,767 | 0,922 |
| Pg - 58 | 0,921 | 0,944 | 0,944 | 0,920 | 0,879 | 0,889 | 0,921 | 0,937 | 0,944 | 0,793 | 0,930 |
| Pg - 59 | 0,881 | 0,891 | 0,905 | 0,879 | 0,898 | 0,846 | 0,881 | 0,899 | 0,906 | 0,707 | 0,905 |
| Pg - 60 | 0,769 | 0,750 | 0,750 | 0,748 | 0,745 | 0,726 | 0,735 | 0,760 | 0,754 | 0,646 | 0,783 |
| Pg - 61 | 0,864 | 0,874 | 0,889 | 0,862 | 0,864 | 0,813 | 0,848 | 0,882 | 0,891 | 0,719 | 0,874 |
| Pg - 62 | 0,872 | 0,882 | 0,882 | 0,870 | 0,905 | 0,837 | 0,887 | 0,891 | 0,899 | 0,713 | 0,882 |
| Pg - 63 | 0,896 | 0,891 | 0,891 | 0,879 | 0,866 | 0,846 | 0,881 | 0,899 | 0,906 | 0,793 | 0,891 |
| Pg - 64 | 0,855 | 0,881 | 0,866 | 0,853 | 0,839 | 0,835 | 0,870 | 0,874 | 0,882 | 0,743 | 0,866 |
| Pg - 65 | 0,661 | 0,696 | 0,696 | 0,709 | 0,629 | 0,648 | 0,643 | 0,724 | 0,718 | 0,681 | 0,713 |
| Pg - 67 | 0,739 | 0,770 | 0,770 | 0,752 | 0,750 | 0,765 | 0,773 | 0,780 | 0,774 | 0,653 | 0,803 |
| Pg - 68 | 0,729 | 0,777 | 0,777 | 0,741 | 0,739 | 0,737 | 0,746 | 0,770 | 0,780 | 0,720 | 0,777 |
| Pg - 69 | 0,825 | 0,853 | 0,837 | 0,823 | 0,790 | 0,803 | 0,841 | 0,846 | 0,855 | 0,759 | 0,837 |
| Pg - 70 | 0,696 | 0,678 | 0,713 | 0,655 | 0,705 | 0,667 | 0,696 | 0,690 | 0,701 | 0,553 | 0,696 |
| Pg - 71 | 0,685 | 0,684 | 0,702 | 0,679 | 0,692 | 0,692 | 0,685 | 0,713 | 0,707 | 0,624 | 0,702 |
| Pg - 72 | 0,841 | 0,822 | 0,837 | 0,871 | 0,840 | 0,869 | 0,873 | 0,846 | 0,840 | 0,741 | 0,822 |
| Pg - 73 | 0,691 | 0,708 | 0,690 | 0,648 | 0,660 | 0,642 | 0,673 | 0,684 | 0,696 | 0,565 | 0,673 |
| Pg - 74 | 0,746 | 0,760 | 0,760 | 0,741 | 0,757 | 0,702 | 0,763 | 0,754 | 0,764 | 0,620 | 0,744 |
| Pg - 75 | 0,831 | 0,857 | 0,857 | 0,859 | 0,846 | 0,825 | 0,846 | 0,866 | 0,874 | 0,732 | 0,857 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 27 | Pg - 28 | Pg - 31 | Pg - 32 | 33 | Pg - 34 | Pg - 35 | Pg - 41 | Pg - 45 | Pg - 46 | Pg - 47 |
| Pg - 50 | 0,645 | 0,699 | 0,640 | 0,688 | 0,522 | 0,468 | 0,660 | 0,585 | 0,608 | 0,654 | 0,647 |
| Pg - 51 | 0,681 | 0,692 | 0,693 | 0,639 | 0,486 | 0,538 | 0,653 | 0,651 | 0,660 | 0,686 | 0,699 |
| Pg - 52 | 0,748 | 0,786 | 0,772 | 0,727 | 0,554 | 0,593 | 0,754 | 0,771 | 0,759 | 0,797 | 0,776 |
| Pg - 53 | 0,722 | 0,710 | 0,750 | 0,720 | 0,548 | 0,519 | 0,712 | 0,628 | 0,660 | 0,722 | 0,698 |
| Pg - 54 | 0,718 | 0,726 | 0,727 | 0,755 | 0,532 | 0,621 | 0,709 | 0,696 | 0,696 | 0,754 | 0,714 |
| Pg - 55 | 0,632 | 0,648 | 0,627 | 0,633 | 0,507 | 0,582 | 0,627 | 0,619 | 0,635 | 0,679 | 0,654 |
| Pg - 56 | 0,739 | 0,837 | 0,825 | 0,787 | 0,611 | 0,621 | 0,825 | 0,648 | 0,844 | 0,862 | 0,844 |
| Pg - 57 | 0,797 | 0,872 | 0,862 | 0,841 | 0,586 | 0,617 | 0,877 | 0,696 | 0,879 | 0,881 | 0,864 |
| Pg - 58 | 0,806 | 0,866 | 0,855 | 0,835 | 0,600 | 0,648 | 0,840 | 0,708 | 0,887 | 0,919 | 0,887 |
| Pg - 59 | 0,807 | 0,868 | 0,825 | 0,787 | 0,632 | 0,660 | 0,857 | 0,685 | 0,844 | 0,862 | 0,828 |
| Pg - 60 | 0,686 | 0,750 | 0,697 | 0,648 | 0,513 | 0,605 | 0,752 | 0,571 | 0,685 | 0,708 | 0,685 |
| Pg - 61 | 0,786 | 0,866 | 0,839 | 0,783 | 0,602 | 0,634 | 0,855 | 0,717 | 0,857 | 0,859 | 0,841 |
| Pg - 62 | 0,814 | 0,859 | 0,848 | 0,777 | 0,638 | 0,627 | 0,848 | 0,692 | 0,850 | 0,868 | 0,835 |
| Pg - 63 | 0,790 | 0,868 | 0,841 | 0,820 | 0,547 | 0,621 | 0,810 | 0,722 | 0,844 | 0,877 | 0,844 |
| Pg - 64 | 0,759 | 0,857 | 0,846 | 0,773 | 0,565 | 0,640 | 0,846 | 0,686 | 0,848 | 0,850 | 0,832 |
| Pg - 65 | 0,639 | 0,692 | 0,712 | 0,660 | 0,301 | 0,494 | 0,712 | 0,465 | 0,679 | 0,685 | 0,679 |
| Pg - 67 | 0,750 | 0,772 | 0,703 | 0,692 | 0,475 | 0,568 | 0,757 | 0,624 | 0,690 | 0,696 | 0,708 |
| Pg - 68 | 0,718 | 0,743 | 0,691 | 0,660 | 0,532 | 0,437 | 0,691 | 0,587 | 0,750 | 0,754 | 0,732 |
| Pg - 69 | 0,739 | 0,793 | 0,797 | 0,737 | 0,575 | 0,589 | 0,746 | 0,640 | 0,783 | 0,820 | 0,800 |
| Pg - 70 | 0,598 | 0,673 | 0,654 | 0,620 | 0,466 | 0,543 | 0,635 | 0,581 | 0,642 | 0,667 | 0,660 |
| Pg - 71 | 0,667 | 0,679 | 0,660 | 0,606 | 0,444 | 0,475 | 0,621 | 0,565 | 0,629 | 0,636 | 0,629 |
| Pg - 72 | 0,793 | 0,810 | 0,780 | 0,754 | 0,598 | 0,611 | 0,763 | 0,600 | 0,817 | 0,852 | 0,850 |
| Pg - 73 | 0,526 | 0,629 | 0,608 | 0,571 | 0,704 | 0,557 | 0,627 | 0,619 | 0,692 | 0,717 | 0,692 |
| Pg - 74 | 0,699 | 0,761 | 0,764 | 0,717 | 0,532 | 0,621 | 0,727 | 0,717 | 0,732 | 0,772 | 0,750 |
| Pg - 75 | 0,835 | 0,832 | 0,787 | 0,797 | 0,593 | 0,626 | 0,836 | 0,635 | 0,839 | 0,857 | 0,823 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 48 | Pg - 50 | Pg - 51 | Pg - 52 | Pg - 53 | Pg - 54 | Pg - 55 | Pg - 56 | Pg - 57 | Pg - 58 | Pg - 59 |
| Ig - 792 | 0,621 | 0,557 | 0,550 | 0,688 | 0,602 | 0,584 | 0,568 | 0,667 | 0,624 | 0,673 | 0,705 |
| Ig - 799 | 0,614 | 0,545 | 0,487 | 0,637 | 0,568 | 0,552 | 0,532 | 0,641 | 0,617 | 0,648 | 0,699 |
| Ig - 802 | 0,592 | 0,541 | 0,507 | 0,636 | 0,538 | 0,524 | 0,526 | 0,620 | 0,615 | 0,610 | 0,700 |
| Ig - 806 | 0,807 | 0,632 | 0,646 | 0,734 | 0,707 | 0,724 | 0,639 | 0,777 | 0,816 | 0,857 | 0,843 |
| Ig - 808 | 0,606 | 0,587 | 0,553 | 0,674 | 0,582 | 0,588 | 0,571 | 0,614 | 0,610 | 0,660 | 0,733 |
| Ig - 809 | 0,748 | 0,615 | 0,500 | 0,667 | 0,568 | 0,614 | 0,581 | 0,769 | 0,777 | 0,787 | 0,803 |
| Ig - 822 | 0,737 | 0,600 | 0,549 | 0,712 | 0,596 | 0,600 | 0,543 | 0,741 | 0,750 | 0,760 | 0,793 |
| Ig - 828 | 0,763 | 0,596 | 0,547 | 0,667 | 0,592 | 0,635 | 0,625 | 0,800 | 0,823 | 0,832 | 0,817 |
| Ig - 854 | 0,653 | 0,597 | 0,513 | 0,637 | 0,568 | 0,529 | 0,532 | 0,660 | 0,636 | 0,667 | 0,718 |
| Ig - 860 | 0,803 | 0,592 | 0,626 | 0,696 | 0,608 | 0,685 | 0,580 | 0,887 | 0,859 | 0,868 | 0,823 |
| Ig - 865 | 0,679 | 0,634 | 0,530 | 0,688 | 0,558 | 0,543 | 0,500 | 0,685 | 0,696 | 0,690 | 0,778 |
| Ig - 868 | 0,640 | 0,579 | 0,545 | 0,622 | 0,575 | 0,558 | 0,564 | 0,627 | 0,623 | 0,673 | 0,745 |
| Pg - 01 | 0,894 | 0,704 | 0,624 | 0,754 | 0,714 | 0,746 | 0,673 | 0,925 | 0,913 | 0,921 | 0,910 |
| Pg - 02 | 0,887 | 0,697 | 0,673 | 0,797 | 0,726 | 0,790 | 0,667 | 0,889 | 0,906 | 0,914 | 0,874 |
| Pg - 03 | 0,901 | 0,710 | 0,630 | 0,760 | 0,721 | 0,752 | 0,679 | 0,917 | 0,905 | 0,913 | 0,902 |
| Pg - 04 | 0,939 | 0,630 | 0,679 | 0,803 | 0,696 | 0,746 | 0,655 | 0,881 | 0,928 | 0,921 | 0,866 |
| Pg - 05 | 0,897 | 0,679 | 0,673 | 0,794 | 0,724 | 0,770 | 0,702 | 0,913 | 0,944 | 0,951 | 0,913 |
| Pg - 06 | 0,910 | 0,691 | 0,685 | 0,806 | 0,737 | 0,767 | 0,696 | 0,897 | 0,929 | 0,936 | 0,912 |
| Pg - 07 | 0,892 | 0,642 | 0,692 | 0,783 | 0,727 | 0,793 | 0,704 | 0,864 | 0,897 | 0,891 | 0,864 |
| Pg - 08 | 0,704 | 0,619 | 0,635 | 0,673 | 0,682 | 0,660 | 0,605 | 0,709 | 0,737 | 0,730 | 0,691 |
| Pg - 09 | 0,919 | 0,649 | 0,679 | 0,800 | 0,713 | 0,777 | 0,690 | 0,920 | 0,950 | 0,958 | 0,905 |
| Pg - 10 | 0,912 | 0,643 | 0,673 | 0,810 | 0,707 | 0,770 | 0,684 | 0,913 | 0,944 | 0,951 | 0,899 |
| Pg - 12 | 0,879 | 0,630 | 0,697 | 0,787 | 0,714 | 0,780 | 0,709 | 0,866 | 0,899 | 0,921 | 0,881 |
| Pg - 15 | 0,889 | 0,649 | 0,679 | 0,800 | 0,713 | 0,777 | 0,690 | 0,891 | 0,922 | 0,944 | 0,891 |
| Pg - 16 | 0,874 | 0,631 | 0,661 | 0,800 | 0,713 | 0,777 | 0,690 | 0,891 | 0,922 | 0,944 | 0,905 |
| Pg - 17 | 0,892 | 0,679 | 0,710 | 0,767 | 0,764 | 0,793 | 0,685 | 0,864 | 0,897 | 0,920 | 0,879 |
| Pg - 19 | 0,816 | 0,634 | 0,667 | 0,783 | 0,705 | 0,721 | 0,660 | 0,819 | 0,885 | 0,879 | 0,898 |
| Pg - 20 | 0,844 | 0,635 | 0,686 | 0,729 | 0,759 | 0,789 | 0,679 | 0,831 | 0,866 | 0,889 | 0,846 |
| Pg - 21 | 0,848 | 0,648 | 0,679 | 0,787 | 0,750 | 0,797 | 0,709 | 0,866 | 0,899 | 0,921 | 0,881 |
| Pg - 23 | 0,912 | 0,679 | 0,673 | 0,794 | 0,707 | 0,754 | 0,667 | 0,899 | 0,930 | 0,937 | 0,899 |
| Pg - 24 | 0,905 | 0,673 | 0,667 | 0,803 | 0,701 | 0,764 | 0,678 | 0,906 | 0,937 | 0,944 | 0,906 |
| Pg - 25 | 0,789 | 0,667 | 0,593 | 0,654 | 0,660 | 0,700 | 0,587 | 0,724 | 0,767 | 0,793 | 0,707 |
| Pg - 26 | 0,904 | 0,685 | 0,679 | 0,784 | 0,713 | 0,760 | 0,708 | 0,891 | 0,922 | 0,930 | 0,905 |
| Pg - 27 | 0,769 | 0,645 | 0,681 | 0,748 | 0,722 | 0,718 | 0,632 | 0,739 | 0,797 | 0,806 | 0,807 |
| Pg - 28 | 0,882 | 0,699 | 0,692 | 0,786 | 0,710 | 0,726 | 0,648 | 0,837 | 0,872 | 0,866 | 0,868 |
| Pg - 31 | 0,919 | 0,640 | 0,693 | 0,772 | 0,750 | 0,727 | 0,627 | 0,825 | 0,862 | 0,855 | 0,825 |
| Pg - 32 | 0,800 | 0,688 | 0,639 | 0,727 | 0,720 | 0,755 | 0,633 | 0,787 | 0,841 | 0,835 | 0,787 |
| Pg - 33 | 0,538 | 0,522 | 0,486 | 0,554 | 0,548 | 0,532 | 0,507 | 0,611 | 0,586 | 0,600 | 0,632 |
| Pg - 34 | 0,673 | 0,468 | 0,538 | 0,593 | 0,519 | 0,621 | 0,582 | 0,621 | 0,617 | 0,648 | 0,660 |
| Pg - 35 | 0,871 | 0,660 | 0,653 | 0,754 | 0,712 | 0,709 | 0,627 | 0,825 | 0,877 | 0,840 | 0,857 |
| Pg - 41 | 0,642 | 0,585 | 0,651 | 0,771 | 0,628 | 0,696 | 0,619 | 0,648 | 0,696 | 0,708 | 0,685 |
| Pg - 45 | 0,825 | 0,608 | 0,660 | 0,759 | 0,660 | 0,696 | 0,635 | 0,844 | 0,879 | 0,887 | 0,844 |
| Pg - 46 | 0,859 | 0,654 | 0,686 | 0,797 | 0,722 | 0,754 | 0,679 | 0,862 | 0,881 | 0,919 | 0,862 |
| Pg - 47 | 0,857 | 0,647 | 0,699 | 0,776 | 0,698 | 0,714 | 0,654 | 0,844 | 0,864 | 0,887 | 0,828 |
| Pg - 48 | 1,000 | 0,660 | 0,673 | 0,737 | 0,712 | 0,709 | 0,647 | 0,841 | 0,877 | 0,870 | 0,841 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 48 | Pg - 50 | Pg - 51 | Pg - 52 | Pg - 53 | Pg - 54 | Pg - 55 | Pg - 56 | Pg - 57 | Pg - 58 | Pg - 59 |
| Pg - 50 | 0,660 | 1,000 | 0,701 | 0,733 | 0,700 | 0,628 | 0,590 | 0,627 | 0,623 | 0,617 | 0,667 |
| Pg - 51 | 0,673 | 0,701 | 1,000 | 0,857 | 0,840 | 0,782 | 0,734 | 0,563 | 0,636 | 0,667 | 0,641 |
| Pg - 52 | 0,737 | 0,733 | 0,857 | 1,000 | 0,809 | 0,780 | 0,717 | 0,690 | 0,750 | 0,777 | 0,759 |
| Pg - 53 | 0,712 | 0,700 | 0,840 | 0,809 | 1,000 | 0,844 | 0,732 | 0,623 | 0,636 | 0,703 | 0,660 |
| Pg - 54 | 0,709 | 0,628 | 0,782 | 0,780 | 0,844 | 1,000 | 0,773 | 0,696 | 0,707 | 0,769 | 0,696 |
| Pg - 55 | 0,647 | 0,590 | 0,734 | 0,717 | 0,732 | 0,773 | 1,000 | 0,615 | 0,611 | 0,679 | 0,654 |
| Pg - 56 | 0,841 | 0,627 | 0,563 | 0,690 | 0,623 | 0,696 | 0,615 | 1,000 | 0,879 | 0,887 | 0,859 |
| Pg - 57 | 0,877 | 0,623 | 0,636 | 0,750 | 0,636 | 0,707 | 0,611 | 0,879 | 1,000 | 0,920 | 0,879 |
| Pg - 58 | 0,870 | 0,617 | 0,667 | 0,777 | 0,703 | 0,769 | 0,679 | 0,887 | 0,920 | 1,000 | 0,887 |
| Pg - 59 | 0,841 | 0,667 | 0,641 | 0,759 | 0,660 | 0,696 | 0,654 | 0,859 | 0,879 | 0,887 | 1,000 |
| Pg - 60 | 0,734 | 0,588 | 0,535 | 0,586 | 0,584 | 0,611 | 0,621 | 0,739 | 0,713 | 0,724 | 0,847 |
| Pg - 61 | 0,855 | 0,660 | 0,653 | 0,772 | 0,673 | 0,673 | 0,627 | 0,873 | 0,892 | 0,870 | 0,921 |
| Pg - 62 | 0,848 | 0,673 | 0,647 | 0,783 | 0,705 | 0,685 | 0,660 | 0,866 | 0,901 | 0,894 | 0,882 |
| Pg - 63 | 0,841 | 0,647 | 0,680 | 0,793 | 0,698 | 0,714 | 0,673 | 0,844 | 0,894 | 0,902 | 0,859 |
| Pg - 64 | 0,829 | 0,606 | 0,620 | 0,726 | 0,680 | 0,679 | 0,594 | 0,848 | 0,899 | 0,877 | 0,832 |
| Pg - 65 | 0,769 | 0,600 | 0,494 | 0,574 | 0,571 | 0,556 | 0,488 | 0,698 | 0,691 | 0,667 | 0,660 |
| Pg - 67 | 0,721 | 0,621 | 0,591 | 0,673 | 0,615 | 0,577 | 0,539 | 0,726 | 0,735 | 0,729 | 0,796 |
| Pg - 68 | 0,709 | 0,605 | 0,598 | 0,720 | 0,644 | 0,688 | 0,636 | 0,732 | 0,707 | 0,752 | 0,679 |
| Pg - 69 | 0,831 | 0,574 | 0,589 | 0,685 | 0,653 | 0,692 | 0,646 | 0,833 | 0,823 | 0,832 | 0,783 |
| Pg - 70 | 0,673 | 0,375 | 0,444 | 0,574 | 0,452 | 0,489 | 0,512 | 0,698 | 0,673 | 0,721 | 0,736 |
| Pg - 71 | 0,680 | 0,481 | 0,475 | 0,559 | 0,530 | 0,539 | 0,519 | 0,686 | 0,642 | 0,709 | 0,686 |
| Pg - 72 | 0,780 | 0,660 | 0,653 | 0,722 | 0,694 | 0,712 | 0,646 | 0,800 | 0,790 | 0,832 | 0,800 |
| Pg - 73 | 0,627 | 0,538 | 0,532 | 0,630 | 0,561 | 0,568 | 0,575 | 0,692 | 0,648 | 0,697 | 0,731 |
| Pg - 74 | 0,745 | 0,674 | 0,851 | 0,940 | 0,822 | 0,771 | 0,705 | 0,661 | 0,724 | 0,769 | 0,732 |
| Pg - 75 | 0,787 | 0,633 | 0,606 | 0,732 | 0,667 | 0,667 | 0,620 | 0,823 | 0,859 | 0,853 | 0,855 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 60 | Pg - 61 | Pg - 62 | Pg - 63 | Pg - 64 | Pg - 65 | Pg - 67 | Pg - 68 | Pg - 69 | Pg - 70 | Pg - 71 |
| Ig - 792 | 0,659 | 0,680 | 0,635 | 0,648 | 0,627 | 0,506 | 0,622 | 0,629 | 0,660 | 0,554 | 0,537 |
| Ig - 799 | 0,628 | 0,653 | 0,608 | 0,583 | 0,600 | 0,519 | 0,614 | 0,621 | 0,632 | 0,568 | 0,550 |
| Ig - 802 | 0,578 | 0,694 | 0,626 | 0,600 | 0,598 | 0,487 | 0,588 | 0,595 | 0,587 | 0,590 | 0,494 |
| Ig - 806 | 0,788 | 0,790 | 0,800 | 0,793 | 0,780 | 0,646 | 0,736 | 0,724 | 0,779 | 0,667 | 0,673 |
| Ig - 808 | 0,643 | 0,687 | 0,640 | 0,614 | 0,592 | 0,481 | 0,605 | 0,612 | 0,581 | 0,557 | 0,538 |
| Ig - 809 | 0,740 | 0,783 | 0,793 | 0,752 | 0,772 | 0,568 | 0,745 | 0,673 | 0,752 | 0,611 | 0,574 |
| Ig - 822 | 0,667 | 0,754 | 0,730 | 0,741 | 0,726 | 0,638 | 0,693 | 0,680 | 0,759 | 0,681 | 0,667 |
| Ig - 828 | 0,738 | 0,780 | 0,790 | 0,783 | 0,769 | 0,633 | 0,724 | 0,673 | 0,786 | 0,633 | 0,639 |
| Ig - 854 | 0,651 | 0,673 | 0,647 | 0,621 | 0,620 | 0,494 | 0,614 | 0,575 | 0,632 | 0,543 | 0,500 |
| Ig - 860 | 0,654 | 0,803 | 0,813 | 0,806 | 0,810 | 0,667 | 0,679 | 0,648 | 0,776 | 0,706 | 0,693 |
| Ig - 865 | 0,615 | 0,755 | 0,692 | 0,667 | 0,667 | 0,558 | 0,688 | 0,652 | 0,640 | 0,605 | 0,565 |
| Ig - 868 | 0,682 | 0,680 | 0,634 | 0,608 | 0,606 | 0,500 | 0,644 | 0,628 | 0,638 | 0,575 | 0,582 |
| Pg - 01 | 0,786 | 0,894 | 0,902 | 0,881 | 0,870 | 0,732 | 0,739 | 0,763 | 0,841 | 0,679 | 0,703 |
| Pg - 02 | 0,729 | 0,872 | 0,866 | 0,874 | 0,848 | 0,726 | 0,733 | 0,756 | 0,850 | 0,673 | 0,679 |
| Pg - 03 | 0,776 | 0,885 | 0,894 | 0,872 | 0,862 | 0,721 | 0,729 | 0,752 | 0,848 | 0,685 | 0,691 |
| Pg - 04 | 0,701 | 0,879 | 0,872 | 0,881 | 0,870 | 0,714 | 0,739 | 0,746 | 0,857 | 0,732 | 0,703 |
| Pg - 05 | 0,777 | 0,897 | 0,920 | 0,913 | 0,904 | 0,724 | 0,764 | 0,754 | 0,846 | 0,707 | 0,713 |
| Pg - 06 | 0,773 | 0,896 | 0,919 | 0,912 | 0,902 | 0,719 | 0,760 | 0,733 | 0,859 | 0,702 | 0,690 |
| Pg - 07 | 0,748 | 0,846 | 0,840 | 0,848 | 0,853 | 0,691 | 0,769 | 0,724 | 0,839 | 0,709 | 0,661 |
| Pg - 08 | 0,559 | 0,667 | 0,716 | 0,709 | 0,692 | 0,568 | 0,589 | 0,660 | 0,706 | 0,545 | 0,529 |
| Pg - 09 | 0,750 | 0,904 | 0,912 | 0,920 | 0,896 | 0,713 | 0,754 | 0,744 | 0,868 | 0,730 | 0,719 |
| Pg - 10 | 0,744 | 0,897 | 0,905 | 0,913 | 0,889 | 0,707 | 0,764 | 0,754 | 0,862 | 0,724 | 0,713 |
| Pg - 12 | 0,769 | 0,864 | 0,872 | 0,896 | 0,855 | 0,661 | 0,739 | 0,729 | 0,825 | 0,696 | 0,685 |
| Pg - 15 | 0,750 | 0,874 | 0,882 | 0,891 | 0,881 | 0,696 | 0,770 | 0,777 | 0,853 | 0,678 | 0,684 |
| Pg - 16 | 0,750 | 0,889 | 0,882 | 0,891 | 0,866 | 0,696 | 0,770 | 0,777 | 0,837 | 0,713 | 0,702 |
| Pg - 17 | 0,748 | 0,862 | 0,870 | 0,879 | 0,853 | 0,709 | 0,752 | 0,741 | 0,823 | 0,655 | 0,679 |
| Pg - 19 | 0,745 | 0,864 | 0,905 | 0,866 | 0,839 | 0,629 | 0,750 | 0,739 | 0,790 | 0,705 | 0,692 |
| Pg - 20 | 0,726 | 0,813 | 0,837 | 0,846 | 0,835 | 0,648 | 0,765 | 0,737 | 0,803 | 0,667 | 0,692 |
| Pg - 21 | 0,735 | 0,848 | 0,887 | 0,881 | 0,870 | 0,643 | 0,773 | 0,746 | 0,841 | 0,696 | 0,685 |
| Pg - 23 | 0,760 | 0,882 | 0,891 | 0,899 | 0,874 | 0,724 | 0,780 | 0,770 | 0,846 | 0,690 | 0,713 |
| Pg - 24 | 0,754 | 0,891 | 0,899 | 0,906 | 0,882 | 0,718 | 0,774 | 0,780 | 0,855 | 0,701 | 0,707 |
| Pg - 25 | 0,646 | 0,719 | 0,713 | 0,793 | 0,743 | 0,681 | 0,653 | 0,720 | 0,759 | 0,553 | 0,624 |
| Pg - 26 | 0,783 | 0,874 | 0,882 | 0,891 | 0,866 | 0,713 | 0,803 | 0,777 | 0,837 | 0,696 | 0,702 |
| Pg - 27 | 0,686 | 0,786 | 0,814 | 0,790 | 0,759 | 0,639 | 0,750 | 0,718 | 0,739 | 0,598 | 0,667 |
| Pg - 28 | 0,750 | 0,866 | 0,859 | 0,868 | 0,857 | 0,692 | 0,772 | 0,743 | 0,793 | 0,673 | 0,679 |
| Pg - 31 | 0,697 | 0,839 | 0,848 | 0,841 | 0,846 | 0,712 | 0,703 | 0,691 | 0,797 | 0,654 | 0,660 |
| Pg - 32 | 0,648 | 0,783 | 0,777 | 0,820 | 0,773 | 0,660 | 0,692 | 0,660 | 0,737 | 0,620 | 0,606 |
| Pg - 33 | 0,513 | 0,602 | 0,638 | 0,547 | 0,565 | 0,301 | 0,475 | 0,532 | 0,575 | 0,466 | 0,444 |
| Pg - 34 | 0,605 | 0,634 | 0,627 | 0,621 | 0,640 | 0,494 | 0,568 | 0,437 | 0,589 | 0,543 | 0,475 |
| Pg - 35 | 0,752 | 0,855 | 0,848 | 0,810 | 0,846 | 0,712 | 0,757 | 0,691 | 0,746 | 0,635 | 0,621 |
| Pg - 41 | 0,571 | 0,717 | 0,692 | 0,722 | 0,686 | 0,465 | 0,624 | 0,587 | 0,640 | 0,581 | 0,565 |
| Pg - 45 | 0,685 | 0,857 | 0,850 | 0,844 | 0,848 | 0,679 | 0,690 | 0,750 | 0,783 | 0,642 | 0,629 |
| Pg - 46 | 0,708 | 0,859 | 0,868 | 0,877 | 0,850 | 0,685 | 0,696 | 0,754 | 0,820 | 0,667 | 0,636 |
| Pg - 47 | 0,685 | 0,841 | 0,835 | 0,844 | 0,832 | 0,679 | 0,708 | 0,732 | 0,800 | 0,660 | 0,629 |
| Pg - 48 | 0,734 | 0,855 | 0,848 | 0,841 | 0,829 | 0,769 | 0,721 | 0,709 | 0,831 | 0,673 | 0,680 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Pg - 60 | Pg - 61 | Pg - 62 | Pg - 63 | Pg - 64 | Pg - 65 | Pg - 67 | Pg - 68 | Pg - 69 | Pg - 70 | Pg - 71 |
| Pg - 50 | 0,588 | 0,660 | 0,673 | 0,647 | 0,606 | 0,600 | 0,621 | 0,605 | 0,574 | 0,375 | 0,481 |
| Pg - 51 | 0,535 | 0,653 | 0,647 | 0,680 | 0,620 | 0,494 | 0,591 | 0,598 | 0,589 | 0,444 | 0,475 |
| Pg - 52 | 0,586 | 0,772 | 0,783 | 0,793 | 0,726 | 0,574 | 0,673 | 0,720 | 0,685 | 0,574 | 0,559 |
| Pg - 53 | 0,584 | 0,673 | 0,705 | 0,698 | 0,680 | 0,571 | 0,615 | 0,644 | 0,653 | 0,452 | 0,530 |
| Pg - 54 | 0,611 | 0,673 | 0,685 | 0,714 | 0,679 | 0,556 | 0,577 | 0,688 | 0,692 | 0,489 | 0,539 |
| Pg - 55 | 0,621 | 0,627 | 0,660 | 0,673 | 0,594 | 0,488 | 0,539 | 0,636 | 0,646 | 0,512 | 0,519 |
| Pg - 56 | 0,739 | 0,873 | 0,866 | 0,844 | 0,848 | 0,698 | 0,726 | 0,732 | 0,833 | 0,698 | 0,686 |
| Pg - 57 | 0,713 | 0,892 | 0,901 | 0,894 | 0,899 | 0,691 | 0,735 | 0,707 | 0,823 | 0,673 | 0,642 |
| Pg - 58 | 0,724 | 0,870 | 0,894 | 0,902 | 0,877 | 0,667 | 0,729 | 0,752 | 0,832 | 0,721 | 0,709 |
| Pg - 59 | 0,847 | 0,921 | 0,882 | 0,859 | 0,832 | 0,660 | 0,796 | 0,679 | 0,783 | 0,736 | 0,686 |
| Pg - 60 | 1,000 | 0,771 | 0,745 | 0,739 | 0,722 | 0,629 | 0,708 | 0,568 | 0,680 | 0,584 | 0,614 |
| Pg - 61 | 0,771 | 1,000 | 0,928 | 0,889 | 0,894 | 0,692 | 0,757 | 0,673 | 0,763 | 0,692 | 0,680 |
| Pg - 62 | 0,745 | 0,928 | 1,000 | 0,913 | 0,919 | 0,648 | 0,714 | 0,703 | 0,790 | 0,648 | 0,654 |
| Pg - 63 | 0,739 | 0,889 | 0,913 | 1,000 | 0,912 | 0,660 | 0,726 | 0,732 | 0,833 | 0,660 | 0,667 |
| Pg - 64 | 0,722 | 0,894 | 0,919 | 0,912 | 1,000 | 0,680 | 0,727 | 0,679 | 0,803 | 0,641 | 0,627 |
| Pg - 65 | 0,629 | 0,692 | 0,648 | 0,660 | 0,680 | 1,000 | 0,593 | 0,667 | 0,633 | 0,476 | 0,602 |
| Pg - 67 | 0,708 | 0,757 | 0,714 | 0,726 | 0,727 | 0,593 | 1,000 | 0,619 | 0,648 | 0,681 | 0,644 |
| Pg - 68 | 0,568 | 0,673 | 0,703 | 0,732 | 0,679 | 0,667 | 0,619 | 1,000 | 0,712 | 0,533 | 0,652 |
| Pg - 69 | 0,680 | 0,763 | 0,790 | 0,833 | 0,803 | 0,633 | 0,648 | 0,712 | 1,000 | 0,653 | 0,660 |
| Pg - 70 | 0,584 | 0,692 | 0,648 | 0,660 | 0,641 | 0,476 | 0,681 | 0,533 | 0,653 | 1,000 | 0,771 |
| Pg - 71 | 0,614 | 0,680 | 0,654 | 0,667 | 0,627 | 0,602 | 0,644 | 0,652 | 0,660 | 0,771 | 1,000 |
| Pg - 72 | 0,680 | 0,746 | 0,790 | 0,817 | 0,769 | 0,592 | 0,648 | 0,654 | 0,857 | 0,653 | 0,619 |
| Pg - 73 | 0,690 | 0,686 | 0,660 | 0,654 | 0,653 | 0,463 | 0,562 | 0,591 | 0,667 | 0,561 | 0,494 |
| Pg - 74 | 0,547 | 0,764 | 0,757 | 0,786 | 0,734 | 0,578 | 0,660 | 0,667 | 0,673 | 0,600 | 0,539 |
| Pg - 75 | 0,748 | 0,852 | 0,894 | 0,887 | 0,909 | 0,647 | 0,752 | 0,685 | 0,793 | 0,667 | 0,634 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | |
|----------|-------------------------|---------|---------|---------|
| | Pg - 72 | Pg - 73 | Pg - 74 | Pg - 75 |
| Ig - 792 | 0,619 | 0,889 | 0,652 | 0,614 |
| Ig - 799 | 0,611 | 0,861 | 0,598 | 0,606 |
| Ig - 802 | 0,587 | 0,789 | 0,643 | 0,604 |
| Ig - 806 | 0,796 | 0,722 | 0,724 | 0,821 |
| Ig - 808 | 0,581 | 0,831 | 0,659 | 0,619 |
| Ig - 809 | 0,734 | 0,710 | 0,653 | 0,814 |
| Ig - 822 | 0,741 | 0,804 | 0,680 | 0,732 |
| Ig - 828 | 0,786 | 0,771 | 0,654 | 0,776 |
| Ig - 854 | 0,653 | 0,861 | 0,644 | 0,646 |
| Ig - 860 | 0,793 | 0,620 | 0,685 | 0,783 |
| Ig - 865 | 0,640 | 0,810 | 0,674 | 0,654 |
| Ig - 868 | 0,596 | 0,821 | 0,605 | 0,633 |
| Pg - 01 | 0,810 | 0,709 | 0,729 | 0,862 |
| Pg - 02 | 0,835 | 0,703 | 0,756 | 0,855 |
| Pg - 03 | 0,816 | 0,716 | 0,735 | 0,853 |
| Pg - 04 | 0,810 | 0,673 | 0,780 | 0,831 |
| Pg - 05 | 0,846 | 0,684 | 0,770 | 0,896 |
| Pg - 06 | 0,859 | 0,696 | 0,783 | 0,894 |
| Pg - 07 | 0,806 | 0,667 | 0,759 | 0,813 |
| Pg - 08 | 0,745 | 0,581 | 0,660 | 0,736 |
| Pg - 09 | 0,837 | 0,673 | 0,777 | 0,872 |
| Pg - 10 | 0,831 | 0,667 | 0,770 | 0,866 |
| Pg - 12 | 0,841 | 0,691 | 0,746 | 0,831 |
| Pg - 15 | 0,822 | 0,708 | 0,760 | 0,857 |
| Pg - 16 | 0,837 | 0,690 | 0,760 | 0,857 |
| Pg - 17 | 0,871 | 0,648 | 0,741 | 0,859 |
| Pg - 19 | 0,840 | 0,660 | 0,757 | 0,846 |
| Pg - 20 | 0,869 | 0,642 | 0,702 | 0,825 |
| Pg - 21 | 0,873 | 0,673 | 0,763 | 0,846 |
| Pg - 23 | 0,846 | 0,684 | 0,754 | 0,866 |
| Pg - 24 | 0,840 | 0,696 | 0,764 | 0,874 |
| Pg - 25 | 0,741 | 0,565 | 0,620 | 0,732 |
| Pg - 26 | 0,822 | 0,673 | 0,744 | 0,857 |
| Pg - 27 | 0,793 | 0,526 | 0,699 | 0,835 |
| Pg - 28 | 0,810 | 0,629 | 0,761 | 0,832 |
| Pg - 31 | 0,780 | 0,608 | 0,764 | 0,787 |
| Pg - 32 | 0,754 | 0,571 | 0,717 | 0,797 |
| Pg - 33 | 0,598 | 0,704 | 0,532 | 0,593 |
| Pg - 34 | 0,611 | 0,557 | 0,621 | 0,626 |
| Pg - 35 | 0,763 | 0,627 | 0,727 | 0,836 |
| Pg - 41 | 0,600 | 0,619 | 0,717 | 0,635 |
| Pg - 45 | 0,817 | 0,692 | 0,732 | 0,839 |
| Pg - 46 | 0,852 | 0,717 | 0,772 | 0,857 |
| Pg - 47 | 0,850 | 0,692 | 0,750 | 0,823 |
| Pg - 48 | 0,780 | 0,627 | 0,745 | 0,787 |

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

| Isol. | Similaridades genéticas | | | |
|---------|-------------------------|------------|------------|------------|
| | Pg - 72 | Pg - 73 | Pg - 74 | Pg - 75 |
| Pg - 50 | 0,660 | 0,538 | 0,674 | 0,633 |
| Pg - 51 | 0,653 | 0,532 | 0,851 | 0,606 |
| Pg - 52 | 0,722 | 0,630 | 0,940 | 0,732 |
| Pg - 53 | 0,694 | 0,561 | 0,822 | 0,667 |
| Pg - 54 | 0,712 | 0,568 | 0,771 | 0,667 |
| Pg - 55 | 0,646 | 0,575 | 0,705 | 0,620 |
| Pg - 56 | 0,800 | 0,692 | 0,661 | 0,823 |
| Pg - 57 | 0,790 | 0,648 | 0,724 | 0,859 |
| Pg - 58 | 0,832 | 0,697 | 0,769 | 0,853 |
| Pg - 59 | 0,800 | 0,731 | 0,732 | 0,855 |
| Pg - 60 | 0,680 | 0,690 | 0,547 | 0,748 |
| Pg - 61 | 0,746 | 0,686 | 0,764 | 0,852 |
| Pg - 62 | 0,790 | 0,660 | 0,757 | 0,894 |
| Pg - 63 | 0,817 | 0,654 | 0,786 | 0,887 |
| Pg - 64 | 0,769 | 0,653 | 0,734 | 0,909 |
| Pg - 65 | 0,592 | 0,463 | 0,578 | 0,647 |
| Pg - 67 | 0,648 | 0,562 | 0,660 | 0,752 |
| Pg - 68 | 0,654 | 0,591 | 0,667 | 0,685 |
| Pg - 69 | 0,857 | 0,667 | 0,673 | 0,793 |
| Pg - 70 | 0,653 | 0,561 | 0,600 | 0,667 |
| Pg - 71 | 0,619 | 0,494 | 0,539 | 0,634 |
| Pg - 72 | 1,000 | 0,667 | 0,712 | 0,810 |
| Pg - 73 | 0,667 | 1,000 | 0,614 | 0,620 |
| Pg - 74 | 0,712 | 0,614 | 1,000 | 0,722 |
| Pg - 75 | 0,810 | 0,620 | 0,722 | 1,000 |