

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS  
DE *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella*  
*cingulata* f. sp. *phaseoli*) POR MEIO DE  
MARCADORES MORFOLÓGICOS**

**BRENO OLIVEIRA DE SOUZA**

**2005**

**BRENO OLIVEIRA DE SOUZA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS**

Dissertação 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 “Mestre”.

Orientadora

Profa. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

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

Souza, Breno Oliveira de

Variabilidade genética em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*  
(*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) por meio de marcadores morfológicos / Breno  
Oliveira de Souza. – Lavras : UFLA, 2005.

55 p. : il.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. 3. Variabilidade genética. 4. Marcador morfológico. 5. Compatibilidade vegetativa. 6. Compatibilidade sexual. 7. Anastomose entre hifa. 8. Anastomose entre conídio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163  
-589.240415

**BRENO OLIVEIRA DE SOUZA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS**

Dissertação 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 “Mestre”.

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2005

Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz

UFV

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa

UNILAVRAS

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

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**AO MEU PAI,**

**João Cavalcanti de Souza**, pela compreensão, apoio nas horas de necessidade e por sempre acreditar em mim.

**OFEREÇO.**

À minha família, em especial minha mãe, **Sônia Maria Oliveira de Souza** e meus irmãos, **Bruno Oliveira de Souza** e **Nathália Oliveira de Souza**.

Às minhas avós, **Maria do Carmo Cavalcanti de Souza** (in memorian) e **Maria José Rodriguez** (in memorian)

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e oportunidades na vida.

Aos meus pais e familiares, por compreenderem minha ausência.

À Professora Iranise Batista Bezerra Torres (Departamento de Biologia-UFPI), por ser minha mestra e amiga, incentivando e abrindo os caminhos por esta longa jornada em minha vida.

À Professora Ângela Célis de Almeida Lopes (Departamento de Biologia-UFPI), pela amizade, incentivo e encaminhamento ao mestrado;

Às minhas orientadoras, profa. Elaine Aparecida de Souza (UFLA) e profa. Maria Cristina Mendes Costa (UNILAVRAS), pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade, confiança e paciência dispensados.

À Professora Marisa Vieira de Queiroz (UFV), pela disponibilidade e por estar presente na banca examinadora deste trabalho.

Ao Professor João Bosco dos Santos, pelos ensinamentos transmitidos e por ser o suplente da banca examinadora deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia, principalmente os do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos companheiros de laboratório da UFLA, Francine e Osnil, pelo apoio e amizade;

Aos companheiros de laboratório do UNILAVRAS, Renata e Marco Aurélio, pela amizade e ajuda concedida nos experimentos.

Aos funcionários e colegas de curso do Departamento de Biologia.

Aos laboratoristas Lamartine (Laboratório de Genética Molecular) e Soraia (Laboratório de Citogenética), pela amizade e disponibilidade.

Aos companheiros do mestrado, principalmente Patrícia Pierre e Juliana Érika, pela amizade e apoio.

Às amigas de Lavras, Vanessa Lasmar, Vilma Baumann e Joelma Pereira que, além da amizade, me ajudaram no equilíbrio físico e emocional e me deram forças para ultrapassar esta etapa em minha vida.

Aos amigos de república Airton, Kaesel e Cristovão, pela ajuda, paciência e companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, estando por perto, ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. A todos o meu mais sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 Introdução .....	1
2 Referencial teórico .....	2
2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ( <i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i> ) .....	2
2.2 Variabilidade patogênica de <i>C. lindemuthianum</i> .....	9
2.3 Variabilidade genética em fungos fitopatógenos .....	14
2.4 Reprodução sexual .....	14
2.5 Anastomoses entre hifas e conídios .....	16
3 Material e métodos .....	19
3.1 Obtenção e manutenção dos isolados .....	19
3.2 Compatibilidades vegetativa entre os isolados de <i>C. lindemuthianum</i> e sexual entre os isolados de <i>G. cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .....	20
3.3 Anastomoses entre hifas e conídios .....	21
3.4 Avaliação dos caracteres morfológicos .....	22
3.5 Avaliações citológicas .....	24
3.6 Análises estatísticas .....	24
4 Resultados e discussão .....	26
4.1 Compatibilidade vegetativa entre os isolados de <i>C. lindemuthianum</i> .....	26
4.2 Compatibilidade sexual entre os isolados de <i>G. cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i> ...	28
4.3 Anastomoses entre hifas e conídios .....	29
4.4 Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e capacidade de esporulação nos isolados de <i>C. lindemuthianum</i> .....	31
4.5 Caracteres culturais e reprodutivos dos isolados .....	34
4.6 Dimensões dos conídios .....	39
4.7 Dimensões dos ascósporos .....	42
5 Conclusões .....	45
Referências bibliográficas .....	46
ANEXOS .....	54



## RESUMO

SOUZA, Breno Oliveira de. **Variabilidade genética em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) por meio de marcadores morfológicos**. UFLA, 2005. 55p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas)\*

*Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) apresenta ampla variabilidade genética, demonstrada por suas características morfológicas. Este trabalho objetivou caracterizar, por meio de marcadores morfológicos, diferentes isolados (LV4, LV33, LV47, LV51, LV71, LV76, LV77, LV79, LV80, LV81, LV82, LV83, LV84) de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) e identificar marcadores morfológicos com uso potencial em análises genéticas. Foram avaliados os seguintes caracteres morfológicos e culturais: cor e textura das colônias, compatibilidade vegetativa e sexual, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro colonial (DC), capacidade de esporulação (CE), dimensões e formas conidiais, dimensões dos ascósporos, formação de estruturas reprodutivas e formação de anastomoses entre hifas e conídios. Todos os isolados de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) comportaram-se como incompatíveis. Os isolados LV77 e LV76 foram os mais estáveis. Ocorreu a formação de anastomoses entre conídios dentro dos isolados LV51 e LV77 e anastomoses entre hifas dentro dos demais isolados de *C. lindemuthianum* avaliados. Os isolados LV4 e LV76, destacaram-se devido à passagem de núcleos entre hifas. Os dados obtidos demonstraram que os isolados de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) possuem ampla variabilidade genética para todas as características avaliadas e que a forma do conídio pode ser usada como marcador morfológico em análises genéticas.

---

\*Comitê de Orientação: Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza (Orientadora), Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa (Co-orientadora)

## ABSTRACT

SOUZA, Breno Oliveira de. **Genetic variability in isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) by morphologic markers**. UFLA, 2005. 55p. (Dissertation – Master in Agronomy/Plant Genetics and Breeding)\*

*Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) presents wide genetic variability, demonstrated by its morphologic characteristics. The objective of this study was to characterize morphologic markers in different isolates (LV4, LV33, LV47, LV51, LV71, LV76, LV77, LV79, LV80, LV81, LV82, LV83, and LV84) of *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) and, to identify morphologic markers with potential use in genetic analyses. The following morphologic and cultural traits were evaluated: color and texture of the colonies, vegetative and sexual compatibility, micelial growth speed index (MGSI), colonial diameter (CD), esporulation capacity (EC), conidias dimensions and form, ascospores dimensions, formation of reproductive structures and anastomosis formation between hifas and conidias. All isolates of *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) behaved as incompatible. The LV77 and LV76 isolates were the more stable. Anastomosis were observed among conidias within the LV51 and LV77 isolates and also among hifas in all isolates of *C. lindemuthianum* evaluated. The LV4 and LV76 isolates, stood out due to passage of nuclei among hifas. The data showed that the isolates of *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) own wide genetic variability for all characteristics and that the conidial form can be used as morphologic marker in genetic analysis.

---

\*Guidance Committee: Dra. Elaine Aparecida de Souza (Major Professor), Dra. Maria Cristina Mendes Costa.

## 1 INTRODUÇÃO

*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. fase mitospórica, anomórfica ou assexual de *Glomerella cingulata* (Stonem & V. Scherenk) f. sp. *phaseoli* é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum, doença de maior destaque nesta cultura. Este patógeno causa lesões inicialmente nas folhas e ramos de *Phaseolus vulgaris*. Posteriormente, atinge as vagens desta planta, causando prejuízos irreparáveis à cultura quando em condições propícias para o seu desenvolvimento.

*C. lindemuthianum* apresenta diferentes raças fisiológicas. Este fato, além de outros como as características morfológicas e culturais do patógeno, permite identificar que a espécie possui ampla variabilidade genética. Vários mecanismos são responsáveis pela variabilidade genética em fungos. Muitos destes fenômenos importantes observados em patógenos de plantas nunca foram explicados adequadamente, tais como as anastomoses entre hifas e conídios.

A fase sexuada *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, até o presente momento, nunca foi encontrada na natureza, sendo obtida facilmente pelo seu desenvolvimento espontâneo em cultivos de laboratório. A obtenção de linhagens férteis e compatíveis é importante em estudos de segregação.

O estudo das características morfológicas em microrganismos é importante, devido à ampla variabilidade genética existente e à falta de caracteres morfológicos evidentes, necessários para serem utilizados como marcadores morfológicos em estudos genéticos. Portanto, o presente trabalho objetivou estudar a variabilidade genética de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) por meio de marcadores morfológicos e, além disso, identificar marcadores morfológicos com uso potencial em análises genéticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata*)

Os fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem à classe Deuteromycetes e são incapazes de se reproduzirem sexualmente (Alexopoulos & Mims, 1979). Eles apresentam micélio hialino, marrom-claro ou escuro, conidioma acervular com a presença ou não de setas, hialinos a marrons, septados de parede lisa portando células conidiogênicas produtoras de fiáides de conídios hialinos a marrons de paredes lisas, variando de alongados a falcados (Sutton, 1980). A classificação dos fungos do Gênero *Colletotrichum* baseia-se na sua forma de reprodução: forma meiospórica = forma sexual = forma teleomórfica, tendo seu estágio conidial sido encontrado primeiro, forma mitospórica = forma assexual = forma anomórfica, e nessa forma, ele é mais amplamente empregado e conhecido.

*C. lindemuthianum* apresenta micélio apocítico e ramificado e se reproduz de forma assexual (Taber & Taber, 1974). Nesta forma de reprodução ele causa a antracnose no feijoeiro comum, doença de maior destaque nesta cultura (Rava & Sartorato, 1994). Sutton (1980; 1992) relatou que seus conídios formam massa de cor salmão ou mel, são hialinos, unicelulares, oblongos e cilíndricos, apresentando as extremidades arredondadas. Segundo Chaves (1980), os conídios são hialinos, unicelulares, de alongados a cilíndricos, apresentando as extremidades redondas ou uma delas pontiaguda. Os conídios medem, normalmente, de 4,4 a 5,3  $\mu\text{m}$  de raio e o seu perímetro varia de 13-22  $\mu\text{m}$  com variação no comprimento e largura (Tabela 1). Geralmente, apresenta um vacúolo central; ao germinar pode emitir de 1-4 tubos germinativos, sendo mais freqüente dois, formando apressórios por ocasião da infecção no hospedeiro. Sobre meio de cultura, enquanto ocorre a emissão do tubo germinativo, o núcleo quase sempre entra no processo de divisão (mitose) e o núcleo filho dirige-se para o lado oposto

da célula (conídio) (Alexopoulos et al., 1996). Geralmente, o tubo germinativo tem origem lateral no conídio. No surgimento ou durante a emergência do tubo germinativo, desenvolve-se um septo perto da região mediana do conídio, dividindo-o em duas células uninucleadas. São formados apressórios maduros multinucleados, indicando a ocorrência de divisão mitótica durante a diferenciação do apressório (Mould et al., 1991; Manandhar et al., 1995).

No Brasil, são poucos os trabalhos realizados para avaliar o comprimento e largura dos conídios de fungos do Gênero *Colletotrichum*. Na Tabela 1 são apresentados dados referentes à amplitude de variação do comprimento e largura dos conídios de *Colletotrichum* spp. obtidas por alguns autores.

**TABELA 1** Estimativas do comprimento e largura ( $\mu\text{m}$ ) dos conídios de *Colletotrichum* spp.

Espécie	Comprimento		Largura		Fonte
	Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	
<i>C. lindemuthianum</i>	13,00	22,00	4,40	5,30	Rava & Sartorato (1994)
<i>C. lindemuthianum</i>	11,89	14,25	4,80	6,55	Roca et al. (2003)
<i>C. lindemuthianum</i>	14,27	16,68	5,56	5,75	Ishikawa et al. (2003)
<i>C. gloesporioides</i>	10,53	20,20	4,08	7,41	Feitosa (1977)
<i>C. gloesporioides</i>	9,80	12,25	2,00	3,50	Dias (2002)

Ao desenvolverem corpos de frutificação do tipo sexual e completarem este modo de reprodução culminando na produção de esporos sexuais, um fungo anteriormente pertencente à classe Deuteromycete é transferido simultaneamente à classe Ascomycete ou Basidiomycete, com mudanças na nomenclatura científica. No caso de *Colletotrichum lindemuthianum*, sua forma sexual é chamada de *Glomerella cingulata* f sp. *phaseoli* (Kimati & Galli, 1970).

*Glomerella cingulata* é um patógeno de plantas economicamente muito importante, que abrange 115 gêneros de angiospermas nesta forma teleomórfica e 198 na sua forma anomórfica (*Colletotrichum*) (Uecker, 1994). *G. cingulata* é bastante citada na literatura; ocorre em muitos diferentes hospedeiros com variação para características culturais, temperatura ótima de crescimento, produção de estruturas reprodutivas e patogenicidade (Bryson, 1992). Uma extensa lista de nomes (sinônimos) para as formas teleomórfica e anomórfica é citada na literatura de acordo com o hospedeiro. Von Arxs & Muller (1954) e Von Arxs (1957), citados por Uecker (1994), listaram 117 formas para *G. cingulata* e aproximadamente 600 sinônimos para o gênero *Colletotrichum*.

*G. cingulata* é classificado na classe Ascomycete, ordem Diaportales. Denominado inicialmente de *Glomerella lindemuthianum* Briosi & Cav., apresenta peritécios (corpos de frutificação sexuais) inicialmente hialinos e de pigmentação escura com a idade apresentando 120-210 µm de diâmetro (predominando 160 µm). Os rostros, se presentes, medem de 30-80 µm. O canal do peritécio é forrado por paráfises hialinas e filiformes. Os peritécios portam, em média, 30 ascos de 60 x 6 µm envolvidos por paráfises (células estéreis dos corpos de frutificação) hialinas, filiformes e delicadas que desaparecem no 27º dia. São de formas alantóides (20 x 6,5 µm) e elipsoidais (10 x 4 µm). Cada asco porta os ascósporos (esporos sexuais) fusiformes, asseptados e encurvados apresentando 9-19 µm de comprimento por 4-5 µm de largura (Bryson, 1992; Kimati & Galli, 1970; Lucas, 1946; Mendes-Costa, 1996; Shear & Wood, 1913).

Em cada asco pode haver de 1-8 ascósporos alantóides ou oito ascósporos elipsoidais (Bailey & Jeger, 1992; Roca et al., 2003).

O ciclo sexual de um fungo ascomiceto é dividido em quatro passos: iniciação do peritécio, plasmogamia (fusão celular), cariogamia (fusão nuclear) e divisão meiótica (Wheeler, 1954). O processo inicia-se com duas células uninucleares que se desenvolvem com curtas ramificações nas proximidades dos septos das hifas (gancho de conexão). Ocorre o crescimento externo das duas hifas adjacentes, formando duas células, cada uma chamada de hifa de copulação. A hifa de copulação interna produz o ascogônio e a externa a parede do peritécio. O ascogônio funde-se com a hifa de copulação e seguem-se, então, o desenvolvimento das hifas ascógenas, o desenvolvimento dos primórdios dos ascos, a cariogamia, a meiose, a mitose pós-meiótica e a formação dos ascósporos. Este processo completa-se com o desenvolvimento da parede peritecical (McGahan & Wheeler, 1951; Roca, et al., 2003; Wheeler, 1954).

Lucas (1946) verificou que em *G. cingulata* ocorre um número haplóide de quatro cromossomos nos ascos jovens antes da fusão e depois da divisão reducional. Posteriormente, este número foi confirmado por Wheeler et al. (1948); Roca et al. (2003) e Ishikawa & Souza (2004).

Estudos genéticos e citológicos foram realizados em *G. cingulata* até a década de 1950 (Chilton et al., 1945; Chilton & Wheeler, 1949a, 1949b; Edgerton, 1912; 1914; Lucas et al., 1944; Lucas, 1946; McGahan & Wheeler, 1951; Wheeler & McGahan, 1952; Wheeler & Driver, 1953; Wheeler et al., 1948; Wheeler, 1950, 1954, 1956). Após este período não se encontram relatos na literatura até 1970, quando Kimati & Galli confirmaram a forma meiospórica para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Relatos posteriores de Batista & Chaves (1982), Bryson et al. (1992) e Mendes-Costa (1996) revelam que a utilização da forma meiospórica para estudos genéticos tem sido pouco explorada. Mais recentemente, Uecker (1994) descreveu as etapas do desenvolvimento de

peritécios de *G. cingulata* e Roca et al. (2003) realizaram estudos citogenético e morfológico utilizando este fungo.

Edgerton (1912; 1914) foi o primeiro a descrever morfológicamente colônias de *G. cingulata* de acordo com a distribuição de peritécios sobre meio de cultura. Ele observou uma linhagem que produzia peritécios em aglomerados (“grumos”) denominada “plus” (+) e, a partir de monoascospóricas deste isolado foi obtida uma linhagem produtora de peritécios dispersos em cultura denominada “minus” (-). Posteriormente Lucas et al. (1944) realizaram cruzamentos entre estas duas linhagens obtidas por Edgerton. Estes autores observaram sete tipos de segregações distintas para as seguintes características: fertilidade da colônia, produção, cor e tamanho dos conídios e distribuição dos peritécios sobre o meio de cultura utilizado. Chilton e colaboradores, em 1945, realizaram cruzamentos entre quatro linhagens de *G. cingulata* denominadas ‘plus A’, ‘minus A’, ‘minus B’ e ‘conidial A’. Eles obtiveram seis segregantes e apenas dois diferiram dos genitores, sendo denominados de ‘conidial B’ e ‘conidial C’.

Wheeler et al. (1948) cruzaram quatro diferentes linhagens de *G. cingulata*; ‘plus A’, ‘plus B’, ‘minus B’ e ‘conidial A’. Os cruzamentos entre as linhagens ‘plus’ e ‘minus’ produziram peritécios férteis em abundância sobre meio de cultura. A linhagem ‘conidial A’ não produziu peritécios férteis, mas sim um grande número de conídios. Foram estudados peritécios em vários estágios de desenvolvimento oriundos do cruzamento entre ‘plus A’ e ‘conidial A’, bem como das linhagens ‘plus’ e ‘minus’, separadamente. Todavia nenhuma diferença entre o desenvolvimento dos peritécios provenientes do cruzamento e nas diferentes linhagens foi observada.

Chilton & Wheller (1949b) estudaram o efeito da idade da cultura de *G. cingulata* na ocorrência da variante morfológica ‘minus’. Os autores observaram que, com a idade, aumenta o número de linhagens ‘minus’ obtidas quando



realizadas monoascospóricas. Wheller (1950) verificou a capacidade de colônias ‘plus’ na produção de mutantes ‘minus’, por meio de diluições de ascósporos oriundos do cruzamento das linhagens ‘plus A’ e ‘plus B’ e posterior análise da ocorrência de colônias da variante ‘minus’ por área, na placa de petri e por análise dos ascos descendentes do cruzamento entre estas linhagens.

No ano de 1951, Mcgahen & Wheeler relataram o desenvolvimento inicial de peritécios oriundos de autofertilização e de fecundação cruzada em diferentes culturas de *Glomerella cingulata*. Estes autores observaram que, inicialmente, ocorre a formação de duas células ‘enroladas’ (ascogônio em desenvolvimento inicial). A plasmogamia ocorre em função de uma terceira hifa que se funde com a célula inicial do ascogônio. Este evento marca o início da condição dicariótica, que é mantida por meio da proliferação do cruzamento (micélio dicariótico) e fusão nuclear para a formação dos ascos. Posteriormente, estes mesmos autores, no ano de 1952, estudaram o efeito de genes na compatibilidade sexual entre linhagens de *G. cingulata*. Quatro locos foram estudados. Cruzamentos entre as linhagens indicaram a existência de dois locos, designados A e B, com três alelos em cada. Alelos mutantes designados F e *st*, encontrados nos outros dois locos, causam completa auto-esterilidade quando introduzidos em culturas selvagens homotáticas obtidas a partir do cruzamento entre culturas heterotáticas resultantes da recombinação dos genes A e F ou A e *st*. Os alelos dos locos A e B aparentemente afetam indiretamente a formação dos tipos sexuais diferentes (matings), modificando o efeito dos genes A e B ou inibindo a produção de peritécios.

Wheller & Driver (1953) utilizaram uma variante de *G. cingulata* obtida devido ao crescimento em meio de cultura contendo radiocarbono. Esta variante produzia ascósporos com, aproximadamente, um terço do tamanho normal denominado esporo anão e com a curvatura característica dos ascósporos desta espécie. Os resultados dos estudos citológicos e genéticos indicaram que a

característica esporo anão estava sendo controlada por um alelo mutante denominado  $dw^1$  (dwarf). Em cultura monospórica, este gene controla a posição da fusão nuclear para a formação dos ascósporos nos ascos. Em cruzamento, um alelo que determinava esporos não anões ( $dw^+$ ) foi completamente dominante em células heterozigóticas, mas sempre parcialmente dominante em células heterocarióticas. Muitos ascos originados do cruzamento de colônias que produziam ascósporos anões com colônias que produziam ascósporos normais (não anões), portavam quatro ascósporos de tamanhos normais, dois anões e dois de tamanho intermediário. Evidências de estudos do arranjo (disposição) de esporos e do efeito materno exercido no cruzamento sugerem que o produto do alelo  $dw^+$  (tipo selvagem) é o responsável pela ocorrência destes tipos de esporos intermediários.

Wheeller (1956) estabeleceu grupos de ligação entre mutantes auxotróficos de *G. cingulata*. Muitos dos cruzamentos envolveram quatro ou cinco pares de genes em heterozigose encontrados nos locos de compatibilidade A e B. Cruzamentos entre tipos selvagens  $A^+ B^+$  com parentes mutantes  $A^1 B^1$  foram realizados. Um total de 1.211 ascos foram completamente caracterizados, dos 61 cruzamentos analisados. Cada mutação caracterizada no estudo pareceu ser controlada por um único gene e em todos os casos ocorreu segregação mendeliana regular. Dados de segregação indicaram grupos de ligação representados em três cromossomos, incluindo os *loci* A e B que foram inclusos no Grupo de ligação I. Nestes locos, como comentado anteriormente, é onde se encontram os genes que controlam os tipos sexuais diferentes (matings).

Muitos fungos possuem o ciclo sexual, facilitando, com isso, o seu estudo genético. Em outros fungos, o ciclo sexual ainda não foi descrito ou é inexistente (Azevedo, 1998). Segundo Bryson et al. (1992), a literatura sobre *Colletotrichum* indica que não ocorre a formação de peritécios na natureza ou em laboratório. Enquanto este fato parece ocorrer em algumas circunstâncias,

parece provável que a assexualidade tem sido exagerada devido à pequena amostra de isolados avaliados, o uso de culturas antigas, o fracasso nas tentativas de cruzamentos entre as linhagens e as condições inadequadas de cultura. A obtenção de linhagens férteis de laboratório facilitará muito os estudos genéticos e de patogenicidade (Camargo Jr., 2004).

## **2.2 Variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum*.**

O agente causal da antracnose do feijoeiro apresenta muitas raças fisiológicas, definidas em função da capacidade dos mesmos de causar doenças em cultivares diferenciadoras universais de um mesmo hospedeiro (Batista & Chaves, 1982; Kimati & Galli, 1970; Mahe et al., 1993; Perfect et al., 1999; Rava et al., 1993; Rava et al., 1994; Roca et al., 2003; Silva, 2004).

O primeiro a verificar a existência da ampla variabilidade patogênica em *C. lindemuthianum* foi Barrus (1911). Este autor observou que cultivares de feijoeiro, quando inoculadas com diversos isolados, apresentavam sintomas diferenciados. Duas raças diferentes do patógeno foram identificadas e chamadas de Alfa e Beta. Burkholder (1923), citado por Sartorato & Rava (1994), identificou outra raça e denominou-a de Gama. Uma quarta raça foi descoberta por Andus & Wade (1942) citado por Walker et al. (1991), a qual foi denominada de Delta. Três novas raças foram encontradas no México, por Yerkes & Ortiz (1956) e foram denominadas de México I, México II e México III.

Utilizando-se apenas três cultivares diferenciadoras (Michelite, Dark Red Kindney e Perry Morrow) e duas classes de reação (suscetível e resistente) podia-se determinar um total de oito raças fisiológicas. A última raça possível de ser identificada por esse método binário foi a Brasileiro I, identificada no Brasil por (Oliveira et al., 1973).

A ampla variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* em várias partes do mundo e as diferentes denominações dadas fizeram com que pesquisadores da área estabelecessem um conjunto padronizado de cultivares diferenciadoras para ser usado internacionalmente. Em comum acordo, foi estabelecida uma nomenclatura que pudesse ser usada por todos os pesquisadores do mundo. No caso de *C. lindemuthianum*, foram recomendadas doze cultivares diferenciadoras pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), utilizando o sistema binário proposto por Habgood (1970).

Este método de identificação de raças fisiológicas consiste na utilização de um grupo de cultivares diferenciadoras internacionais, dispostas em uma ordem preestabelecida, utilizando um método binário e obtida por expansão binomial de tal forma que o nome da raça é o número. Este sistema permite identificar um total de  $2^n = 2^{12} = 4096$  raças, em que  $n$  é o número de cultivares diferenciadoras (Pastor-Corrales, 1992). Na Tabela 2 constam as doze cultivares diferenciadoras (1 a 12), com seus respectivos valores binários, exemplificando como classificar um isolado de determinada raça. Foi exemplificada a identificação de um isolado pertencente à raça 65, identificado devido ao somatório dos valores binários referente às cultivares com as quais o isolado apresentou reação de suscetibilidade (1 + 64).

**TABELA 2** Conjunto de cultivares diferenciadoras utilizadas na classificação de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* com seus respectivos valores binários.

<b>Cultivares diferenciadoras</b>	<b>Série binomial</b>	<b>Valor binário</b>	<b>Reação</b>
1 Michelite	$2^0$	1	<b>S*</b>
2 MDRK	$2^1$	2	R
3 Perry Marrow	$2^2$	4	R
4 Cornell 49-242	$2^3$	8	R
5 Widusa	$2^4$	16	R
6 Kaboon	$2^5$	32	R
7 México 222	$2^6$	64	<b>S*</b>
8 PI 207262	$2^7$	128	R
9 TO	$2^8$	256	R
10 TU	$2^9$	512	R
11 AB136	$2^{10}$	1024	R
12 G2333	$2^{11}$	2048	R

**\*Raça 65 (1+64)**

Molano et al. (1995) diferenciaram, por meio deste sistema binário, onze raças de *C. lindemuthianum* de isolados coletados em várias regiões da Colômbia. Os autores concluíram que as raças identificadas eram geneticamente relacionadas, pois apresentavam em comum o fenótipo da virulência, diferenciando-se apenas em poucos genes de patogenicidade. Concluíram também que este tipo de informação permite aos pesquisadores monitorar a diversidade patogênica do fungo, ou seja, se essa variabilidade muda através dos anos e se a ocorrência de raças fisiológicas do fungo é similar em outras regiões.

Balardin & Kelly (1998) concluíram que a raça 73 tem se caracterizado como o isolado de *C. lindemuthianum* de mais ampla ocorrência, em países da

América do Sul, Central e do Norte. Estudando cinco regiões produtoras de feijão no México, González et al. (1998) observaram a ocorrência de dez raças de *C. lindemuthianum* (0, 8, 256, 264, 320, 384, 392, 448, 1088, 1472). Foram encontradas, exclusivamente, em Zacatecas as raças 320 e 1472; em Durango, a raça 1088; a raça 384 em Jalisco e as raças 8 e 264 em Michiocán. Elevada variabilidade foi encontrada na região de Michiocán (cultivo de pequenas áreas em consórcio), onde foram identificados seis isolados, entre os quais foram observadas seis raças distintas, enquanto que em Chihuahua (grandes áreas e monocultura), onde apenas uma cultivar é plantada há vários anos, apenas uma raça foi encontrada.

Somavilla & Prestes (1999), em um levantamento realizado em oito regiões produtoras de feijão no Rio Grande do Sul, relataram a ocorrência de onze raças de *C. lindemuthianum* (5, 23, 64, 65, 67, 73, 81, 83, 87, 89, 321). Pela primeira vez, foi mencionada a ocorrência da raça 321, sendo 81 e 65 as mais freqüentes, na proporção de 39% e 23%, respectivamente. As raças 65 e 83 ainda não tinham sido identificadas no estado. Um aumento da freqüência da raça 73 foi evidenciado, comparado ao que foi relatado por Balardin (1997).

Sartorato (2002) realizaram levantamentos de raças de *C. lindemuthianum* em oito Estados do Brasil. Este autor observou a ocorrência de 26 raças fisiológicas deste patógeno, dentre as quais onze (77, 85, 93, 96, 105, 109, 111, 123, 125, 127 e 193) não haviam sido identificadas até aquele momento. A raça 73 foi a de maior freqüência e as raças 65, 69, 73, e 81 foram as que apresentaram a maior distribuição geográfica.

Thomazella et al. (2002) realizou trabalhos sobre identificação de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* no Paraná utilizando as doze cultivares diferenciadoras recomendadas pelo CIAT. Estes autores encontraram um total de 18 isolados oriundos de diferentes regiões produtoras de feijão e identificaram nove raças: 7, 31, 65, 69, 73, 81, 87, 89, 95.

O estudo da reação em cultivares diferenciadoras aos 17 isolados de *C. lindemuthianum* coletados no estado de Minas Gerais por Talamini et al. (2004b), revelou a ocorrência de quatro raças (8, 65, 81, 87), tendo, 65 e 81 sido as raças de maior frequência. As cultivares diferenciadoras TO, TU, AB136 e G2333 não foram suscetíveis a nenhum dos isolados avaliados. Já Mahuku & Riascos (2004) identificaram 90 raças entre 200 isolados obtidos de diferentes países do mundo. As raças 3481, 3545, 3977 e 3993 foram identificadas. Foi possível verificar, por meio deste levantamento, que todas as cultivares diferenciadoras, inclusive a G2333, tiveram a sua resistência quebrada pelos isolados de *C. lindemuthianum*. Este fato evidencia que o uso de cultivares diferenciadoras não está mais sendo eficiente para a determinação da variabilidade patogênica devido à grande amplitude genética que os isolados de *C. lindemuthianum* apresentaram.

Talamini et al. (2004a) identificaram onze raças fisiológicas diferentes em 43 isolados brasileiros de *C. lindemuthianum* e verificaram que aquelas capazes de infectar germoplasma Mesoamericano foram as mais frequentes e somente as cultivares diferenciadoras Kaboon, Pi 207262, AB136 e G2333 foram resistentes aos isolados estudados.

De acordo com os relatos anteriores, percebe-se que é grande a variabilidade genética de *C. lindemuthianum*, demonstrada por meio da amplitude de variações morfológicas e culturais e da quebra de resistência das cultivares diferenciadoras de patogenicidade ao longo do tempo. Vários mecanismos são responsáveis pela ampliação desta variabilidade em fungos fitopatógenos. O estudo destes mecanismos é necessário para a elaboração de estratégias que possam vir a ser utilizadas no melhoramento de cultivares de feijoeiros visando à resistência a este patógeno.

### **2.3 Variabilidade genética em fungos fitopatógenos**

A origem de um novo alelo ocorre basicamente por meio de mutação. A heterocariose e a heteroplasiose conduzem a variação genética em fungos selvagens (Hastie, 1981). Novas combinações (rearranjos) podem ser formadas a partir de reprodução sexuada; esta é a forma mais comum de aumento da variabilidade genética. Contudo, em fungos filamentosos, tanto a forma meiospórica quanto a mitospórica são altamente variáveis e podem ocorrer outros tipos de mecanismos de transferência de material genético, nas quais novas formas de arranjo do genoma poderiam culminar no aumento da variabilidade genética, dentre elas, anastomose entre hifas e conídios.

### **2.4 Reprodução sexual**

Embora no ciclo sexual de cada espécie de fungo já descrito existam particularidades próprias, ele se caracteriza, de forma geral, pela existência em um mesmo citoplasma de núcleos haplóides com constituições genéticas distintas (dicárions) que se fundem em estruturas apropriadas, produzindo um núcleo diplóide, que, quase imediatamente, sofre meiose, restaurando o estado haplóide dos núcleos (Azevedo, 1987).

Em células haplóides existem tipos celulares necessários para que ocorra cariogamia, meiose e posterior esporulação. Em ascomicetos filamentosos este nível de complexidade celular é requerido para a formação de tipos sexuais diferentes (*matings types*). Nos fungos, de forma geral, ocorrem os dois tipos sexuais necessários para a fecundação cruzada e estes são determinados por alelos alternativos em um único loco (Kues & Casselton, 1996).

Wheller (1954) comentou sobre o efeito de vários genes que bloqueiam diferentes passos no processo de reprodução sexuada em *G. cingulata*. O processo sexual foi arbitrariamente dividido em quatro passos, citados anteriormente nesta revisão. O autor afirma que estes passos não são apenas



simples eventos; por exemplo, plasmogamia envolve copulação, desintegração da parede celular que separava as células envolvidas na cópula, transferência nuclear e estabelecimento do dicáron.

A reprodução sexual do gênero *Glomerella* foi inicialmente estudada por Edgerton, (1912; 1914), constituindo-se na primeira descrição da diferenciação sexual em ascomiceto (Weller, 1954). Estudos foram realizados em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* por Mendes-Costa (1996), mostrando a natureza homotática deste fungo e contradizendo os resultados apresentados por Kimati & Galli (1970); Bryson (1990) que descreveram o fungo como heterotático. Camargo Jr. (2004) realizou cruzamentos entre nove linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* para posterior análise dos recombinantes por meio de marcadores RAPD e verificou que este fungo é, ao mesmo tempo, homotático e heterotático, classificando-o como pseudo-homotático. Os estudos descritivos realizados até agora nesta espécie foram feitos com microscopia de luz (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996; Roca et al., 2003; Ishikawa et al., 2003; Ishikawa & Souza, 2004), eletrônica de transmissão (Roca, et al., 2000) e utilizando marcadores moleculares (Camargo Jr., 2004).

Estudos sobre compatibilidade sexual em *C. lindemuthianum* foram realizados por meio de cruzamentos em suspensões conidiais (Kimati & Galli, 1970; Batista & Chaves, 1982) e culturas pareadas duas a duas (Bryson, 1990); em todos os resultados apresentados, as colônias fúngicas foram estéreis, quando crescidas em separado (não homotáticas). No entanto, desenvolveram poucos peritécios férteis quando combinadas (heterotáticas) (Bryson et al., 1992). Posteriormente, Mendes-Costa (1996) observou a natureza homotática de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* em isolados provenientes de Lambari, Patos de Minas, MG e de Goiânia, GO. Rodriguez-Guerra et al. (1999) verificaram a formação de peritécios estéreis (prototécios) entre isolados de *C. lindemuthianum* confrontando-os dois a dois e Camargo Jr. (2004) só obteve

cruzamentos entre colônias claras e escuras de linhagens diferentes, constatando o que tem sido relatado na literatura (Lucas, 1946; Wheller, 1952).

## **2.5 Anastomoses entre hifas e conídios**

Anastomoses entre hifas é um evento de conexão celular que ocorre entre os organismos. Nos fungos, para que ocorram cruzamentos, é necessária a fusão entre tipos sexuais diferentes, um pré-requisito para a reprodução sexuada. No entanto, fusões entre hifas vegetativas são observadas em fungos filamentosos; para tal, o processo de anastomose também é inicialmente requerido e, conseqüentemente, ocorre troca de material genético, tanto do núcleo inteiro como apenas de fragmentos. Estas pontes permitem também a troca de material genético extranuclear, como DNA mitocondrial ou plasmidial e ainda podem gerar heterocariose (Griffiths, 1995).

A heterocariose em fungos filamentosos é obtida por meio de anastomoses que permitem a passagem ou troca do núcleo, assim como parte do citoplasma. Bos (1985) e Mendes-Costa et al. (1998) encontraram anastomoses entre hifas em *C. lindemuthianum*; estas podem ser de dois tipos: forma de H e adjacente, mas não foram observadas passagens de núcleo. O processo de formação das anastomoses foi acompanhado detalhadamente e verificou-se que, nesta espécie, estas conexões ocorrem freqüentemente e não ocasionalmente (Bos, 1985). Já Ishikawa et al. (2003) observaram os mesmos tipos de anastomoses entre hifas, com passagem de núcleo.

Ocorrem vários tipos de conexões entre células ou pontes intercelulares. Um outro tipo de conexão celular é anastomose entre conídios. Roca et al. (2003) realizaram o trabalho mais detalhado sobre este tipo de conexão celular em *C. lindemuthianum*. Nestas células conectadas, o núcleo pode se encontrar perto do tubo de anastomose, no meio deste ou no conídio conectado, próximo do outro núcleo, evidenciando fusão. Em alguns isolados foram encontrados de

um a três micronúcleos e anastomoses formadas por mais de dois conídios. Poucas quantificações foram realizadas neste trabalho. Embora existam evidências citológicas indicando eventos provavelmente envolvidos com a variabilidade genética da espécie, ainda não se sabe a dinâmica destes eventos, como ocorrem, quando ocorrem e se realmente geram algum tipo de variação (Roca et al., 2003). Os autores ainda citam que as comparações com outros dados bibliográficos foram prejudicadas devido à escassez de publicações sobre este assunto. Foram demonstrados também os eventos citológicos envolvidos na anastomose entre conídios de *C. lindemuthianum* e comentou-se que a formação destas pontes parece ser um processo tardio, uma vez que, para todos os isolados utilizados pelos autores, estas estruturas só foram observadas após o final da esporulação. Depois de quinze dias, a frequência de anastomoses aumentou, bem como anastomoses em mais de um conídio. Posteriormente, a mesma autora e colaboradores, em 2004, observaram, ao utilizarem coloração fluorescente (DAPI), a passagem de núcleo entre conídios, por meio de anastomoses, entre espécies de *Colletotrichum* (*C. lindemuthianum* x *C. gossypii*) e verificaram a formação de recombinantes, a partir do cruzamento destas espécies, utilizando marcador PCR. Os autores concluíram que a formação de recombinantes ocorreu devido às anastomoses entre os conídios das espécies diferentes de *Colletotrichum*.

Anastomoses entre conídios podem ser uma forma alternativa para a ocorrência de trocas de metabólitos, organelas e material genético. A passagem de organelas como mitocôndrias e vacúolos foi evidenciada. Foram utilizados corantes, microscopia de fluorescência e confocal, mas não foram obtidas imagens com seqüência de eventos; entretanto, a transferência de vacúolos e mitocôndrias de uma célula para outra foi observada e o registro desta passagem foi efetuado. Não foi possível inferir como ocorre o movimento. Estes eventos, embora raros, afetariam o comportamento genético e fisiológico do fungo.

Mesmo que os conídios sejam iguais, do mesmo isolado fúngico, a possibilidade de um incremento de metabólitos poderia conferir vantagem para a sobrevivência e adaptação. A compreensão destes mecanismos contribuirá para o melhor entendimento sobre a variabilidade genética da espécie (Roca et al., 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS).

#### 3.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Os materiais foram provenientes de diferentes localidades de Minas Gerais (MG), um proveniente do estado de Goiás (GO) e um da Costa Rica (Tabela 3).

**TABELA 3** Isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) avaliados no estudo.

Isolado	Raça	Cultivar	Procedência
LV71	65	Pérola do Sul	Monte Carmelo
LV51	73	Carioca	Lavras
LV4	81	RosinhaG2	Viçosa
LV77	89	Carioca	Lavras
LV33	337	Talismã	Viçosa
LV47	593	Pérola	Cristalina – GO
LV76	2047	-----	Costa Rica (EUA)
LV79	-----	-----	DBI/UFLA
LV80	73	-----	DBI/UFLA
LV81	65	OI-NS-331	Ijaci
LV82	81	Valente	DBI/UFLA
LV83	89	Michelite	DBI/UFLA
LV84	2047	Michelite	DBI/UFLA

Os isolados LV4, LV33, LV47, LV51, LV71, LV76 e LV77 são da fase assexual (forma anormórfica ou mitospórica) *C. lindemuthianum* e os isolados LV79, LV80, LV81, LV82, LV83 e LV84 são da fase sexual (forma teleomórfica ou meiospórica) *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

Os isolados de *C. lindemuthianum* foram obtidos por isolamento, segundo Mendes-Costa (1996) e estavam disponíveis na micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA. Os isolados LV81 e LV82 foram obtidos por isolamento a partir de folhas, ramos e ou vagens de cultivares de *Phaseolus vulgaris*, os isolados, LV79 e LV80 estavam disponíveis na micoteca; já LV83 e LV84 foram reisoladas utilizando os seguintes procedimentos: os isolados LV77 e LV76 pertencentes às raças 89 e 2047, respectivamente, foram inoculadas na cultivar Michelite. Ao surgirem lesões nos ramos e folhas desta cultivar, estas foram tratadas para a remoção de propágulos superficialmente aderidos em álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 1% (um minuto). Finalmente, as lesões foram lavadas em água destilada e esterilizada, secas em papel de filtro esterilizado e transferidas para placas de Petri com meio de cultivo M<sub>3</sub> (Junqueira et al., 1984). Após aproximadamente três dias ao invés de crescerem micélios, surgiram peritécios. Os isolados cresceram em BOD (incubadora de crescimento) com controle de temperatura (21°C) e fotoperíodo de 12 horas.

### **3.2 Compatibilidades vegetativa entre os isolados de *C. lindemuthianum* e sexual entre os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli***

Para verificar a compatibilidade vegetativa e sexual entre os isolados de *C. lindemuthianum* e *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, estes foram confrontados dois a dois em todas as combinações possíveis nas placas de Petri com meio M<sub>3</sub> e avaliada a área de encontro entre ambos, após o crescimento (Bryson, 1990; Rodriguez-Guerra et al., 1999). Um setor branco que surgiu na colônia do

isolado LV51 foi confrontado com todos os demais isolados de *C. lindemuthianum* avaliados no estudo (Tabela 3).

### **3.3 Anastomoses entre hifas e conídios**

Para a observação de anastomoses entre conídios dentro de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, inicialmente foram produzidas culturas monospóricas. Estas foram obtidas por meio de uma suspensão de esporos de cada raça, a partir de inóculo do fungo crescido e esporulando em vagem de feijão parcialmente imersa em ágar-água.

As anastomoses foram observadas utilizando lâminas para microculturas de células. As lâminas foram inoculadas com um filme de água e esporos em alta densidade para favorecer o encontro entre eles. Foram utilizadas concentrações de 1.000/5µm de esporos obtidos a partir do fungo crescido e esporulando em vagem por, aproximadamente, quinze dias. As lâminas inoculadas foram monitoradas ao microscópio de contraste de fase Luca DMLS de seis em seis horas até a formação de micélio.

Para se verificar a formação de anastomoses entre hifas foram utilizados quadrados de papel celofane dispostos em placas de petri sobre meio de cultura M<sub>3</sub>, segundo Ishikawa et al. (2003).

Os micélios (hifas) crescidos em membranas de celofane foram corados na própria membrana onde se desenvolveram. A coleta e preparação foram realizadas com, no máximo, sete dias após a inoculação do isolado na placa de petri. Os papéis celofane contendo as hifas fúngicas foram fixados por 24 horas em Carnoy acético, hidrolisados em HCl a 1 N por 10 minutos e corados com Giemsa por aproximadamente sete horas. Foram montadas lâminas semipermanentes para a observação do material corado (Roca et al., 2003).

As imagens foram capturadas com o auxílio do programa Optronics DEI-750 Acquire e ou adquiridas, por meio de câmara fotográfica Olympus PM-Ce5DX.

### 3.4 Avaliação dos caracteres morfológicos

Os seguintes caracteres morfológicos foram avaliados:

**1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM):** inóculos dos isolados de *C. lindemuthianum* foram transferidos para placas contendo, aproximadamente, 20ml de meio M<sub>3</sub>. Foram realizadas medições a cada 24 horas do diâmetro das colônias em posição ortogonal durante doze dias a partir do momento da inoculação. Os isolados de *C. lindemuthianum* foram transferidos para meio M<sub>3</sub> e cresceram sob fotoperíodo de doze horas (BOD) a 21 °C. Foram utilizadas cinco repetições (placas) por isolado. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado utilizando-se a fórmula adaptada de Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum(D - D_a)}{N}$$

**Sendo:**

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial

D=diâmetro médio atual da colônia

Da=diâmetro médio da colônia do dia anterior

N=número de dias após a inoculação

**2 Diâmetro colonial:** o diâmetro das colônias de *C. lindemuthianum* foi medido em centímetros, por um período de 15 dias. Foram avaliadas cinco placas por isolado (cinco repetições).



**3 Avaliação do crescimento micelial:** foi realizada uma análise de regressão para o crescimento das colônias dos isolados de *C. lindemuthianum*.

**4 Avaliação da capacidade de esporulação:** foram obtidas suspensões conidiais, utilizando a mesma quantidade de água por tubo de ensaio (2ml) contendo o fungo esporulando sobre vagem de feijão. Foram preparados quatro tubos por isolado (quatro repetições) avaliado. Posteriormente, procedeu-se a contagem do número de esporos em câmara de Newbauer.

**5 Cor e textura das colônias:** os isolados crescidos em BOD (fotoperíodo 12h) a 21 °C sobre meio M<sub>3</sub> sólido foram observados com sete, quinze e trinta dias de idade. Foram utilizados para comparar com as cores das colônias, o mapa de cores Munsell<sup>®</sup> Soil Color Charts (1979).

**6 Presença de estruturas reprodutivas:** após sete dias de crescimento dos isolados em lâminas de microcultivo, foi observada a presença de estruturas reprodutivas, tais como esporodóquios (acérvulos) e peritécios. Para a observação destas estruturas reprodutivas, foram confeccionadas lâminas de microcultivo (Souza & Torres, 2004), que continham fragmentos circulares de meio de cultura M<sub>3</sub> obtidos com o auxílio de vasadores. Os fragmentos circulares de meio de cultura sobre as lâminas foram cobertos por lamínulas após a transferência de todos os isolados para os mesmos. As lâminas assim confeccionadas foram mantidas no interior de placas de Petri com chumaços de algodão embebidos em água destilada e esterilizada. As placas contendo as lâminas de microcultivo devidamente preparadas foram depositadas em BOD. Após sete dias, as lamínulas colonizadas pelos isolados foram transferidas para outras lâminas que continham, cada uma, uma gota de água destilada e esterilizada e observadas ao microscópio óptico Olympus BX60, com aumentos de 100x e 400x. As melhores imagens foram capturadas por meio do programa Optronics DEI-750 Acquire.

**7 Dimensão dos esporos:** os caracteres avaliadas foram comprimento e largura dos conídios e ascósporos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), a relação comprimento/largura e a forma dos conídios, segundo Feitosa et al. (1977). Estes autores consideram Ccc = cilíndrico muito curto, relação comprimento/largura menor que 2,00; Cc = cilíndrico curto, relação entre 2,00 e 2,50; C = cilíndrico, entre 2,50 e 3,00; f = fusiforme, entre 3,00 e 3,50; ff = fusiforme muito alongado, relação maior que 3,5.

### 3.5 Avaliações citológicas

Os esporos foram obtidos de culturas monospóricas desenvolvidas em meio  $M_3$ . Posteriormente, os mesmos isolados foram transferidos para tubos de ensaio que continham vagem de feijão fixadas em ágar-água, e após esporulação, foram realizadas as suspensões dos esporos em água destilada e esterilizada para posterior preparo das lâminas. Os conídios e os ascósporos foram medidos por meio de uma ocular OSM, acoplada ao microscópio de contraste de fase Luca DMLS na objetiva de 40x. Para isso foram escolhidos 30 conídios e ascósporos aleatoriamente em três lâminas diferentes.

### 3.6 Análises estatísticas

A avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro colonial, capacidade de esporulação, comprimento e largura dos conídios e ascósporos foram realizadas de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij},$$

em que:

$Y_{ij}$ : observação referente ao isolado  $i$  na repetição  $j$ ;

$\mu$ : média geral;

$t_i$ : efeito do isolado  $i$ ;

$e_{ij}$  : erro associado à repetição  $j$  do isolado  $i$ .

A avaliação do crescimento micelial dos sete isolados de *C. lindemuthianum* foi realizada utilizando-se o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + e_{i(j)} + d_k + td_{ik} + \epsilon_{ijk},$$

em que:

$Y_{ijk}$  : observação do dia  $k$  dentro da repetição  $j$  do isolado  $i$ ;

$\mu$  : média geral;

$t_i$  : efeito do isolado  $i$ ; em que  $i = 1, \dots, 7$ ;

$e_{i(j)}$  : erro associado à repetição  $j$  do isolado  $i$ , em que  $j = 1, \dots, 5$ ;

$d_k$  : efeito do dia  $k$ , em que  $k = 1, \dots, 15$ ;

$td_{ik}$  : efeito da interação isolados por dias;

$\epsilon_{ijk}$  : erro associado à observação  $Y_{ijk}$ .

Os dados obtidos foram analisados segundo a metodologia convencional da análise de variância utilizando o programa SISVAR. A comparação entre as médias foi feita utilizando-se o teste de significância Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

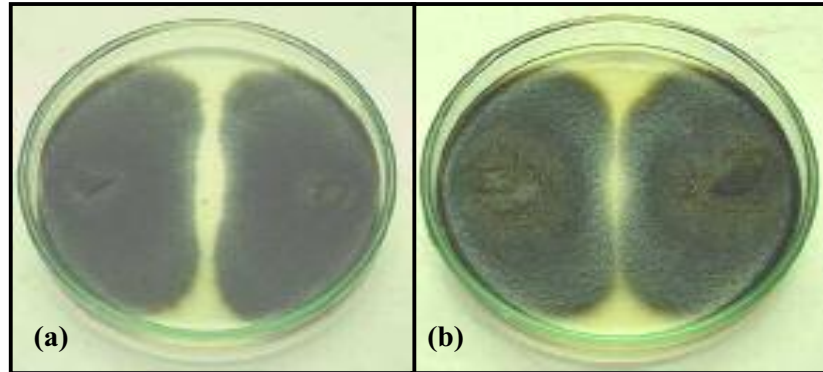
Foi realizada uma análise de regressão para o crescimento colonial dos isolados de *C. lindemuthianum* por meio da avaliação do diâmetro colonial, em função do tempo em dias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

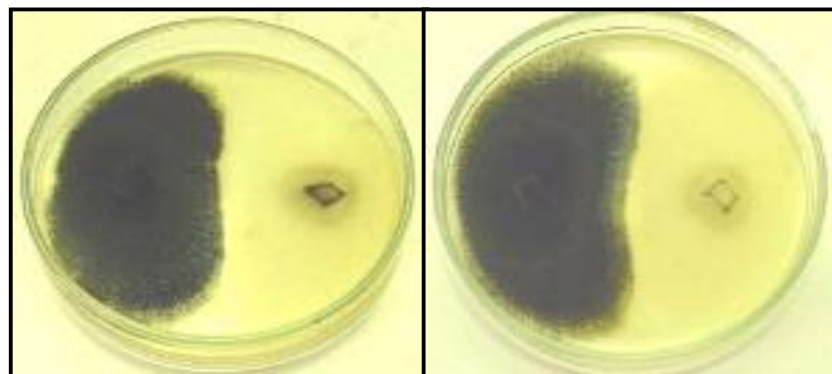
### 4.1 Compatibilidade vegetativa entre os isolados de *C. lindemuthianum*

Os isolados de *C. lindemuthianum* (Tabela 3), confrontados dois a dois, apresentaram-se incompatíveis, (Figura 1) confirmando os resultados obtidos por Roca et al. (2003). Estes autores confrontaram isolados de *C. lindemuthianum* denominados 1010, 531, 1013, 1003, 1007, 1002 e verificaram que houve incompatibilidade vegetativa por meio do crescimento helicoidal destes isolados. Tem sido relatado, na literatura, que isolados de *C. lindemuthianum* oriundos do México foram confrontados dois a dois. Destes, um pequeno número produziu peritécios na linha de confronto. Muitos isolados confrontados produziram estruturas arredondadas estéreis denominadas prototécios (Rodriguez-Guerra et al., 1999).

A colônia de *C. lindemuthianum* clara oriunda do setor que surgiu no isolado de colônia escura da raça 73, também não foi compatível com os demais isolados de *C. lindemuthianum* utilizados no estudo (Figura 2). Relatos na literatura citam que, normalmente, cruzamentos compatíveis envolvem isolados de colônias claras com isolados de colônias escuras (Lucas, 1946; Wheller, 1952).



**FIGURA 1** Incompatibilidade vegetativa entre isolados de *C. lindemuthianum*; (a) confronto entre colônias da raça 2047 e (b) confronto entre colônias das raças 65 e 2047.



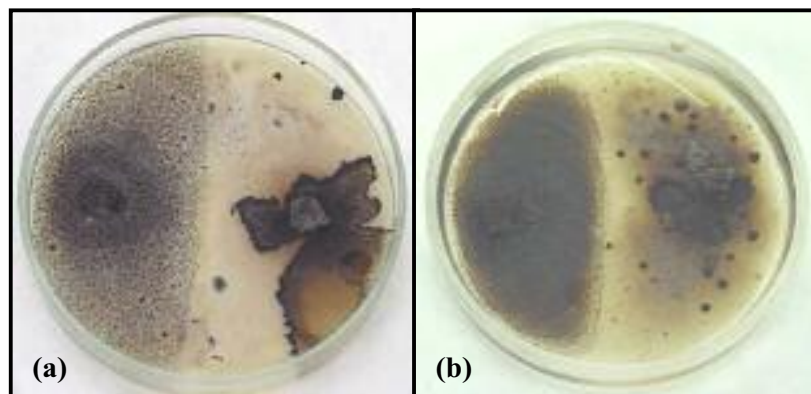
**FIGURA 2** Incompatibilidade vegetativa entre o isolado branco da raça 73 (LV51) com os outros isolados de *C. lindemuthianum*.

#### 4.2 Compatibilidade sexual entre os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*

Não foi observada a compatibilidade sexual entre os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (Figuras 3) nos cruzamentos realizados. No entanto, linhas de confronto foram formadas no limite entre setores que surgiram nos isolados subculturados (Figura 4).

Deve ser salientado que a incompatibilidade sexual entre os isolados pode ter ocorrido devido à pequena amostra de isolados avaliada ou às condições inadequadas de cultivo.

É importante comentar que considera-se haver compatibilidade sexual entre isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* quando estes, ao serem confrontados, produzem peritécios férteis na linha de confronto e considera-se compatibilidade vegetativa, quando os isolados de *C. lindemuthianum* confrontados, após o encontro das hifas, também produzirem peritécios férteis na linha de confronto. Os ascos e ascósporos no interior dos peritécios produzidos devem apresentar morfologia semelhante à descrita por Shear & Wood (1913); Lucas, (1946); Kimati & Galli (1970); Bryson (1992).



**FIGURA 3** Incompatibilidade sexual entre isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*; (a) LV79 confrontado com LV84 e (b) LV80 com LV83.



**FIGURA 4** Linhas de confronto (setas) no limite de setores no isolado LV79 de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

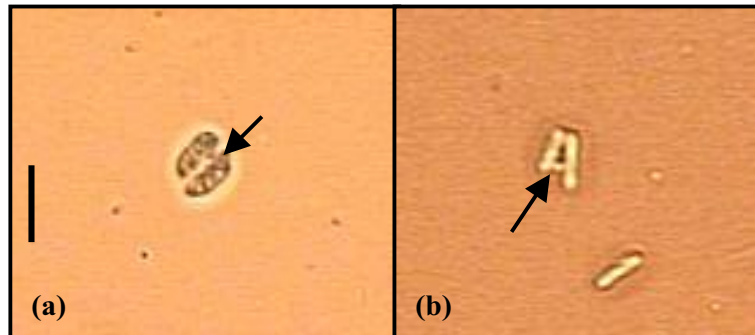
#### **4.3 Anastomoses entre hifas e conídios**

Todos os isolados estudados apresentaram anastomoses entre hifas e apenas os isolados LV51 e LV77 (Figura 5) entre conídios. No entanto, Roca et al. (2003) verificaram que todos os isolados de *C. lindemuthianum* utilizados em seu estudo formaram anastomoses entre conídios em qualquer época de avaliação (7 a 40 dias).

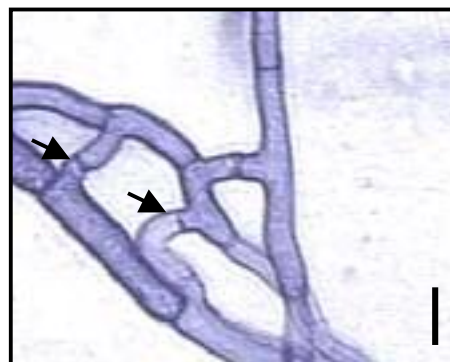
As anastomoses entre hifas apresentaram septos em todos os isolados deste estudo (Figura 6) e foi observada a passagem de núcleo em anastomoses entre hifas dos isolados LV4 e LV76 (Figura 7). Septos em anastomoses entre conídios foram encontrados na avaliação dos isolados de *C. lindemuthianum* utilizados por Roca et al. (2003) e a passagem de núcleo devido à anastomose entre hifas em isolado da raça 81 foi evidenciada por Ishikawa et al. (2003).

A formação de anastomoses entre conídios e entre hifas com passagem de núcleo é um indicativo da ocorrência de transferência horizontal (Van Diepeningen, 1999). No entanto, não foi possível distinguir os conídios de

isolados diferentes, o que permitiria identificar a formação de anastomoses entre conídios de diferentes raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*.

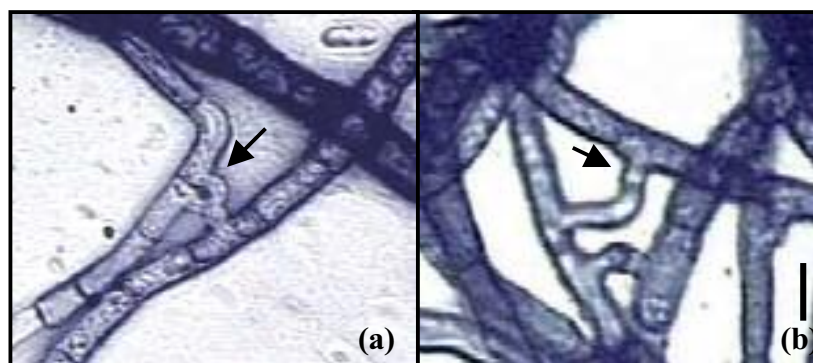


**FIGURA 5** Anastomoses (setas) entre conídios dos isolados das raças 73(a) e 89(b) de *C. lindemuthianum*. 100x. Barra: 50 $\mu$ m.



**FIGURA 6** Septos (Setas) em anastomoses entre hifas de *C. lindemuthianum*. 400x. Barra: 10 $\mu$ m.





**FIGURA 7** Passagem de núcleo (setas) entre hifas dos isolados das raças 81 (a) e 2047 (b) de *C. lindemuthianum*. 400x. Barra: 10 $\mu$ m.

#### **4.4 Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e capacidade de esporulação dos isolados de *C. lindemuthianum***

Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), apenas os isolados LV77 e LV76 diferiram estatisticamente dos demais pelo teste de Scott-Knott (Tabela 4). O isolado LV47 apresentou a menor média, sendo considerado o de crescimento mais lento e LV76 a maior média, sendo considerado de crescimento rápido (Tabela 4). Estudos anteriores obtidos por Feitosa et al. (1977); Nechet (1999) e Dias (2002) caracterizando colônias de *Colletotrichum* spp., relataram que diferentes isolados também apresentaram diferença significativa na velocidade de crescimento micelial em meio de cultura, classificando-os como de crescimentos lento e rápido.

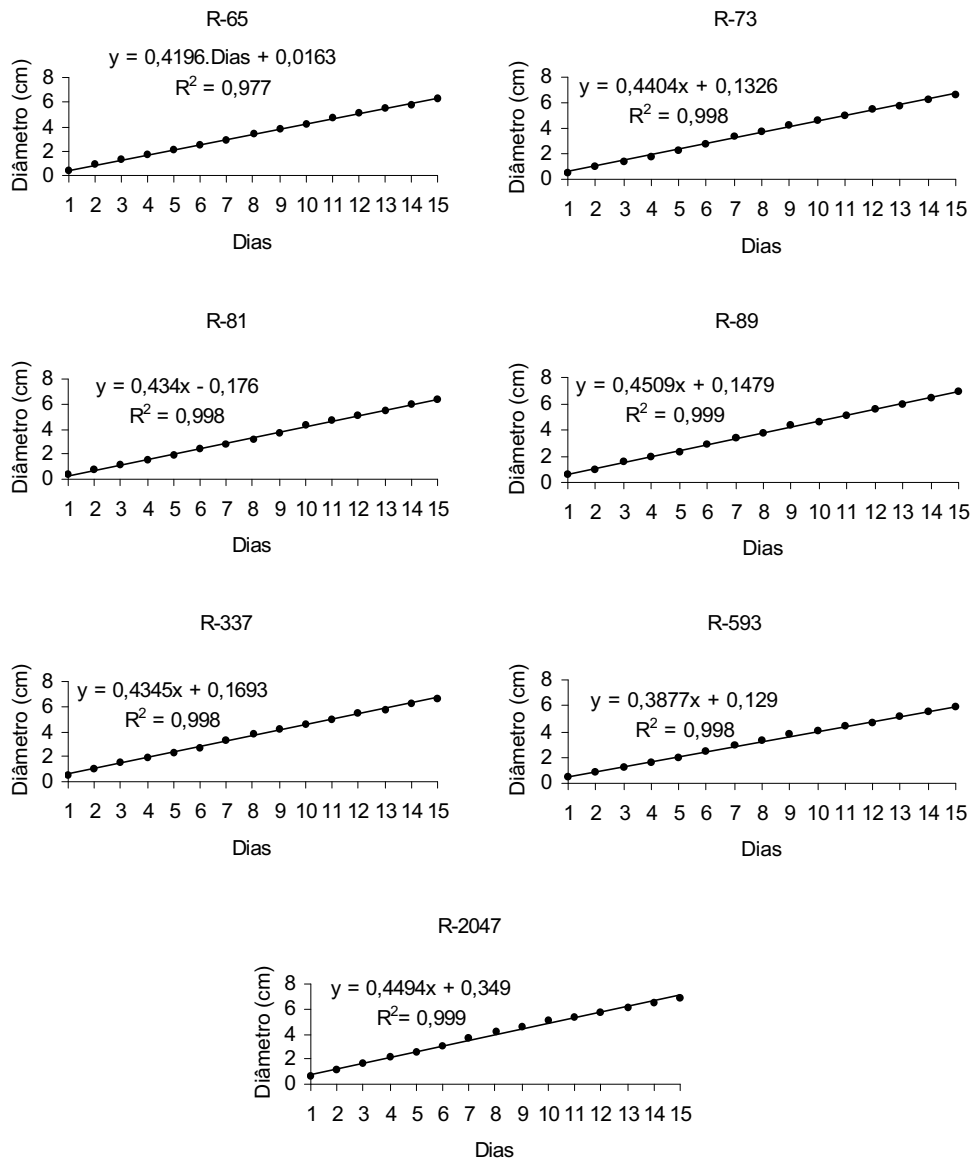
Os isolados avaliados apresentaram crescimento linear (Figura 8) nos doze dias de medição do diâmetro colonial, não diferindo estatisticamente até o terceiro dia de desenvolvimento. A partir de então, as diferenças tornaram-se significativas entre os isolados estudados (Tabela 2A). O isolado da raça 2047 se destacou das demais pelo seu acentuado crescimento micelial (Figura 8).

Em relação à capacidade de esporulação em meio de cultura de vagem, os isolados apresentaram variação. O isolado LV47 apresentou esporulação superior em relação aos demais, destacando-se em relação ao número médio de esporos dos outros isolados (Tabela 4).

**Tabela 4** Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) e capacidade de esporulação ( $10^6$ ) dos isolados de *C. lindemuthianum*.

<b>Isolado</b>	<b>IVCM</b>	<b>Esporulação</b>
<b>LV71</b>	0,90b	15,58c
<b>LV51</b>	1,03b	5,52d
<b>LV4</b>	0,93b	15,49c
<b>LV77</b>	1,07a	21,96b
<b>LV33</b>	0,98b	24,10b
<b>LV47</b>	0,88b	50,92a
<b>LV76</b>	1,11a	7,44d

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.



**FIGURA 8** Equação de regressão para o crescimento micelial de isolados de *C. lindemuthianum*.

#### 4.5 Caracteres culturais e reprodutivos dos isolados

Os isolados apresentaram alta variabilidade quanto à coloração da colônia. De forma geral, os isolados se reproduziram assexuadamente (*C. lindemuthianum*) por meio de conídios produzidos em esporodóquios (acérvulos) com a presença de setas (Figura 9). O isolado LV76 foi o único que não apresentou corpo de frutificação do tipo esporodóquio.

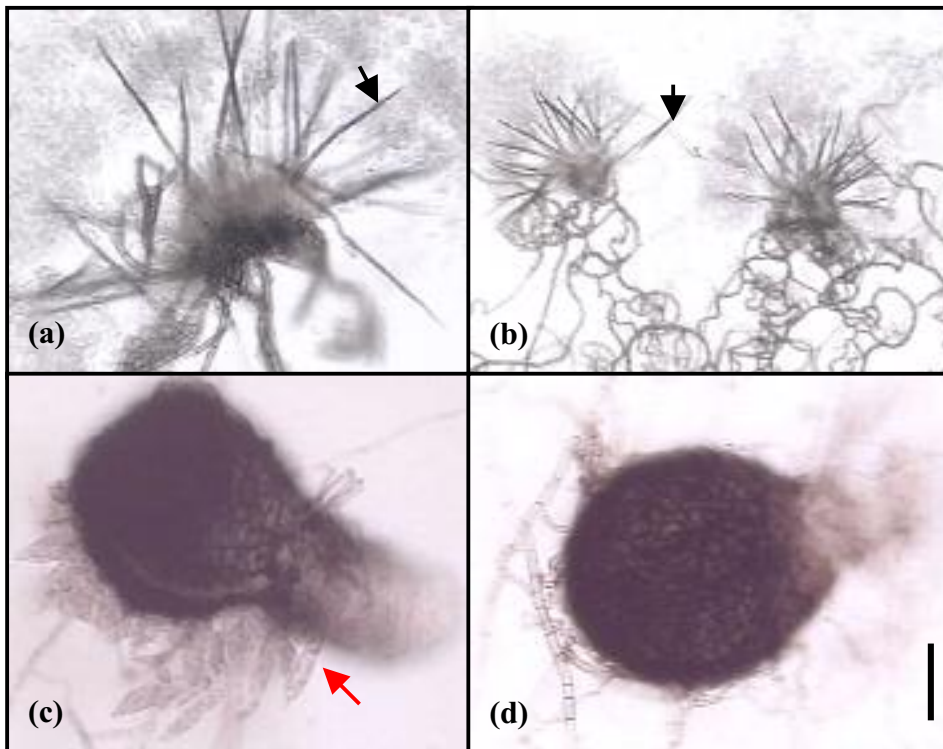
Todas as colônias de *C. lindemuthianum* apresentaram a coloração de branco a cinza-claro (Figura 10) e, com o passar do tempo de cultivo, desde cinza-escuro a negra (Figura 11) com superfícies delicadamente aveludadas. Dentre as colônias fúngicas avaliadas, os isolados LV51 e LV33 formaram setores mais claros e de superfícies aveludadas, (Figura 12) enquanto que os isolados LV76 e LV77 foram as mais estáveis e as únicas que produziram a forma teleomórfica *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, produzindo peritécios arredondados (Figura 9) inicialmente em aglomerados (Figura 13). É válido comentar que Edgerton (1912; 1914) foi o primeiro a descrever características das colônias de *G. cingulata* de acordo com a distribuição de peritécios sobre meio de cultura. Este autor observou colônias com peritécios em aglomerados e as denominou de ‘‘plus’’ e colônias com peritécios dispersos denominando-as de ‘‘minus’’. Já, Roca et al. (2003) comentaram que os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* avaliados (1010, 531, 1013) formam peritécios de dois tipos: os que crescem isolados e grandes e os que são pequenos formando massas negras.

Lucas et al. (1944); Chilton et al. (1945) e Wheeler et al. (1948) realizaram cruzamentos entre as linhagens ‘‘plus’’ e ‘‘minus’’ de Edgerton e obtiveram vários tipos de segregantes para fertilidade da colônia, produção, cor e tamanho dos ascósporos, além de distribuição dos peritécios sobre o meio de cultura utilizado e Chilton & Wheller (1949) estudaram o efeito da idade da cultura de *G. cingulata* na ocorrência da variante morfológica ‘‘minus’’. Os

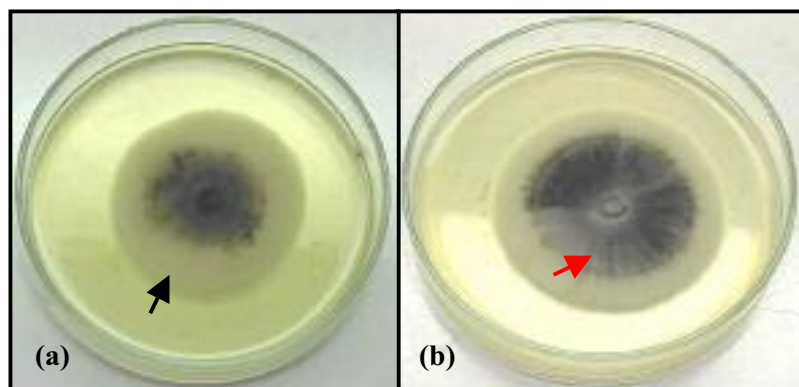
autores observaram que, com o tempo de cultivo, aumenta o número de linhagens ‘minus’ obtidas, mesmo se realizadas monoascospóricas.

Davis et al. (1992) encontraram variação para a coloração da colônia de hialina a negra em isolados de *C. gloesporioides* oriundos da América Latina e da África, estes isolados se reproduziram por meio de conídios produzidos em acérvulos. Alguns acérvulos apresentaram setas, outros eram desprovidos deste tipo de hifa.

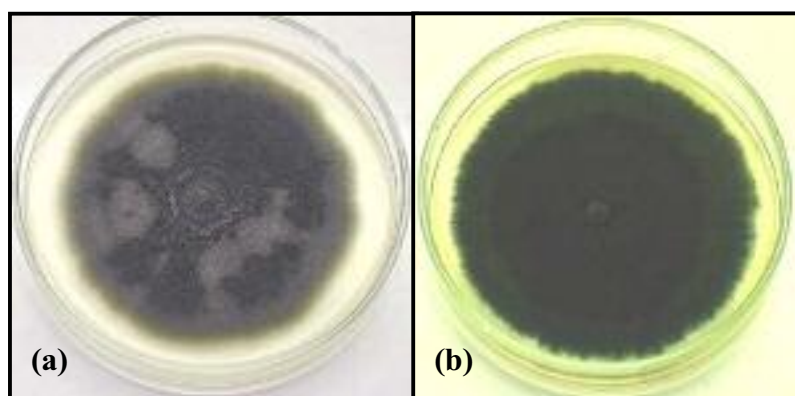
As características avaliadas confirmam que os isolados pertencem à espécie *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*) segundo Sutton (1980). É importante comentar que existe uma grande variabilidade morfológica e cultural nos caracteres avaliados, ressaltando ainda mais a possibilidade da existência de mecanismos, além dos mais conhecidos, que ampliam a variabilidade genética nesta espécie.



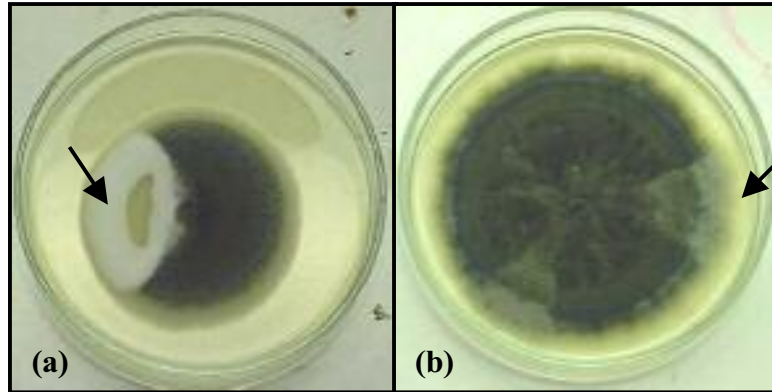
**FIGURA 9** Estruturas reprodutivas de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*), esporodóquios (acérvulos) com a presença de setas (setas pretas) (a), 400x e (b), 100x; peritécio com a liberação de ascos e ascósporos (seta vermelha) (c), 400x; peritécio estourado(d), 400x. Barra: 40 $\mu$ m no aumento de 100x e 10 $\mu$ m no aumento de 400x.



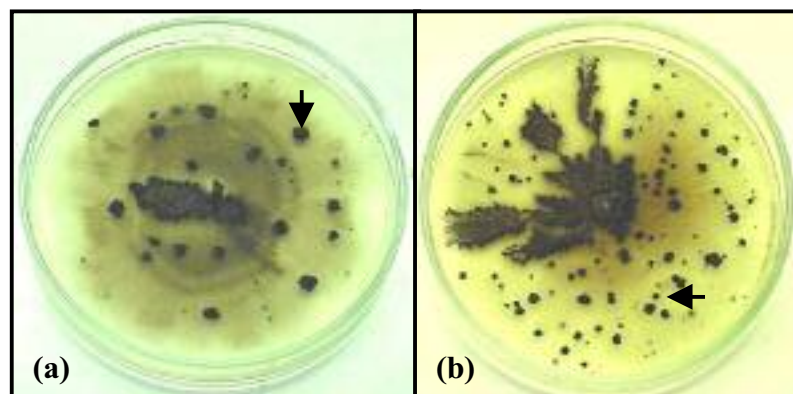
**FIGURA 10** Colônias de *C. lindemuthianum* aos sete dias de idade com coloração de hialina (seta preta) a cinza-claro (seta vermelha); (a) LV47 e (b) LV71.



**FIGURA 11** Colônias de *C. lindemuthianum* aos trinta dias de idade com coloração de cinza-escuro (a) a negra (b); (a) LV33 e (b) LV76.



**FIGURA 12** Colônias dos isolados da raças 73(a) e 337(b) de *C. lindemuthianum*, que formaram setores mais claros e de superfícies aveludadas (setas).



**FIGURA 13** Colônias de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* produzindo peritécios em aglomerados(setas), LV83(a) e LV84(b).



#### 4.6 Dimensões dos conídios

Houve uma grande variação na relação comprimento/largura, uma vez que os isolados apresentaram uma média semelhante em relação ao tamanho dos conídios (Tabela 6). O maior comprimento conidial foi verificado no isolado da LV71 (18,88 $\mu$ m) e os menores nos isolados LV33 e LV47 (12,72  $\mu$ m). Em relação à largura, os isolados LV77, LV33, LV47, LV76 foram semelhantes (Tabela 5). O isolado LV51 apresentou os conídios mais largos (7,92  $\mu$ m) e o isolado LV4 os mais estreitos (3,12  $\mu$ m).

**TABELA 5** Dimensões ( $\mu$ m) e forma dos conídios dos isolados de *C. lindemuthianum*.

Isolado	Dimensões dos conídios		Relação Comp./larg.	Forma
	Comprimento	Largura		
LV71	13,44-18,88	5,28-7,08	2,66	*C
LV51	12,48-17,52	4,80-7,92	2,45	*Cc
LV4	13,02-17,52	3,12-7,20	3,45	*F
LV77	13,92-17,76	3,36-6,24	3,36	*F
LV33	12,72-17,04	3,36-5,76	3,30	*F
LV47	12,72-16,32	3,36-5,16	3,46	*F
LV76	13,80-17,28	3,36-5,76	3,33	*F

\*C = cilíndrico; \*Cc = cilíndrico curto; \*F = fusiforme.

O tamanho médio dos conídios de *C. lindemuthianum* foi próximo do descrito por Roca et al. (2003); eles apresentaram 12,96 µm de comprimento e 5,25 µm de largura e mais próximos dos descritos por Rava & Sartorato (1944). Estes autores delimitaram, na sua revisão, valores de 13-22 x 4,4-5,3 µm relativos a esta espécie. No entanto, estes valores foram superiores aos citados por Sutton (1992), que descreveu, para *C. lindemuthianum*, 9,5-11,5 x 3,5-4,5 µm.

Os valores encontrados para o comprimento dos conídios foram superiores ao valor médio descrito por Ishikawa et al. (2003), para a raça 65, (14,27 µm) e próximos aos descritos para as raças 81 e 89 com relação ao comprimento médio, que foi de 16,68 µm e 16,28 µm, respectivamente. Com relação à largura média, Ishikawa et al. (2003) não verificaram diferença significativa entre os isolados de *C. lindemuthianum* das raças 65, 81 e 89, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho para as raças 81 e 89 de *C. lindemuthianum*.

Feitosa et al. (1977) observaram variações no tamanho médio dos conídios de *C. gloesporioides*. Esta variação foi de 10,53 a 20,20 µm de comprimento por 4,08 a 7,41 µm de largura. A relação comprimento/largura variou de 1,71 a 3,88 µm.

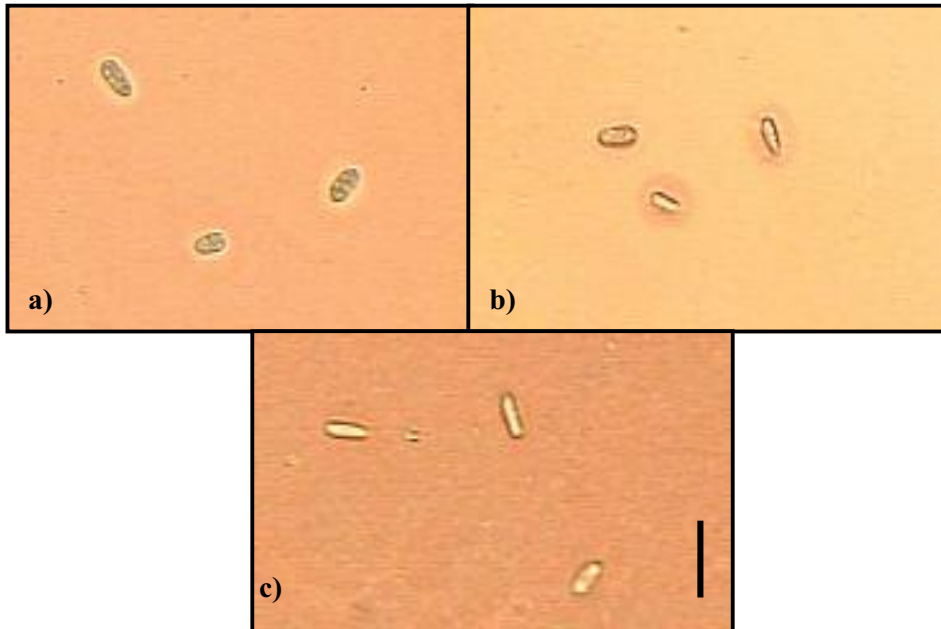
Apenas os isolados LV71 e LV51 apresentaram a forma dos conídios diferente da forma dos demais isolados avaliados (Tabela 5). Os conídios de acordo com a relação comprimento/largura foram cilíndricos (Figura 14a), cilíndricos curtos (Figura 14b) e fusiformes (Figura 14c) com as extremidades arredondadas corroborando com Sutton (1992), este autor observou que os conídios de *C. lindemuthianum* apresentavam as extremidades arredondadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Dias (2002), que obteve uma variação média de 9,8-12,25 µm de comprimento por 4,8 µm de largura. A relação

comprimento e largura variou de 2,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ . As formas dos conídios, de acordo com esta relação, foram classificadas como cilíndricos e fusiformes.

**TABELA 6 Médias do comprimento e largura ( $\mu\text{m}$ ) dos conídios das sete raças de *C. lindemuthianum*.**

<b>Isolados</b>	<b>Comprimento</b>	<b>Largura</b>
<b>LV71</b>	16,32a	6,12b
<b>LV51</b>	15,86a	6,48a
<b>LV4</b>	16,16a	4,68d
<b>LV77</b>	15,74a	4,70d
<b>LV33</b>	15,10b	4,57c
<b>LV47</b>	14,34c	4,14e
<b>LV76</b>	15,41a	4,64d

Médias seguidas da mesma letra não diferem, pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.



**FIGURA 14** Formas dos conídios de *C. lindemuthianum*; a) cilíndricos (LV71), b) cilíndricos curtos (LV51), c) fusiformes (LV77). 100x. Barra: 50 $\mu$ m.

#### 4.7 Dimensões dos ascósporos

Houve uma grande variação nas médias em relação ao tamanho dos ascósporos. A maior média do comprimento dos ascósporos foi verificada no isolado LV80 e a menor no isolado LV79 (Tabela 7). Em relação à largura, os isolados LV80, LV81 e LV84 apresentaram as maiores estimativas e LV81 e LV84 não diferiram estatisticamente (Tabela 7), de acordo com Ishikawa et al. (2003) que encontraram valores de 6,57  $\mu$ m e 6,64  $\mu$ m para as raças 65 e 2047, respectivamente. Segundo estes autores, os isolados LV79, LV82 (Figura 15) e LV83 diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott. Vale ressaltar que o isolado LV80 apresentou os ascósporos maiores, tanto em comprimento quanto

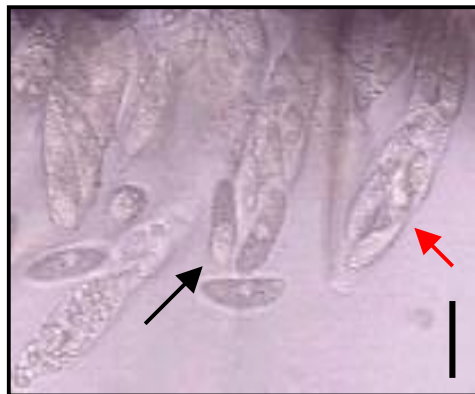
em largura (38,85 x 10,40  $\mu\text{m}$ ). Ao contrário dos isolados LV79 (21,70  $\mu\text{m}$  de comprimento) e LV81 (6,73  $\mu\text{m}$  de largura), que apresentaram os menores ascósporos.

Roca et al. (2003), avaliando as médias do comprimento e largura de três isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (1010, 531, 1013), verificaram que o isolado 531, que pertence à raça 73, apresentou as maiores dimensões (21,32 x 7,17  $\mu\text{m}$ ) e o isolado 1013 (raça 1) as menores (18,26 x 4,94  $\mu\text{m}$ ).

**TABELA 7 Médias do comprimento e largura dos ascósporos dos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.**

<b>Isolados</b>	<b>Comprimento</b>	<b>Largura</b>
<b>LV79</b>	21,70e	9,00c
<b>LV80</b>	38,85a	10,40a
<b>LV81</b>	23,68d	9,90b
<b>LV82</b>	24,43d	6,73e
<b>LV83</b>	25,90c	8,03d
<b>LV84</b>	35,01b	9,96b

Médias seguidas da mesma letra não diferem, pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.



**FIGURA 15** Ascospores (seta vermelha) liberando ascósporos (seta preta) no isolado LV82 de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. 400x. Barra: 10µm.

Estudos de avaliação do comprimento e largura em *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) podem ser de extrema importância, pois isolados que são bem contrastantes em relação ao tamanho e forma dos conídios ou ascósporos podem ser muito úteis em análises genéticas. Por exemplo, a demonstração da ocorrência de anastomoses entre conídios de raças diferentes poderia ser possível, utilizando-se isolados de diferentes raças que apresentem dimensões contrastantes quanto ao comprimento e largura dos conídios. Estas características poderiam ser importantes marcadores morfológicos.

## 5 CONCLUSÕES

Os isolados de *C. lindemuthianum* (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) apresentaram ampla variabilidade genética para todos os caracteres avaliados.

A forma do conídio de *C. lindemuthianum* pode ser usada como marcador morfológico em estudos genéticos de raças contrastantes para este caráter.

Todos os isolados de *C. lindemuthianum* avaliados se comportaram de forma semelhante em relação ao crescimento micelial; apenas o isolado LV76 destacou-se dos demais.

Os isolados de *C. lindemuthianum* LV83 e LV84 apresentaram desenvolvimento espontâneo, tanto na forma mitospórica (*C. lindemuthianum*) quanto na forma meiospórica (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOUPoulos, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory mycology**. 3. ed. New York: John Willy, 1979.
- ALEXOUPoulos, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Willy, 1996.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos** Goiânia: UFG, 1998. p. 490.
- AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S. O. P. (Ed.). **Genética molecular e de microrganismos** São Paulo: Manole, 1987. p. 393-407.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. International/British Society for Plant Pathology, 1992. 388 p.
- BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1184-1191, Dec. 1997.
- BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Interacion between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American society for Horticultural Science** Alexandria, v. 123, n. 6, p. 1038-1047, Nov. 1998.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to antracnose. **Phytopathology**, St. Paul, v. 1, p. 190-195, 1911.
- BATISTA, U. G.; CHAVES, G. M. Patogenicidade de culturas monoasporicas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7 n. 2, p. 285-293, jun. 1982.
- BOS, C. J. **Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi**. 1985. Teses (Ph.D) - Wageningen Agricultural University, Wageningen.



BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. Thesis (Ph.D) - University of Birmingham.

BRYSON, R. J.; CATEN, C. E.; HOLLOMON, D.W.; BAILEY, J. A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum* In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C. A. B. International, 1992.

CAMARGO Jr., O. A. **Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H.F.; GALVEZ, G.E. (eds.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980, p. 37-53

CHILTON, S. P. P.; LUCAS, G. B.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella* III Crosses with conidial strains. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 32, n. 9, p. 549-554, Sept. 1945.

CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VI. Linkage. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, n. 3, p. 270-273, Mar. 1949a.

CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VII. Mutation and segregation in Plus cultures. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, n. 10, p. 717-721, Oct. 1949b.

DAVIS, R. D.; BOLAND, R. M.; HOWITTS, C. J. Colony descriptions, conidium morphology, and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Stylosanthes* spp. growing in several countries. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 2, p. 128-134, Feb. 1992.

DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, Bioquímica e Patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. Em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

EDGERTON, C. W. Plus and minus in an Ascomycete. **Science**, Washington, v. 35, p. 151, 1912.

EDGERTON, C. W. Plus and minus in the genus *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus v. 1, p. 244-254, 1914.

FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, L. R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, jan./jun. 1977.

GONZALÉZ, M.; RODRIGUES, R.; ZAVALA, M. E.; JACOBI, J. L.; HERNANDEZ, F.; MARTINEZ, O.; SIMPSON, J. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular marks. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 292-299, Apr. 1998.

GRIFFITHS, A. J. F. Natural plasmids of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 4, p. 673-685, 1995.

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

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.; SOUZA, E. A. Caracterização dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (fase assexual) e *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (fase sexual), agente causal da antracnose no feijoeiro. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA – CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2004. n. 27.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. C. Polimorfismo cromossômico do *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal da antracnose do feijoeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 2003. n. 1104.

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

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Scherenk. f. sp. *phaseoli*, fase ascógena do agente causal da antracnose no feijoeiro. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v. 27, p. 411-437, 1970.

KUES, U.; CASSELTON, A. Fungal mating type genes – regulators of sexual development. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 9, p. 993-1006, Sept. 1996.

LUCAS, G. B. Genetics of *Glomerella* IV. Nuclear phenomena in the ascus. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 33, n. 10, p. 802-806, Oct. 1946.

LUCAS, G. B.; CHILTON, S.J.P.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella* I. Studies on the behavior of certain strains. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 31, n. 3, p. 283-289, Mar. 1944.

MACGAHEN, J. W.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. IX. Peritecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, n. 8, p. 610-617, Aug. 1951.

MAHE, A.; GRIVARD, J.; DRON, M. Two avirulent races of *Colletotrichum lindemuthianum trigger* different time courses of plant defense reactions in beans. **Molecular-Plant Microbe Interactions** St. Paul, v. 6, n. 4, p. 423-428, July/Aug. 1993.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 253-263, Mar. 2004.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; WANG, T. C. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 4, p. 361-366, Apr. 1995.

MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata* f. *Sp. phaseoli* 1. Sexual compatibility. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 230, p. 350, 1996.

MENDES-COSTA, M. C.; DAVID, L. C.; ROCA, M. M. G. Cytology of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 22, n. 2, p. 250-253, abr./jun. 1998.

MOLANO, P. J. T. et al. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*, el patógeno de la antracnosis del frijol, en Antioquia. **Fitopatología Colombiana**, Santa Fé de Bogotá, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1995.

MOULD, M. J.; BOLAND, G. J.; ROBB, J. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii*-*Medicago sativa* pathosistem. I. Pré-penetration events. **Physiological and Molecular Plant Pathology** London, v. 38, n. 3, p. 179-194, Mar. 1991.

MUNSELL® **SOIL COLOR CHARTS**. Baltimore, Munsell Color Macbeth Division of Kollmorgen Corporation, 1979.

NECHET, K. L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 p Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, E. A. et al. **Variação em patogenicidade do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. no Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Pelotas: IPEAS, 1973. 5 p. (Comunicado técnico).

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PASTOR-CORRALES, M. A. Variacion de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y un propuesta para su estandarización. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **La antracnosis del frijol comum, *Phaseolus vulgaris*, en America Latina**. Cali, 1992. p. 212-239. (Documento de trabajo, 113).

PERFECT, S. E.; HUGGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July/Aug. 1999.

RAVA, C.A.; MOLINA, J.; KAUFMANN, M; Determinacion de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 388-391, Set. 1993.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, Jun. 1994.

RAVA, A. C.; SARTORATO, A. Antracnose. In: RAVA, A. C.; SARTORATO, A. (Ed). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle** Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 17-40.

ROCA, M. M. G. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 367-373, jul./ago. 2003.

ROCA, M. M. G.; ONGARELLI, M. D.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M.C. Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 223-225, July/Sept. 2000.

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

ROCA, M. G.; DAVIDE, C. L.; MENDES-COSTA, M.C.; WHEALS, A. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 138-145, Nov. 2003.

RODRIGUEZ-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M. T.; SIMPOSON, J. Towards an understanding of the mechanism which generate variability in *Colletotrichum lindemuthianum*. In: FUNGAL GENETICS CONFERENCE, 21., 1999, California. **Abstracts...** California, 1999. p. 49.

SARTORATO, A. Determinação da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa, UFV: 2002. p. 114-116.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: embrapa-SPI, 1994. 300 p. (Embrapa CNPAF. Documentos, 50).

SHEAR, C. L.; WOOD, A. K. **Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella***. U. S. D. A. Bureau of Plant Industry, 1913. 110 p. (Bulletin, n. 252).

SILVA, K. J. D. **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.

SOMAVILLA, L.; PRESTES, A. M. Identificação de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 416-421, set. 1999.

SOUZA, B. O.; TORRES, I. B. B. Micota do folheto de *Ziziphus joazeiro* Mart. do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55.; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS DE MG, BA E ES, 26., 2004, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004.

SUTTON, B. C. **Coelomycetes**. Surrey: CMI Kew, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anomorph *Colletotrichum*. In BAYLEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, 1992. p. 1-26.

TABER, W. A.; TABER R. A. The Ascomycetes. In: LASKIN, A. I.; LECHEALIER, H. A. (Ed.) **Handbook of microbiology**. Cleveland: CRC, 1974. 328 p.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; FERNANDES, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D.; OLIVEIRA, F.A. Divergência genética entre e dentro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, 2004a. No prelo.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; CARRIGO, F. R. F.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijão comum. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 371-375, abr./jun. 2004b.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; BARELLI, M. A. A.; SILVÉRIO, L. Divergência genética entre e dentro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, determinada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2002. p. 130-132.

UECKER, F. A. Ontogeny of ascoma of *Glomerella cingulata*. **Mycologia**. New York, v. 86, n. 1, p. 82-88, Jan. 1994.

VAN DIEPENINGEN, A. D. **Horizontal transfer of genetic elements in the black *Aspergilli***. 1999. Thesis (PhD) - Universiteit Wageningen, Wageningen.

VON ARX, J. A. Die Arten der Gattung *Colletotrichum*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 29, p. 413-468, 1957.

VON ARX, J. A.; MULLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. **Beitrage Kryptogamenflora der Schweiz**, Bern, v. 11, n. 1, p. 1-434, 1954.

WALKER, J.; NIKANDROW, A.; MILLAR, G. D. Species de *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 10, p. 1175-1193, Oct. 1991.

WHEELER, H. E. Genetics and evolution of heterothalms in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 44, n. 7, p. 342-345, July 1954.

WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VIII. A genetics bases of the occurrence of Minus mutants. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 37, n. 4, p. 304-312, Apr. 1950.

WHEELER, H. E. Linkage Groups in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 43, n. 1, p. 1-6, Jan. 1956.

WHEELER, H. E.; DRIVER, C. H. Genetics and cytology of a mutant, dwarf-spored *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 40, n. 9, p. 694-702, Sept. 1953.

WHEELER, H. E.; MCGAHEN, J. W. Genetics of *Glomerella*. X. Genes affecting sexual reproduction. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 39, n. 2, p. 110-119, Feb. 1952.

WHEELER, H. E.; OLIVE, L. S.; ERNEST, C. T.; EDGERTON, C. N. Genetics of *Glomerella* V. Crozier and ascus development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, p. 722-728, 1948.

YERKES, W.D. Jr.; ORTIZ, M.T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in México. **Phytopathology**, St. Paul, v.46, p.564-567, 1956.

## ANEXOS

	<b>Página</b>
TABELA 1A Resumo da ANAVA dos caracteres morfológicos de <i>C. lindemuthianum</i> .....	55

TABELA 2A Efeitos da interação tratamento (isolados) por dias das raças de <i>C. lindemuthianum</i> .....	55
---	----



**TABELA 1A** Resumo da ANAVA dos caracteres morfológicos de *C. lindemuthianum*.

Fontes de variação	QM	Fc (Pr>Fc)
Comprimento dos conídios	12,6376	8,690*
Largura dos conídios	23,7599	56,868**
Comprimento dos ascosp.	1442.2933	168,401**
Largura dos ascosp.	58,4602	32,684**
IVCM	0,0260	2,723*
Capacidade de esporulação	8,8484	4,210*
Diâmetro das colônias	4,9275	6,030*

\*significativo; \*\*altamente significativo

**TABELA 2A** Efeitos da interação tratamento (isolados) por dias das raças de *C. lindemuthianum*.

Efeitos	Dias	Fc	Pr > F
Trat*dias	1	0,35	0,9041 N.S.
Trat*dias	2	1,09	0,3815 N.S.
Trat*dias	3	2,28	0,0535 N.S.
Trat*dias	4	2,93	0,0172*
Trat*dias	5	3,64	0,0052*
Trat*dias	6	4,40	0,0015*
Trat*dias	7	6,71	<.0001*
Trat*dias	8	8,55	<.0001*
Trat*dias	9	7,70	<.0001*
Trat*dias	10	6,49	<.0001*
Trat*dias	11	6,33	<.0001*
Trat*dias	12	7,04	<.0001*
Trat*dias	13	6,66	<.0001*
Trat*dias	14	8,29	<.0001*
Trat*dias	15	9,22	<.0001*

N.S. não significativo; \*significativo.