

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS
DA RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum*
POR MEIO DE MARCADORES RAPD E
GRUPOS DE ANASTOMOSES**

FRANCINE HIROMI ISHIKAWA

2006

FRANCINE HIROMI ISHIKAWA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DA RAÇA 65 DE
Colletotrichum lindemuthianum POR MEIO DE MARCADORES
RAPD E GRUPOS DE ANASTOMOSES**

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. Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

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

Ishikawa, Francine Hiromi

Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses / Francine Hiromi Ishikawa. -- Lavras : UFLA, 2005.

52 p. : il.

Orientadora: Elaine Aparecida de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Antracnose. 2. *Colletotrichum lindemuthianum*. 3. Grupos de anastomoses. 4. Variabilidade dentro de raças. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65223

FRANCINE HIROMI ISHIKAWA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DA RAÇA 65 DE
Colletotrichum lindemuthianum POR MEIO DE MARCADORS RAPD E
GRUPOS DE ANASTOMOSES**

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 9 de junho de 2006.

Prof. Dr. João Bosco do Santos

UFLA/DBI

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa

UNILAVRAS

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

UFLA/DBI

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por me conceder a vida e conforto nos momento difíceis;

OFEREÇO

Aos meus pais, Gervásio e Salete, por guiarem meus passos sempre com muito amor; aos meus avós e padrinhos, José e Francisca, pelo apoio, carinho e compreensão; aos meus irmãos, Hiroyoshi e Jaqueline;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente, me guiando e abençoando com o dom da vida.

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

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza, pelos ensinamentos transmitidos, amizade, apoio e orientação em todos os momentos, desde a graduação até o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Prof. João Bosco e Profa. Maria Cristina, e à pesquisadora Ângela Abreu, pelas contribuições para aperfeiçoamento deste trabalho.

À professora Lisete Chamma Davide por ter me despertado o interesse por esta área, e pela co-orientação, apesar das dificuldades encontradas para a condução dos trabalhos.

Aos professores César Brasil, Daniel Furtado, João Cândido e Magno, pelos ensinamentos.

À professora Patrícia Cisalpino, do Laboratório de Biologia de Microrganismos da UFMG, pela oportunidade concedida, bem como a todos com quem tive o prazer de conviver durante o período que lá estive: Anne, Roberta, Dora, Alexandra e a Naira.

À professora Patrícia Gomes, pela amizade, conselhos e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Kaesel, Marciane, Osnil e Cassius pela ajuda, conselhos, sugestões e convivência diária.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, Caio, Elisa, Patrícia, Saulo, Soraia e a Profª. Giovana, pelas contribuições.

Aos funcionários do DBI, Elaine, Zélia, Rafaela, Irondina e Patrícia, pela convivência e auxílio durante o curso.

Às amigas Livia Davide e Quélen, pelo auxílio na realização deste trabalho e também pelo companheirismo tanto para os estudos quanto para os momentos de descontração.

Aos colegas Adriano e Regiane, pela inestimável colaboração para a finalização do trabalho e pela amizade.

A todos os colegas do GEN que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização desse trabalho e pela excelente convivência.

Aos amigos Alex, Helton, Lívia Martinez, Marilza, Marcelo (Jacaré), Patrícia e Paula, pelos ótimos momentos que passamos juntos e pelo companheirismo durante este período.

As amigas Eliane, Cláudia, Heloína e Maria Juliana, pela amizade sincera, mesmo apesar da distância.

A minha tia Maria Santa, por me acolher e auxiliar durante esses anos, dando apoio, atenção e compreensão.

A toda a minha família, meus pais, irmãos, avós, tios e primos por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, me dando forças para que eu não desistisse nunca e alcançasse os meus objetivos.

SUMÁRIO

Página	
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução Geral	2
2 Referencial Teórico	4
2.1 Antracnose do feijoeiro	4
2.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (<i>Glomerella cingulata</i> f. <i>sp. phaseoli</i>).....	5
2.3 Variabilidade patogênica de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	7
2.4. Variabilidade genética de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	11
2.5 Anastomoses entre hifas.....	15
3 Referências Bibliográficas	22
CAPÍTULO 2: Variabilidade genética dentro da raça 65 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses	26
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Obtenção e manutenção dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i>	31
2.2 Anastomoses entre hifas.....	31
2.3 Obtenção da massa micelial	32
2.4 Extração de DNA	33
2.5 Reação RAPD	34
2.6 Eletroforese em gel	34
2.5 Análises estatísticas.....	34
3 RESULTADOS.....	36
3.1 Análises das anastomoses	36
3.2 Análises RAPD	37
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÕES	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO.....	49

RESUMO

ISHIKAWA, Francine Hiromi. **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.*

O *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro, apresenta uma ampla variabilidade patogênica e genética, o que tem dificultado o desenvolvimento de cultivares resistentes. Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade dentro da raça 65, por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses. Foram utilizados 13 isolados pertencentes à raça 65, coletados em diferentes locais, hospedeiros e anos. Para análise de marcadores RAPD, foram utilizados 24 *primers* que amplificaram um total de 83 bandas polimórficas. Utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice, obtiveram-se as estimativas das similaridades genéticas, que variaram de 0,54 a 0,82. O dendograma obtido pela análise de agrupamento permitiu identificar 11 grupos. As análises de anastomoses foram realizadas considerando compatíveis os isolados que formavam as anastomoses entre as hifas de isolados diferentes. Foram estimadas as proporções de reações compatíveis para cada isolado, bem como a análise de agrupamento, utilizando as estimativas de similaridade obtidas pelo coeficiente de Russel e Rao. As estimativas variaram de 0,28 a 0,85. No dendograma foi possível classificar 11 grupos de anastomoses, tendo apenas os isolados LV 61, LV 73 e LV 58 sido classificados em um mesmo grupo de anastomose, apesar de geneticamente distintos pela análise de RAPD. Ambas as análises permitiram demonstrar a grande variabilidade existente dentro da raça 65.

* Orientador (a): Elaine Aparecida de Souza – UFLA

ABSTRACT

ISHIKAWA, Francine Hiromi. **Genetic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by RAPD markers and anastomosis grouping.** 2006. 52 p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The causal agent of common bean anthracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, presents a wide genetic and pathogenic variability that has complicated the development of resistant cultivars. The aim of this study was to identify the variability within race 65 by RAPD markers and anastomosis groups. Thirteen isolates from race 65 collected in different counties, host cultivars and years were used. Twenty-four RAPD primers were used and amplified 83 polymorphic bands. The estimates of genetic similarities were obtained by Sorence-Dice's coefficient and ranged from 0.54 to 0.82. The dendrogram obtained by cluster analysis allowed to identify eleven groups. The anastomosis analyses were carried out considering as compatible when fusion of hyphae from the paired of isolates was observed. The proportion of compatible reactions for each isolate was estimated. Cluster analysis was obtained by similarity estimates using Russel and Rao's coefficient. Similarity estimates range from 0.28 to 0.85. Eleven groups of anastomosis were obtained and only the isolates LV 61, LV 73 e LV 58 were classified in the same anastomosis group, although these isolates were genetically distinct by RAPD analysis. Both analyses allowed to demonstrate the great variability within the race 65.

* Guidance Committee: Elaine Aparecida de Souza – UFLA (Major Professor).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (forma mitospórica) é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum, uma das doenças de maior importância dessa cultura. Perdas ocasionadas por este patógeno podem ser totais quando são utilizadas sementes infectadas e as condições de ambiente são favoráveis. Entre as medidas de controle desse patógeno, a resistência genética é a mais eficaz, pela redução nos custos de produção e pela diminuição dos danos causados ao ambiente. No entanto, a obtenção de cultivares resistentes é dificultada pela ocorrência de várias raças fisiológicas do patógeno (Ishikawa et al., 2005; Sartorato, 2002; Silva, 2004; Talamini et al., 2004).

Mais de cinquenta raças já foram identificadas no Brasil, sendo as raças 65, 73 e 81 as mais frequentes nesses últimos anos (Silva, 2004). Vários trabalhos vêm demonstrando que a raça 65 merece destaque devido a sua alta frequência e ampla distribuição geográfica. Além disso, tem-se observado uma grande variação quanto à patogenicidade quando se inoculam diferentes isolados pertencentes a essa mesma raça em cultivares comerciais, evidenciando a variabilidade dentro da raça (Davide, 2006).

Várias são as metodologias que podem ser empregadas para a quantificação da variabilidade genética, entre elas podemos destacar os marcadores moleculares. Estudos moleculares vêm demonstrando que há uma grande variabilidade dentro de raças em *C. lindemuthianum* (Alzate-Marin et al., 2001; Balardín et al., 1997; Otoyá et al., 1995). Silva (2004) observou que há uma maior variação dentro de raças do que entre raças, evidenciando a elevada capacidade de variação deste patógeno.

Um mecanismo que pode estar gerando variação dentro de uma população de reprodução assexuada é a ocorrência do ciclo parassexual. Para

isso, é necessário a formação de anastomoses entre hifas. Rodríguez-Guerra et al. (2003) determinaram grupos de anastomoses em populações provenientes de uma mesma planta. Já Freire et al. (2005) determinaram grupos de anastomoses entre isolados de raças diferentes. A fusão de hifas é um pré-requisito para a compatibilidade vegetativa e, conseqüentemente, para a formação do heterocário, que é fundamental na ocorrência do ciclo parassexual.

Diante do exposto, fica evidente que o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes vai depender do entendimento do nível de variabilidade dentro de raças, para que se possam adotar melhores estratégias que permitam ampliar a durabilidade da resistência das cultivares de feijoeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a variação dentro da raça 65 por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antracnose do feijoeiro

Dentre as doenças de importância na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), pode-se destacar a antracnose, cujo agente etiológico é o *Colletotrichum lindemuthianum*. A ocorrência desta doença pode causar danos expressivos nas lavouras quando os fatores cultivar suscetível, condições climáticas favoráveis e sementes infectadas estão presentes simultaneamente no cultivo (Balardin, 1997a; Carbonell et al., 1999). Além disso, há uma depreciação da qualidade do produto, por provocar manchas nos grãos, tornando-os indesejáveis para o consumo.

Os sintomas típicos causados pela antracnose são as lesões necróticas de coloração marrom-escura presentes nas nervuras principais e na face inferior da folha; lesões circulares, deprimidas, de coloração marrom, com as bordas escuras e salientes, circundadas por um anel pardo-avermelhado nas vagens e, no hipocótilo, pode apresentar lesões alongadas, superficiais ou deprimidas, podendo até ocorrer o estrangulamento do mesmo e morte da planta conforme a agressividade do patógeno. Quando afeta as plântulas, lesões pequenas de coloração marrom ou preta podem ser observadas nos cotilédones (Kimati et al., 1995).

A antracnose possui uma ampla distribuição nas regiões produtoras de feijão, especialmente nas regiões sul e sudeste, onde as temperaturas moderadas favorecem o seu desenvolvimento (Rava et al., 1994; Silva, 2004).

A disseminação deste patógeno ocorre à curta distância por meio de respingos de chuvas, ventos, implementos agrícolas, homem, insetos e vários outros agentes, e a longa distância, por meio de sementes infectadas. Essas sementes representam a maior fonte de inóculo do ponto de vista epidemiológico

(Silva, 2004). Além disso, promove o intercâmbio de diferentes raças entre as diversas regiões produtoras (Rava et al., 1994).

O emprego da resistência genética como método de controle da doença é econômico e eficiente. Porém, deve estar associado a um manejo integrado, como o uso de sementes de alta qualidade sanitária, rotação de culturas e eliminação de restos culturais, dentre outros (Talamini et al., 2004).

Uma grande dificuldade do emprego da resistência genética é a alta variabilidade que o patógeno apresenta, resultando em um elevado número de raças nas regiões produtoras dessa cultura (Carbonell et al., 1999; Rava et al., 1994; Talamini et al., 2004).

2.2 *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*)

Glomerella cingulata (Stonem Spauld & V. Schrenck) f. sp. *phaseoli*, pertencente à classe dos Ascomicetos, é comumente encontrada na sua forma mitospórica ou conidial *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), causando a antracnose no feijoeiro (Sutton, 1992).

A classificação dos Ascomicetos baseia-se em sua forma de reprodução sexual (forma meiospórica = forma sexual = forma teleomórfica). Sob esta forma, o agente causal da antracnose do feijoeiro ainda não foi encontrado na natureza, tendo seu estado conidial sido descoberto primeiro (forma mitospórica = forma assexual = forma anamórfica) e o seu nome amplamente empregado e conhecido como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn), pertencente à classe dos Deuteromicetos e à ordem Melanconiales (Rava et al. 1994).

O *Colletotrichum lindemuthianum* se reproduz, portanto, de forma assexual, produzindo os conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo. Apresenta micélio septado e ramificado, com coloração variando de

hialina a quase negra (Walker, 1959). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e oblongos ou cilíndricos (Sutton, 1992). Por ocasião da germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, que podem formar apressórios em seus ápices, ou continuar crescendo, formando as hifas e micélios.

Os conídios germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o hospedeiro, se as condições lhes são favoráveis. Há formação do tubo germinativo, seguido do apressório, que penetra mecanicamente pela cutícula e pela epiderme da planta. O aparecimento de sintomas pode ser observado a partir do sexto dia após o início da infecção (Kimati et al., 1997).

A fase sexuada conhecida como *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*, pertence à classe dos Ascomicetos e ordem Diaportales. Os esporos sexuais ou ascósporos são resultantes dos processos de plasmogamia (fusão celular), seguidos de cariogamia (fusão nuclear) e divisão meiótica. São produzidos em corpos de frutificação denominados peritécios, os quais possuem formato mais ou menos arredondado. Localizam-se dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco (Bergamin Filho et al., 1995).

A forma sexual é freqüente em condições de laboratório e pode explicar grande parte da variabilidade deste patógeno devido à formação de recombinantes (Camargo Junior, 2004; Rodrigues-Guerra et al., 2005). Porém, até o momento, a forma sexual não foi encontrada em condições de campo.

Brygoo et al. (1998), estudando a reprodução e a estrutura populacional de fungos fitopatogênicos, verificaram que, no caso do *C. lindemuthianum*, apesar de ser encontrado na forma assexuada e da fase sexual nunca ter sido observada na natureza, a organização e a diversidade genética são mais semelhantes à de populações originadas de reprodução sexuada do que populações assexuadas.

2.3 Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* possui uma alta variabilidade patogênica e está presente em diversas regiões produtoras de feijão do Brasil (Talamini et al., 2004). Esta variabilidade pode ser devido a uma coevolução patógeno x hospedeiro (Pastor-Corrales et al., 1994).

Perfect (1999) considera que as espécies de *Colletotrichum* podem proporcionar um excelente modelo para estudos da base molecular da diferenciação entre estruturas de infecção e interações patógeno-hospedeiro, principalmente no caso de *Colletotrichum lindemuthianum*, por tratar-se de um patógeno hemibiotrófico.

A primeira comprovação da existência de variabilidade patogênica deste fungo foi realizada por Barrus (1911), que verificou reações de suscetibilidade diferenciada nas cultivares de feijoeiro, quando inoculadas com isolados de diferentes procedências, os quais foram denominados como Alfa e Beta. No Brasil, o trabalho pioneiro para a identificação de raças foi feito por Kimati em 1966, a partir de isolados de São Paulo, identificando duas raças pertencentes ao grupo Alfa Mexicano II e Delta (Silva, 2004).

Em todo o mundo, várias raças foram identificadas, mostrando uma grande variabilidade neste patógeno. Esta variabilidade patogênica era representada, até há pouco tempo, por grupos de raça denominados Alfa, Beta, Gama, Delta, Mexicano I, Mexicano II, Brasileiro, Brasileiro II e raças fisiológicas pertencentes a estes grupos (Carbonell et al., 1999). No entanto, não havia um consenso quanto à nomenclatura das raças, o que dificultava a comparação de resultados e a troca de informações entre pesquisadores. Na Primeira Reunião Latino Americana da Antracnose do Feijoeiro, realizada no CIAT (Cali, Colômbia), ocorreu a padronização de doze cultivares

diferenciadoras e o uso do sistema binário proposto Habgood (1970), para classificar as raças do patógeno (Tabela 1).

Vários estudos de levantamento de raças vêm sendo realizados desde então (Abreu et al., 1993; Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Ishikawa et al., 2005; Balardin et al., 1997a; Carbonell et al., 1999; Rava et al., 1994; Sartorato, 2002; Talamini et al., 2004) comprovando a alta variabilidade patogênica.

TABELA 1 Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro, para a caracterização de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*.

Cultivares diferenciadoras	Série Binomial	Alelos de resistência	Origem dos cultivares
Michelite	2 ⁰	Co-11	Mesoamericana
MDRK	2 ¹	Co-1 ⁴	Sul dos Andes
Perry Marrow	2 ²	Co-1 ³	Sul dos Andes
Cornell 49-242	2 ³	Co-2	Mesoamericana
Widusa	2 ⁴	Co-1 ⁵	Sul dos Andes
Kaboon	2 ⁵	Co-1 ²	Sul dos Andes
México 222	2 ⁶	Co-3	Mesoamericana
PI 207262	2 ⁷	Co-4 ³ , Co-9	Mesoamericana
TO	2 ⁸	Co-4	Mesoamericana
TU	2 ⁹	Co-5	Mesoamericana
AB 136	2 ¹⁰	Co-6, co-8	Mesoamericana
G 2333	2 ¹¹	Co-4 ² , Co-5, Co-7	Mesoamericana

Silva (2004) estudou a distribuição e caracterizou vários isolados provenientes de diversas regiões produtoras do Brasil e observou que as raças 65, 81 e 73 foram as que apresentaram maior estabilidade em relação às demais, devido às suas altas frequências, tanto no levantamento realizado por este autor, quanto pelo levantamento feito com os dados obtidos nos últimos dez anos. Este mesmo autor observou a ocorrência de raças complexas, como a 337 e 593, que vencem alelos de resistência das cultivares TO (alelo Co-4) e TU (alelo Co-5), respectivamente, e que vêm sendo utilizados como fontes de resistência em alguns programas de melhoramento. Portanto, o surgimento dessas novas raças pode ter sido em consequência da pressão de seleção exercida do hospedeiro sobre o patógeno.

O atual sistema de determinação de raças facilitou muito a troca de informações entre pesquisadores, como sobre fontes de resistência de cultivares para diferentes regiões e a dinâmica populacional do patógeno. Porém, o conjunto de diferenciadoras ainda não é o ideal, pois, algumas cultivares carregam os mesmos genes (Davide, 2006; Nietzsche et al., 2000; Young et al., 1997). Portanto, as cultivares diferenciadoras dificilmente representam todos os genes do hospedeiro, dificultando uma classificação precisa das raças e podendo levar a problemas de variação dentro das raças (Davide, 2006).

A diversidade de virulência em 128 isolados originados nos três centros de diversidade de *P. vulgaris* foi avaliada por Sicard et al. (1997b) que identificaram 25 raças distintas. Na Argentina e no México, as cultivares diferenciadoras mais suscetíveis foram as de origem andina (Perry Marrow e MDRK) e mesoamericana (Cornell, Mexico 222, TO). Foram encontradas 10 raças especificamente no México e 13 na Argentina. Já a região do Equador foi diferente das anteriores, devido à alta frequência da raça zero (96,55%), sugerindo que as cultivares diferenciadoras não permitiram uma descrição apropriada da diversidade de virulência neste local. Vale ressaltar que,

atualmente, o conjunto de cultivares não possui nenhuma cultivar originada na região do Norte dos Andes. Estes resultados sugerem que há uma adaptação dos isolados às cultivares de uma mesma origem geográfica.

Carbonell et al. (1999) realizaram um trabalho visando à identificação de raças do patógeno e a reação de cultivares recomendadas para o estado de São Paulo. Foram identificadas nove raças, com o predomínio das raças 65, 81 e 89. No entanto, ao inocularem dois isolados da raça 31, dois da raça 65 e três da raça 81, em cultivares recomendadas para o plantio no estado, verificaram diferenças dentro de raças, sugerindo que o conjunto de cultivares diferenciadoras de *C. lindemuthianum* não era suficiente para a discriminação da diversidade de patogenicidade dos isolados avaliados, devido a possíveis interações e combinações gênicas existentes entre os genes para resistência ao patógeno.

Em um levantamento de 200 isolados de vários países do mundo, realizado por Mahuku & Riascos (2004), foram identificadas 90 raças e foi verificado que todas as cultivares diferenciadoras, inclusive a G2333, já tiveram sua resistência quebrada por isolados de *C. lindemuthianum*. Este fato evidencia que o uso do conjunto de diferenciadoras não é suficiente para a determinação da variabilidade patogênica.

Em vários trabalhos a raça 65, denominada anteriormente como Epsilon (grupo Alfa), vem se destacando como uma das mais freqüentes e de ampla distribuição geográfica (Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Balardin et al., 1997a; Carbonell et al., 1999; Ishikawa et al., 2005; Rava et al., 1994; Sartorato, 2002, Talamini et al., 2004). Assim, Davide (2006) realizou um estudo para avaliar a variação patogênica dentro da raça 65. Seis isolados coletados em diferentes locais, cultivares hospedeiras e anos, pertencentes a esta raça, foram inoculados nas doze cultivares diferenciadoras e em sete cultivares comerciais, na concentração normalmente utilizada para inoculação (10^6 conídios/mL) e também nas concentrações de 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 , para avaliar a resistência

genética no patossistema *Colletotrichum*-feijoeiro. De acordo com os resultados, não foi possível constatar a resistência horizontal, provavelmente devido à presença dos alelos de resistência vertical que inflacionaram as estimativas da capacidade geral de reação. Quanto à agressividade, pôde-se observar que houve diferenças entre os isolados, tendo os isolados CL 837 e CL 844 sido os mais agressivos. Além disso, as cultivares comerciais utilizadas apresentavam-se ora como resistentes ora suscetíveis à raça 65, dependendo do isolado inoculado, evidenciando a existência da variação patogênica dentro da raça.

2.4 Variabilidade genética de *Colletotrichum lindemuthianum*

Várias são as metodologias que podem ser empregadas para a quantificação da variabilidade genética. Entre elas, podem-se destacar os marcadores moleculares.

O uso das cultivares diferenciadoras é limitado para este tipo de estudo, visto que leva em conta somente o caráter patogenicidade, que é representado por uma pequena fração do genoma do patógeno. Torna-se então necessária a utilização de outras ferramentas que possibilitem o estabelecimento de informações mais detalhadas da estrutura populacional do patógeno (Silva, 2004).

Os marcadores moleculares são utilizados freqüentemente para os estudos genéticos em fungos filamentosos. Marcas simples, com bastante repetibilidade, são obtidas quando se utiliza seqüências de DNA. Regiões homólogas são reconhecidas por iniciadores de DNA (“primers”). Com o uso de condições de reações específicas para a replicação do DNA, podem ser realizadas amplificações e o produto pode ser observado posteriormente. Essas amplificações ocorrem em condições de aumento e redução de temperaturas em

que há a atuação da enzima taq DNA polimerase. Na reação ocorre, então, desnaturação, anelamento e extensão do DNA (McPherson & Moler, 2000).

Um dos marcadores mais utilizados é o “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) que utiliza um único “primer” com seqüência aleatória e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida (Ferreria & Gratapaglia, 1998). Com isso, obtêm-se um elevado nível de polimorfismo e uma baixa repetibilidade dos resultados. No entanto, essa técnica apresenta uma série de vantagens em relação às demais técnicas, como a rapidez, o baixo custo e a necessidade de pouco material, que a tornaram bastante viável e popular (Silva, 2004).

Otoya et al. (1995) estudaram a variabilidade genética em 168 isolados de *C. lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão da Colômbia. Utilizando marcadores RAPD, observaram que a diversidade entre e dentro de raças era elevada e que não havia nenhuma correlação entre a patogenicidade e marcadores moleculares. Portanto, o polimorfismo do DNA observado foi independente da virulência. Assim, dois isolados podem pertencer a uma mesma raça, no entanto, serem geneticamente distintos (pertencentes a grupos de RAPD diferentes) tendo adquirido a mesma virulência pela evolução convergente, por terem enfrentado a mesma pressão de seleção.

Sicard et al. (1997a) estudaram a estrutura genética de populações selvagens de *C. lindemuthianum*. Foram coletados 45 isolados provenientes de populações selvagens do feijoeiro comum no centro de origem no sul dos Andes. Observaram polimorfismo, tanto para virulência, inoculando os isolados nas doze cultivares diferenciadoras, quanto para marcadores RAPD, identificando 45 marcas polimórficas. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que grande parte da variação estava dentro da população. Não houve correlação entre os marcadores RAPD e a virulência dos isolados, no entanto, houve uma correlação positiva entre a distância geográfica e as distâncias do RAPD,

sugerindo uma migração entre populações adjacentes . Os autores concluem que os isolados andinos de *C. lindemuthianum* não refletem a real diversidade encontrada nos isolados de feijoeiro comum cultivados.

No trabalho realizado por Balardin et al. (1997b) foram coletados 138 isolados em seis países (Argentina, Brasil, Republica Dominicana, Honduras, México e Estados Unidos). Os autores identificaram 41 raças que foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro constituído pelas raças que são amplamente distribuídas e o segundo por raças encontradas em um único país. No grupo I, encontravam-se então, as raças 7, 65 e 73, sendo a raça 73 a mais comum. A raça 65 foi encontrada freqüentemente nos Estados Unidos e no Brasil. O polimorfismo molecular gerado pelo RAPD confirmou a extensa variabilidade do *C. lindemuthianum*. Foram obtidos quinze grupos, tendo os dois maiores agrupado isolados de todas as regiões geográficas amostradas. Observaram polimorfismo molecular entre isolados das raças 65 e 73, entre e dentro de países, exceto para os isolados da raça 65 provenientes do Brasil. Os isolados da raça 65 dos Estados Unidos apresentaram diferentes bandas de RAPD. Já os isolados brasileiros apresentaram apenas bandas monomórficas.

González et al. (1998) utilizaram, em seus estudos, cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD e AFLP para análise de 59 isolados coletados em diferentes regiões produtoras de feijão do México. Foram identificadas dez raças. Os autores observaram que uma maior variação ocorria nas regiões onde predominava pequenas áreas consorciadas com milho e que, nas grandes áreas com monocultivo, prevalecia apenas uma raça. Isso pode ser um reflexo da diferença de germoplasma utilizado e de práticas culturais adotadas nas regiões de cultivo. Os marcadores moleculares permitiram o agrupamento dos isolados e observou-se a tendência de agrupamento de acordo com a origem geográfica. Os autores ressaltam que o AFLP discriminou melhor os grupos devido a um maior número de bandas polimórficas geradas em relação

ao RAPD. No entanto, ambas as análises não revelaram uma relação direta entre as raças e o genótipo, como já mencionado em vários outros trabalhos.

Um estudo sobre a divergência genética entre 57 isolados de *C.lindemuthianum* coletados em 11 países localizados na Europa, América do Norte, Central e do Sul, foi realizado por Balardin et al. (1999) por meio de análises baseadas em PCR-RFLP e seqüenciamento de regiões de ITS de rRNA (ITS 1 e ITS 2). A análise de sete raças (7, 17, 23, 31, 65, 73 e 130) coletadas nos diferentes países permitiu identificar diferenças dentro das raças 7, 17, 31 e 73. A distância genética calculada mostrou que a raça 73 dos EUA possuía maior distância genética da raça 73 do México, do que de uma raça altamente virulenta, a 2047, coletada em Costa Rica, ou da raça 89 do Brasil. Estes resultados sustentam que o nível de variabilidade molecular dentro dos isolados de *C. lindemuthianum* é maior do que a variabilidade caracterizada anteriormente pela análise de virulência e sugerem a evolução independente de padrões específicos de virulência.

Alzate-Marin et al. (2001) realizaram um estudo objetivando verificar a presença ou ausência de bandas patótipo-específicas nas raças 64, 65, 73 e 89. Para isto amplificaram amostras do DNA de 41 isolados de 20 raças de *C. lindemuthianum* com os primers OPA09, OPAT18, APAT09, APAO07, os quais seriam relativos às raças 64, 65, 73 e 89, respectivamente de acordo com trabalho de Mesquita et al. (1998). A banda de 1500pb que seria referente à raça 65, foi observada na maioria dos isolados, com exceção de alguns da raça 89. O mesmo fato foi observado para as outras bandas que seriam específicas às raças 64, 73 e 89. Estes resultados comprovam a não ligação exclusiva entre os marcadores gerados pelos primers citados e as raças correspondentes. Foi realizada também uma análise da variabilidade genética a partir de 19 bandas polimórficas, sendo obtidos dois agrupamentos, o primeiro formado por um isolado das raças 55, 69, 81, 83, 87, 89, 95, 102, 117, 339, dois isolados da raça

23 e quatro das raças 64 e 65. O segundo agrupamento foi composto por um isolado das raças 64, 65, 67, 72, 97, 343, 453, e 585, três isolados das raças 81 e 89 e sete isolados da raça 73. Portanto, a análise molecular de poucos isolados pertencentes a poucas raças pode proporcionar resultados diferentes quando comparados a análises resultantes de um maior número de isolados por raças. Portanto, resultados com base na análise molecular de várias raças, representadas por um único indivíduo, podem sofrer mudanças quanto maior o número de isolados da mesma raça são analisadas.

Silva (2004), com o objetivo de estudar a distribuição dos isolados de *C.lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil, utilizou as cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD. Foram coletados 88 isolados oriundos de diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil. A partir dos dados de similaridade genética foi construído um dendograma e obtidos os agrupamentos. Pôde-se observar que isolados pertencentes a uma mesma raça foram classificados em grupos diferentes. Dentre essas raças, pôde-se destacar a raça 65 que foi encontrada em dois grupos diferentes, ao contrário do que foi observado por Balardin et al. (1997b). Pela análise de variância molecular, pôde-se constatar que a maior parte da variação foi encontrada dentro de raças (80,85%), evidenciando a elevada capacidade de variação do patógeno.

2.5 Anastomoses entre hifas

Colletotrichum lindemuthianum, assim como a maioria dos fungos, é composto por filamentos tubulares denominados hifas. Estas desempenham importantes funções, como a de colonização do substrato, absorvendo água e outros nutrientes.

A anastomose é a fusão entre hifas, podendo ser de dois tipos: em forma de H e adjacente. Anastomoses entre hifas foram encontradas em *C.*

lindemuthianum sem verificar a passagem de núcleo por Mendes-Costa, Davide e Roca (1998). Já Ishikawa et al. (2003) e Souza (2005) observaram anastomoses em H entre hifas, com a passagem de núcleo.

A fusão de hifas (anastomoses) e a formação do heterocário são pré-requisitos para a ocorrência do ciclo parassexual. Além disso, as anastomoses são importantes para comunicação intra-hifas e homeostase da colônia durante o crescimento e 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 subsequente entre hifas localizadas atrás da hifa principal da zona de crescimento periférico do micélio (Glass et al., 2004).

Embora sejam óbvios os benefícios da formação do heterocário, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (Glass et al., 2000). Em fungos filamentosos existem 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) (Saupe, 2000). Quando dois indivíduos se encontram, eles podem sofrer a fusão celular ou anastomose. Se os dois indivíduos tiverem 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 (Saupe, 2000).

Acredita-se que a incompatibilidade vegetativa funcione como um sistema de reconhecimento de genótipos diferentes 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, sendo, portanto, um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (Glass et al.,

2000). Estes mesmos autores sugerem que a seleção atuaria sobre os locos *het* para manutenção do polimorfismo em populações de fungos. Saupe (2000) comenta que a função dos genes *het* é preservar a individualidade genética.

Estudos mais detalhados sobre a fusão e o crescimento de hifas podem ser divididos em etapas. Leslie & Zeller (1996) propuseram um modelo simples no qual distinguem-se quatro etapas diferentes na reação de incompatibilidade do heterocário. A etapa inicial é a pré-fusão e está sob o controle de genes, como aqueles envolvidos na produção do feromônio e receptores, e genes que podem estar relacionados com a auto-incompatibilidade do heterocário (*hsi*). A etapa da fusão é controlada por genes de auto/ não-auto-reconhecimento (*self/non-self-recognition*), como alguns genes de incompatibilidade do heterocário (*het*). Após a fusão, uma cascata de reações ocorre 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. Finalmente, genes apoptóticos levam à morte celular (Figura 1).

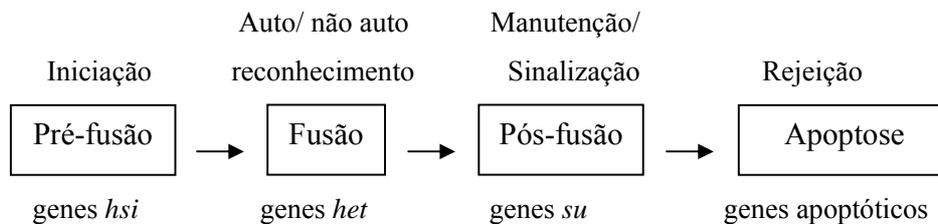


FIGURA 1 Modelo simplificado mostrando os diferentes passos no processo de incompatibilidade do heterocário e os genes associados a este processo de acordo com Leslie & Zeller, (1996).

Glass et al. (2004) comentam que o pré-contato pode ocorrer de três formas: 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 ocorre o pré-contato do tipo “tip-to-side”.

O início do pré-contato das pontas novas das hifas, também denominados grampos, e o redirecionamento do crescimento da hifa são provavelmente, devido a uma difusão de sinais químicos (Glass et al., 2000). Os autores também comentam que existem aspectos temporais e espaciais no evento da fusão: inicialmente ocorre a degradação das paredes celulares, provavelmente devido à liberação de enzimas hidrolíticas no ponto de contato, e então é formada uma ponte de parede celular entre duas hifas envolvidas, presumidamente pela liberação de material da parede celular nesta área. Os eventos pós-fusão entre hifas envolvem a fusão de membranas plasmáticas e a mistura de citoplasma.

Os passos de pré-contato, pós-contato e pós-fusão foram descritos detalhadamente em nove estágios por Glass et al. (2004). No primeiro estágio, em todos os tipos de pré-contato, a ponta da hifa secreta um sinal extracelular desconhecido e difusível, o qual induz a 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). Não se sabe se a outra hifa secreta um sinal quimiotrópico. No segundo e terceiro estágios, a ponta de cada hifa secreta um sinal difusível quimiotrópico extracelular, que atua regulando o comportamento do Spitzenkörper e ocorre o crescimento das pontas das hifas uma em direção a outra. No quarto estágio, antes de ocorrer a anastomose, as pontas das hifas apresentam uma parada de crescimento após o contato físico de suas paredes celulares e os Spitzenkörper persistem. No estágio seguinte ocorre a secreção de um material adesivo junto às pontas das hifas, no sexto estágio, o crescimento isotrópico resulta no aumento da aderência das pontas das hifas. No sétimo

estágio ocorre a dissolução da parede celular e do material adesivo, as membranas plasmáticas das pontas das hifas entram em contato e em seguida fundem-se. No oitavo estágio ocorre a formação de um poro e o Spitzenkörper permanece associado a estes, enquanto inicia o aumento e fluxo citoplasmático entre as hifas. Finalmente, no nono estágio, os poros ampliam, o Spitzenkörper desaparece e as organelas (como núcleo, vacúolo e mitocôndria) muitas vezes exibem fluxo entre as hifas em anastomose, possivelmente devido a diferenças na pressão de turgor.

Dois tipos de sistemas genéticos, um alélico e outro não alélico foram descritos como reguladores da incompatibilidade vegetativa. Em sistemas alélicos, anastomoses entre os indivíduos que contêm um único loco *het* diferente provocam a incompatibilidade vegetativa. Em interações não alélicas, uma interação entre alelos específicos em dois locos diferentes provoca a incompatibilidade. O número de genes *het* em uma população determina o número dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs), dentro dos quais os heterocários podem ser prontamente formados (Leslie & Zeller, 1996).

O controle genético, molecular e fisiológico da anastomose de hifas ainda é pouco entendido. Em *Neurospora crassa*, o uso de mutantes para fusão de hifas (*ham-1* e *ham-2*) e mutantes para auto e não-autofusão de hifas (*nrc-1* e *mak-2*, por exemplo), tem auxiliado no entendimento dos mecanismos e função da fusão de hifas na biologia de fungos filamentosos (Glass et al., 2000; 2004; Roca et al., 2005). O conhecimento da genética dos sistemas de incompatibilidade vegetativa em ascomicetos 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) e alguns genes que influenciam a reação de pós-fusão foram identificados. 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 possuam características genéticas e bioquímicas comuns (Glass et al., 2000).

Para outras espécies, as quais o loco *het* não tenha sido identificado, tem-se definido grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs). 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 freqüentemente em interações de incompatibilidade (Saupe, 2000).

Rodriguez-Guerra et al. (2003) avaliaram a variabilidade de populações de *C. lindemuthianum* provenientes de uma mesma planta, coletando múltiplos isolados em quatro locais diferentes do México, tendo, em dois desses locais, sido obtidas várias amostras de uma mesma planta. As amostragens foram realizadas durante anos sucessivos. Foram feitas análises por meio da determinação do genótipo dos isolados, utilizando marcadores moleculares e utilizando grupos de anastomoses. Este é o primeiro relato sobre grupos de anastomoses em *C. lindemuthianum* e demonstrou que, em populações naturais, vários grupos de anastomoses podem ser identificados, tendo sido sugerido que este pode ser um mecanismo que leva 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.

Os resultados obtidos demonstraram que os padrões de variação no genótipo e grupos de anastomoses são complexos nos locais amostrados, não havendo uma relação entre genótipo, patótipo e grupos de anastomoses. Em todos os locais foi determinada apenas uma raça, com exceção de Chihuahua,

onde foram identificadas duas raças. O baixo nível de diversidade encontrado dentro de uma mesma planta e de uma mesma lesão, e a ocorrência de genótipos relacionados e grupos distintos de anastomoses em um único local, sugerem que nessas condições a população de *C. lindemuthianum* se reproduz assexuadamente e que a variação existente, provavelmente, deve-se à mutação e/ou reprodução parassexual entre isolados pertencentes a um mesmo grupo de anastomose.

Freire et al. (2005), utilizando cinco raças diferentes de *C. lindemuthianum*, confrontadas duas a duas, observaram que havia a formação de anastomoses entre hifas de isolados de raças diferentes. Houve a formação de três grupos de compatibilidade, de acordo com análise de agrupamento. 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.

Diante do exposto, fica evidente que o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes vai depender do entendimento do nível de variabilidade dentro de raças e da população do patógeno, para que se possam adotar melhores estratégias que permitam ampliar a durabilidade da resistência das cultivares de feijoeiro.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. de F.B.; RAMALHO, M.A.P.; MENU, H.M.R. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* do Sul e Alto Paranaíba de Minas Gerais. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1993. p.45.
- ALZATE-MARIN, A. L.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R.; SOUZA, K. A.; SARTORATO, A. Análises do DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 197-203, abr./jun. 2001
- ALZATE-MARIN, A. L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brasil. **Bean Improvement Cooperate**, Fort Collins, v.47, p.241-242, Mar. 2004.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 50-53, jan./mar. 1997a.
- 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. 1997b.
- BALARDIN, R.S.; SMITH, J. J.; KELLY, J. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycological Research**, New York, v.103, n.7, p.841-848, July 1999.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Princípios e conceitos. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1 p. 919.
- BRYGOO, Y. et al. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi, In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y., CLARKSON, J. (Ed.). **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CAB International. p. 133-148. 1998.
- CAMARGO JUNIOR, 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.

CARBONELL, S.A.M.; ITO, M. F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F. G.; RAVAGANANI, S.; ALMEIDA, A. L. L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.1, p.60-65, mar. 1999.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Programa de frijol**: informe anual de 1998. Cali, 1990. p. 128-129. (CIAT. Documento de trabajo, 72).

DAVIDE, L. M. C. **Comprovação da variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum***. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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 Microbiol.** 12: 135-141. 2004.

GONZÁLEZ, M. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.4, p.292-299, Apr. 1998.

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

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, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 2003. 1CD-ROM.

ISHIKAWA, F. H., SILVA, K.J.D.; SOUZA E. A., DAVIDE, L. M. C.; FREIRE, C. N. S. Levantamento de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA, 2005. p. 501-504.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 774 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.

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.

MC PHERSON, M.J.; MOLLER, S.G. **PCR**. Oxford: BIOS. 2000. 276 p.

MENDES-COSTA, M.C.; DAVIDE, L.C.; ROCA, M., M.G. Cytology of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner 'in vitro'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.2, 250-253, 1998.

NIETSCHKE, S. et al. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.117-121, 2000.

OTOYA, M.M.; RESTREPO, S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Amplificación al azar del ADN polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia. **Fitopatología Colombiana**, Santa Fé del Bogotá, v.19, n. 1, p.7-14, 1995.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ERASO, O. A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose in common bean accession G2333. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n.10, 959-962, Oct. 1994.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R.J. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal- plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

RAVA, A.C.; 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, jan. 1994.

ROCA, M.G.; ARLT, J.; JEFFREE, C.E. and READ, N.D. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 911-919, 2005.

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.

RODRIGUEZ-GUERRA, R.; RAMÍREZ-RUEDA, M. T.; CABRAL-ENCISO, M.; GARCÍA-SERRANO, M.; LIRA-MALDONADO, Z.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; GONZALEZ-CHAVIRA, M.; SIMPSON, J. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, v.97, p. 793-803, 2005.

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.

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.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Paseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.8, p.807-813, Aug. 1997a.

SICARD, D. et al. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in wild population of common bean. **Plant Pathology**, v.46, p.355-365, 1997b

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.

SOUZA, B. O. **Variabilidade Genética em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*) por meio de marcadores morfológicos**. 2005. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: C.A.B. International, 1992. P. 1-26.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D. e; OLIVEIRA, F.A. de; Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 371-375, jul./set. 2004.

WALKER, J.C. **Enfermedades de las hortalizas**. Barcelona: Salvat, 1959. 624p.

YOUNG, R.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, Madison, v.37, n.3, p.940-946, 1997.

CAPÍTULO 2

**Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*
por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses.**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças de grande importância na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode-se destacar a antracnose, cujo agente etiológico é o *Colletotrichum lindemuthianum*. A antracnose possui uma ampla distribuição nas regiões produtoras de feijão, especialmente nas regiões onde as temperaturas são moderadas e com alta umidade, pois favorecem o seu desenvolvimento (Rava et al., 1994; Silva, 2004). A sua ocorrência pode causar danos expressivos às lavouras quando os fatores cultivar suscetível, condições climáticas favoráveis e sementes infectadas estão presentes simultaneamente no cultivo (Balardin, 1997a; Carbonell et al., 1999).

O método mais econômico e eficiente de controle da doença é o emprego da resistência genética (Talamini et al., 2004). No entanto, a grande dificuldade do uso deste método está na alta variabilidade que o patógeno apresenta, resultando em um elevado número de raças nas regiões produtoras dessa cultura (Carbonell et al., 1999; Rava et al., 1994; Talamini et al., 2004).

A determinação da variabilidade patogênica é realizada com base na reação dos isolados nas doze cultivares diferenciadoras recomendadas pelo CIAT (1990). Vários estudos de levantamento de raças vêm sendo realizados comprovando essa alta variabilidade patogênica (Abreu et al., 1993; Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Balardin et al., 1997; Carbonell et al., 1999; Ishikawa et al., 2005; Rava et al., 1994; Sartorato, 2002; Talamini et al., 2004). Mais de cinquenta raças já foram identificadas no Brasil, entre as quais 65, 73 e 81 são as mais frequentes nesses últimos anos (Silva, 2004).

Muitos trabalhos vêm demonstrando que a raça 65 merece destaque, devido a sua alta frequência e ampla distribuição geográfica (Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Balardin et al., 1997; Carbonell et al., 1999; Davide, 2006;

Ishikawa et al., 2005; Rava et al., 1994; Sartorato, 2002, Talamini et al., 2004). Além disso, tem-se observado uma grande variação quanto à patogenicidade, quando inoculam-se diferentes isolados pertencentes a essa mesma raça em cultivares comerciais, evidenciando a variabilidade dentro da raça (Davide, 2006).

No estudo da variabilidade genética, o uso das cultivares diferenciadoras torna-se, então, limitado, visto que leva em conta somente o caráter patogenicidade, que é representado por uma pequena fração do genoma do patógeno. Torna-se então necessária a utilização de outras ferramentas que possibilitem o estabelecimento de informações mais detalhadas da estrutura populacional do patógeno (Silva, 2004). Várias são as metodologias que podem ser empregadas para a quantificação da variabilidade genética. Entre elas, pode-se destacar os marcadores moleculares.

Estudos moleculares vêm demonstrando que há uma grande variabilidade dentro de raças em *C. lindemuthianum*, não havendo nenhuma correlação entre patogenicidade e as marcas (Alzate-Marin et al., 2001; Balardin et al., 1997b; Otoy et al., 1995). Silva (2004) observou que há uma maior variação dentro de raças do que entre raças, evidenciando a elevada capacidade de variação deste patógeno.

Um mecanismo que pode estar gerando variação dentro de uma população de reprodução assexuada é a ocorrência do ciclo parassexual. Para isso, é necessária a formação de anastomoses entre hifas, que seria o primeiro passo para a heterocariose. A anastomose é a fusão entre hifas, podendo 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 reprodução (Saupe, 2000), além de permitir a troca de material citoplasmático e genético (Roca, 2004).

Embora sejam óbvios os benefícios da formação do heterocáριο, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (Glass et al., 2000).

A fusão e o crescimento de hifas podem ser divididos em etapas. Leslie & Zeller (1996) propuseram um modelo simples, no qual distinguem quatro etapas diferentes na reação de incompatibilidade do heterocáριο. A etapa inicial é a pré-fusão e está sob o controle de genes *hsi*, que estariam envolvidos na produção do feromônio e receptores. A etapa da fusão é controlada por genes *het*. Após a fusão, uma cascata de reações ocorre, 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.

Rodríguez-Guerra et al. (2003) determinaram grupos de anastomoses em populações de *Colletotrichum lindemuthianum* provenientes de uma mesma planta. Já Freire et al. (2005) determinaram grupos de anastomoses entre isolados de raças diferentes. Em ambos os trabalhos, foi apresentada a formação de agrupamentos de acordo com a capacidade de formar anastomoses entre os diferentes isolados. A fusão de hifas é um pré-requisito para a compatibilidade vegetativa e conseqüente formação do heterocáριο para a ocorrência do ciclo parassexual.

Diante do exposto, fica evidente que o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes vai depender do entendimento do nível de variabilidade dentro de raças, para que se possam adotar melhores estratégias que permitam ampliar a durabilidade da resistência das cultivares de feijoeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a variação dentro da raça 65, por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e manutenção dos isolados de *C. lindemuthianum*

Foram utilizados 13 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Tabela 1) classificados como raça 65, sendo 11 provenientes da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças do Departamento de Biologia da UFLA e dois do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, CNPAF/EMBRAPA. Os isolados foram mantidos em meio de cultura M3 (Junqueira et al., 1984).

2.2 Anastomoses entre hifas

Os isolados (Tabela 1) foram confrontados dois a dois, segundo metodologia descrita por Rodríguez-Guerra et al. (2003) com modificações. Para isso, amostras de discos de 5mm de diâmetro dos isolados foram colocadas a uma distância de 5mm sobre uma lâmina esterelizada, contendo uma fina camada de meio M3, dentro de uma placa de Petri estéril com meio ágar-água (2%). Foram realizadas duas repetições. Após a incubação por 5 a 7 dias em BOD, a 22°C, 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 a lamínula e visualizada em microscópio de luz. As anastomoses foram classificadas como positivas, quando observou-se a fusão das hifas entre ambos os isolados.

TABELA 1 Descrição da raça, cultivar hospedeira, origem e ano de coleta dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Nº	Isolado	Raça	Cultivar	Procedência	Ano
1	LV 28	65	-	Lavras - MG	2001
2	LV 29	65	-	Lavras - MG	2001
3	LV 55	65	Olath Pinto	Ijaci - MG	2004
4	LV 57	65	Talismã	Lambari - MG	2004
5	LV 58	65	-	Nepomuceno - MG	2004
6	LV 59	65	Ouro Negro	Ijaci - MG	2004
7	LV 61	65	Olath Pinto	Ijaci - MG	2004
8	LV 73	65	OP-NS-331	Ijaci - MG	2004
9	LV 80	65	-	Lavras – MG	2005
10	LV 89	65	PitocoxOPS 16	Lambari- MG	2005
11	LV 90	65	OP-NS-331	Ijaci - MG	2006
12	CL 837*	65	Pérola	Buritis - MG	2000
13	CL 844*	65	Pérola	Buritis - MG	2000

(-) cultivar não identificada

(*) Isolados do CNPAF/EMBRAPA

2.3 Obtenção da massa micelial

Para obter a massa micelial, foram retirados pequenos discos de meio de cultura contendo o micélio do fungo. Estes fragmentos foram transferidos separadamente para erlenmeyers estéreis de 250 ml, contendo 125 ml de meio líquido M3S (Junqueira et al., 1984). Estes frascos foram mantidos a 22°C em incubadora (Shaker) com agitação, na rotação de 110 rpm, até se obter micélio

abundante de cor clara, após aproximadamente 10 dias. Obtida a massa micelial, foi retirada a umidade utilizando-se uma bomba de vácuo, para posterior extração de DNA.

2.4 Extração de DNA

A extração foi realizada de acordo com metodologia descrita por Silva (2004). Consistiu na transferência da massa micelial para um almofariz de porcelana e maceração em 10 ml de tampão de extração (100 mM de TRIS pH 8.0, 20mM de EDTA pH 8.0, 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona – PVP) contendo 2% de CTAB a 65°C, mais 30µl de β-mercaptoetanol, com auxílio de areia esterilizada e nitrogênio líquido. O macerado foi mantido em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos e logo após, resfriados em água corrente durante 5 minutos. Foram adicionados 10 ml de solução clorofórmio:álcool isoamil (24:1), homogeneizado gentilmente e centrifugado durante 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi coletado e foram misturados 30 ml de uma solução de álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e levado a ao freezer (-20°C) por seis horas, no mínimo. O ácido nucléico precipitado foi seco e foram adicionados 300µl de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM pH 7,7).

Uma segunda extração foi realizada com clorofórmio/álcool isoamil e o sobrenadante coletado foi misturado com o triplo do volume de álcool a 95%:acetato de amônio 3M (20:1) e mantido no freezer por no mínimo, seis horas. Eliminou-se a solução de álcool acetato de sódio e dissolveu-se o DNA em 50-100µl de TE. Após este processo, o material foi quantificado, utilizando-se um fluorímetro Hoefffer Scientific TKO 100. Para isso, foram utilizados 2 µl da solução de DNA em 2 ml de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1 mM e NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1µl.ml⁻¹ do corante H32258. As amostras

foram diluídas em TE para uma concentração de 10ng.ml^{-1} para as reações de RAPD.

2.5 Reação RAPD

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica RAPD, segundo metodologia de Silva (2004), com modificações. Cada reação de amplificação de 12 μl continha 1,84 μl de água, 3,0 μl de DNA (10ng.ml^{-1}), 0,66 μl de dNTP (mistura equitativa de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3 μl (1,0 mM) de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1,0 μl de tampão de reação e 0,6 unidades da enzima Taq polimerase. Foram testados 67 *primers*. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. Cada ciclo de amplificação correspondeu a: desnaturação a 94°C por dois minutos, o anelamento a 42°C por 30 segundos e a elongação a 72°C por 30 segundos. Após os 45 ciclos, procedeu a extensão final por dois minutos a 72°C.

2.6 Eletroforese em gel

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,45 M de tris-borato, 0,01 M de EDTA pH 8.0) a 80 volts, durante 3,5 horas. Em seguida, foram tratados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e visualizados em transluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados em câmara fotográfica EDA – 290 da Kodak.

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos da formação de anastomoses e RAPD foram submetidos à análise de similaridade e agrupamento, utilizando-se o programa NTSYS – pc 2.1 (Rohlf, 2000). Para o experimento de anastomoses, foi

construída uma matriz de 0 e 1 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 e Rao (1940) por meio da expressão $sg_{ij} = a / a + b + c + d$, sendo a compatibilidade para ambos os isolados i e j , b compatível apenas para o isolado i , c apenas no isolado j e d incompatível para ambos isolados i e j . O dendograma foi obtido por meio de análises de agrupamento de similaridades, utilizando o método da média das similaridades (UPGMA). Os erros associados a cada similaridade foram estimados utilizando-se a expressão $s_{sg} = \{sg_{ij} [(1-sg_{ij})/(n-1)]\}^{0,5}$, em que n é a soma de a , b , c e d para cada par de isolados. Os isolados pertencentes a diferentes grupos de anastomoses foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste de t , utilizando a expressão $sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$, em que t é o valor tabelado da distribuição de t de Student a 1% de probabilidade com $n-2$ graus de liberdade e \bar{s}_{sg} o erro médio das comparações consideradas no dendograma.

Os dados de RAPD foram analisados como descrito por Silva (2004). Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas presentes nas 13 amostras. As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de isolados, foram obtidas pelo coeficiente de Sorensen-Dice, por meio da expressão $sg_{ij} = 2a / 2a + b + c$, sendo a presença da banda em ambos os isolados i e j , b presença da banda apenas no isolado i , e c apenas no isolado j . As análises de similaridade genética e as estimativas dos erros associados a cada similaridade (s_{sg}) e do valor máximo significativo de similaridade (sg_m) foram realizadas como descrito anteriormente, tendo, na expressão $s_{sg} = \{sg_{ij} [(1-sg_{ij})/(n-1)]\}^{0,5}$, o n sido a soma de a , b , e c para cada par de isolados.

3 RESULTADOS

3.1 Análises das anastomoses

Os isolados foram considerados compatíveis quando houve a formação de anastomoses entre hifas de isolados diferentes (Figura 1). Pelos dados da Tabela 2 podem-se observar as reações de compatibilidade, ou seja, fusão de hifas entre os isolados estudados. Foram estimadas as proporções de reações compatíveis para cada isolado (Tabela 2), tendo o isolado LV 61 apresentado 100% de compatibilidade com os outros isolados. Já o isolado LV 28 foi o que apresentou menor porcentagem de reações compatíveis, correspondendo a apenas 38,46%.

Visando obter os grupos de anastomoses, foram estimadas as similaridades pelo coeficiente de Russel e Rao. As estimativas variaram de 0,28 a 0,85. A linha de corte que representa o valor máximo de similaridade (sg_m) acima do qual os isolados são considerados semelhantes a 1% de probabilidade pelo teste de t, foi de 0,71. A partir do dendograma obtido pela análise de agrupamento (Figura 3), pôde-se visualizar 11 grupos de anastomoses diferentes, sendo que apenas os isolados LV 61, LV 73 e LV58 foram semelhantes quanto a formação de anastomoses e pertencentes a um mesmo grupo.

Pode-se observar uma associação entre as proporções de reações compatíveis e o agrupamento formado, pois esses isolados foram os que apresentaram maior porcentagem de reações compatíveis. Os outros grupos foram constituídos de apenas um isolado, tendo o isolado LV 28 sido o menos similar, apresentando um coeficiente de similaridade de apenas 0,28 com os outros isolados e também a menor porcentagem de reações compatíveis.

3.2 Análises RAPD

Dos 67 *primers* utilizados, 24 exibiram polimorfismo, amplificando um total de 83 bandas polimórficas, gerando em média 3,4 bandas polimórficas por *primer*. A Figura 2 ilustra o perfil de amplificação do *primer* OPBB-10. Com base nas 83 bandas polimórficas foi construída uma matriz de similaridade genética, e utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice, obtêve-se as estimativas das similaridades genéticas que variaram de 0,54 a 0,82. Para melhor visualização, foi construído um dendograma (Figura 4). A linha de corte, dada pela estimativa de sg_m a 1% de probabilidade pelo teste de t foi de 0,79. Pela análise do dendograma foi possível verificar a formação de 11 grupos. Apenas 2 grupos continham dois isolados considerados geneticamente semelhantes, o grupo III (LV 57 e LV 58) e o grupo V (LV 59 e LV 73), evidenciando a elevada variabilidade genotípica dentro da raça 65.

TABELA 2 Reações de compatibilidade (anastomoses entre hifas) entre os isolados da raça 65 estudados e a proporção de reações compatíveis (%) para cada isolado

	LV 28	LV 29	LV 55	LV 57	LV 58	LV 59	LV 61	LV 73	CI 837	CI 844	LV 80	LV 89	LV 90	%
LV 28	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	38,5
LV 29		+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	69,2
LV 55			+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	69,2
LV 57				+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	76,9
LV 58					+	+	+	+	+	-	-	+	+	76,9
LV 59						+	+	+	-	-	-	-	+	46,2
LV 61							+	+	+	+	+	+	+	100
LV 73								+	-	-	+	+	+	84,6
CI 837									+	+	-	-	-	53,9
CI 844										+	+	-	+	61,5
LV 80											+	+	+	69,2
LV 89												+	+	53,9
LV 90													+	76,9

+ compatível; - incompatível.

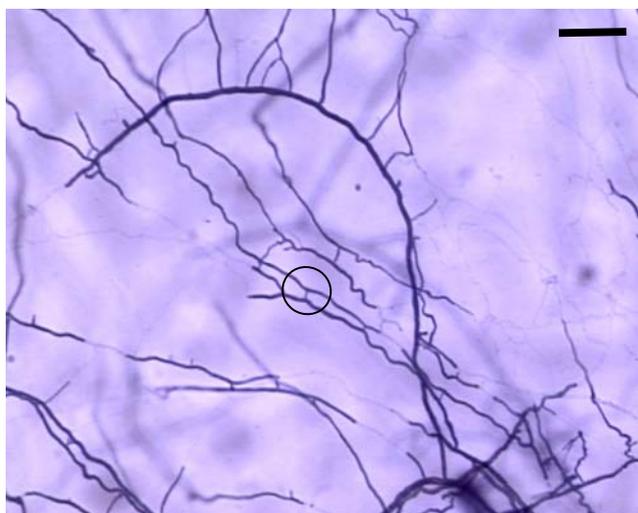


FIGURA 1 Anastomoses em H entre hifas dos isolados LV 28 e CL 844.
Barra: 20 μ m

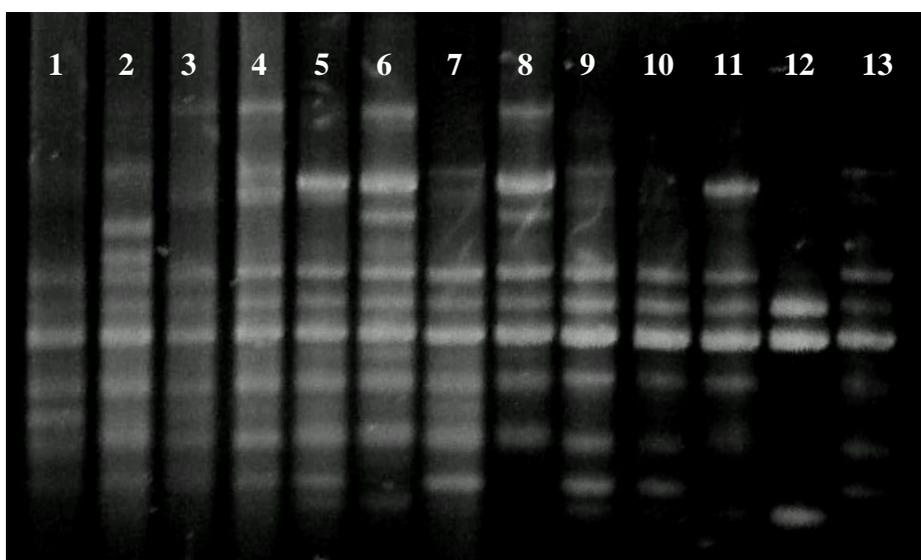


FIGURA 2 Padrão de bandas RAPD com o *primer* OPBB-10. As linhas de 1 a 13 correspondem aos produtos da amplificação dos 13 isolados de *C. lindemuthianum*.

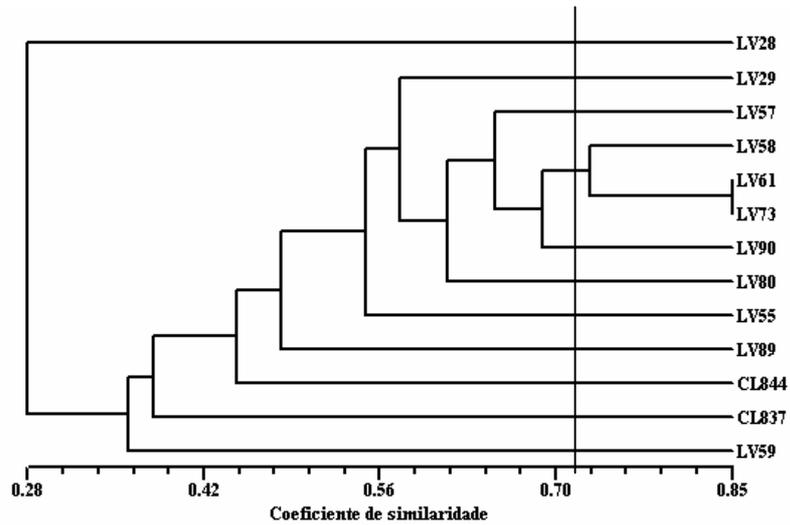


FIGURA 3 Dendrograma de similaridade para a formação de anastomoses entre os 13 isolados de *C. lindemuthianum* pertencentes à raça 65

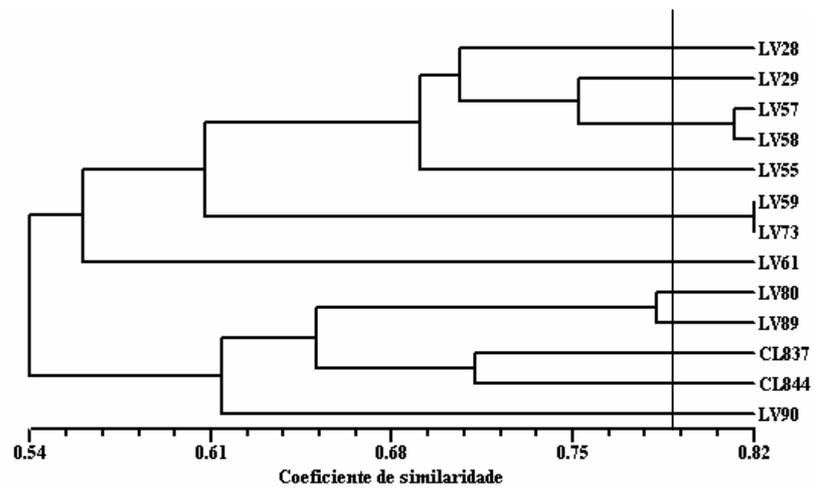


FIGURA 4 Dendrograma de similaridade genética dos 13 isolados de *C. lindemuthianum* pertencentes à raça 65, baseada no RAPD

4 DISCUSSÃO

As análises dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, tanto para formação de anastomoses quanto para as análises de RAPD, demonstraram a grande variabilidade existente dentro da raça 65.

Davide (2006) comprovou a variabilidade patogênica dentro da raça 65 inoculando diferentes isolados desta raça (LV 29, LV 57, LV 58, LV 61, CL 837 e CL 844), nas doze cultivares diferenciadoras e em cultivares comerciais. Tanto nas cultivares diferenciadoras quanto nas cultivares comerciais, os isolados CL 844 e CL 837 foram os mais agressivos. Além disso, neste trabalho, pôde-se verificar que as cultivares Valente, Talismã, OP NS 331 e VC3 apresentavam-se tanto como resistentes quanto como suscetíveis à raça 65, dependendo do isolado inoculado. Isso dificulta a obtenção de linhagens resistentes, pois, normalmente, são realizadas inoculações artificiais utilizando-se apenas um isolado por raça e a existência de variação dentro da raça faz com que os alelos de resistência incorporados não tenham um amplo espectro que cubra toda variabilidade presente dentro de raça.

A variação dentro da raça utilizando marcadores moleculares foi observada por Alzate-Marin (2001), Balardin (1999), Otoyá (1995) e Silva (2004). Nesses trabalhos, foram utilizadas raças diferentes e também vários isolados de uma mesma raça que, geralmente, agrupavam em diferentes grupos de similaridade genética, indicando a existência da variabilidade dentro de raça.

O resultado obtido pela análise de similaridade dos isolados avaliados neste estudo, utilizando os marcadores RAPD, comprovam esta ampla variabilidade, já que foram obtidos 11 grupos diferentes e as estimativas variaram de 0,54 a 0,82. Os isolados utilizados por Davide (2006), que apresentavam diferenças quanto à patogenicidade em cultivares comerciais,

também mostraram-se geneticamente diferentes. Analisando-se o dendograma de similaridade genética (Figura 4), pode-se observar que os isolados pertencentes ao grupo III (LV 57 e LV 58) foram coletados em diferentes locais, Lambari e Nepomuceno, respectivamente, no mesmo ano (2004). Já os isolados do grupo V (LV 59 e LV 73) foram coletados no mesmo local (Ijaci), porém, eram provenientes de hospedeiros diferentes (Ouro Negro e OP NS 331), assim como o isolado LV 61, que também foi coletado em Ijaci, na mesma época, porém, em outra cultivar hospedeira (Olath Pinto) e não agrupou com os isolados do grupo V. Os isolados CL 837 e CL 844, que foram coletados em um mesmo local, Buritis, e em um mesmo hospedeiro, cultivar Pérola, apresentaram similaridade de 0,71, pertencendo a grupos diferentes. Estes resultados evidenciam o não agrupamento de acordo com o hospedeiro e a região de coleta e que estes isolados possuem genótipos diferentes. Vários trabalhos permitem a observação de uma tendência de agrupamentos por região de origem (González et al., 1998; Sicard et al., 1997 e Silva, 2004). Já Mahuku & Riascos (2004) obtiveram resultados em que não houve uma separação dos grupos de acordo com o pool gênico do hospedeiro ou região geográfica, o que está de acordo com os resultados obtidos por Balardin et al. (1997b; 1999) e Fabre et al. (1995).

Com base nos resultados dos agrupamentos utilizando as estimativas das similaridades para a formação de anastomoses, pode-se observar que apenas os isolados LV 58, LV 61 e LV 73 pertencem a um mesmo grupo de anastomose. No entanto, estes mesmos isolados pertencem a grupos diferentes quando analisados utilizando as estimativas de similaridade genética obtidas por meio dos marcadores RAPD. Portanto, esses indivíduos são geneticamente diferentes, mas têm a capacidade de formação da anastomose entre si, que é o primeiro passo para a ocorrência do ciclo parassexual. Segundo Hastie (1981), o ciclo parassexual é um mecanismo potencial para a recombinação genética em fungos, principalmente para os de reprodução assexuada. A fusão de hifas pode levar à

formação do heterocário e gerar a variação dentro da população deste patógeno, especialmente no caso dos isolados LV 61 e LV 73, que foram coletados em um mesmo local e na mesma época, porém, em hospedeiros diferentes.

Deve-se considerar que a formação de anastomoses depende de apenas alguns genes, enquanto a similaridade baseada no RAPD é uma estimativa de parentesco entre isolados com base em uma amostra ampla de DNA genômico. Daí a não associação entre esses resultados.

O elevado número de grupos de anastomoses dentro da raça 65 está de acordo com o que foi encontrado por Rodriguez-Guerra et al. (2003), que observaram uma baixa variabilidade da raça em diferentes isolados coletados de uma mesma planta, embora houvesse uma grande variação no número de grupos de anastomoses. Esses autores comentam que, em populações naturais, vários grupos de anastomoses podem ser identificados e sugerem que este pode ser um mecanismo que leve à formação de diferentes linhagens clonais de *C. lindemuthianum*. 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). Mas, se um isolado é capaz de formar anastomose com isolados de diferentes grupos de anastomose, este pode servir como uma “ponte”, permitindo a troca de informações entre dois grupos diferentes de anastomoses.

É importante salientar que a anastomose entre hifas é a primeira etapa para a formação dos grupos de compatibilidade vegetativa e para a obtenção do heterocário. Essa etapa inicial, denominada pré-fusão, está sob o controle de genes *hsi* da auto-incompatibilidade do heterocário. Vários outros genes podem estar envolvidos na incompatibilidade, como os genes *het*, que estão

relacionados à fusão, os genes *sup* (supressores), que modificam o sinal, e, finalmente, os genes apoptóticos que levam à morte celular (Leslie & Zeller, 1996). Portanto, os isolados pertencentes a um mesmo grupo de anastomose não necessariamente pertenceriam a um mesmo VCG e, conseqüentemente, podem ou não formar o heterocário. Isso depende dos vários genes que estão envolvidos no controle da incompatibilidade vegetativa.

Dessa forma, as análises utilizando marcadores moleculares RAPD e a formação de anastomoses entre hifas apresentaram-se como ferramentas potenciais para a compreensão da estrutura e da dinâmica populacional deste patógeno.

5 CONCLUSÕES

1. As análises de agrupamento utilizando marcadores RAPD e a formação de anastomoses foram eficientes para detectar as diferenças existentes dentro da raça 65.
2. Não houve concordância entre os agrupamentos obtidos por meio de marcadores RAPD e os grupos de anastomoses.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; MENU, H. M. R. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* do Sul e Alto Paranaíba de Minas Gerais. p. 45. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1993. p. 45.
- ALZATE-MARIN, A. L.; NIETSCH, S.; COSTA, M. R.; SOUZA, K. A.; SARTORATO, A. Análises do DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 197-203, abr./jun. 2001.
- ALZATE-MARIN, A. L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brasil. **Bean Improvement Cooperate**, Fort Collins, v. 47, p. 241-242, Mar. 2004.
- BALARDIN, R. S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 50-53, jan./mar. 1997a.
- 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. 1997b.
- BALARDIN, R. S.; SMITH, J. J.; KELLY, J. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycological Research**, New York, v. 103, n. 7, p. 841-848, July 1999.
- CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; POMPEU, A. S.; FRANCISCO, F. G.; RAVAGANINI, S.; ALMEIDA, A. L. L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 60-65, mar. 1999.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Programa de frijol**: informe anual de 1998. Cali, 1990. p. 128-129. (CIAT-Documento de trabajo, 72).
- DAVIDE, L. M. C. **Comprovação da variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum***. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado

em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FABRE, J. V.; JULIEN, J.; PARISOT, D.; DRON, M. Analysis of diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. **Mycological Research**, New York, v. 99, n. 4, p. 429-435, Apr. 1995.

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

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.

GONZÁLEZ, M. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 292-299, Apr. 1998.

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., SILVA, K. J. D.; SOUZA E. A., DAVIDE, L. M. C.; FREIRE, C. N. S. Levantamento de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA, 2005. p. 501-504.

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.

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.

OTOYA, M. M.; RESTREPO, S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Amplificación al azar del ADN polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia. **Fitopatología Colombiana**, Santa Fé del Bogotá, v. 19, n. 1, p. 7-14, 1995.

RAVA, A. C.; 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.

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.

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.

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.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Paseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 8, p. 807-813, Aug. 1997.

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.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.;
ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D. e; OLIVEIRA, F. A. de; Identificação de
raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados
provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa**
Phytopathologica, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 371-375, jul./set. 2004.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Matriz de 0 e 1, obtida pelos padrões de bandas RAPD dos 13 isolados.....	50
TABELA 2A	Matriz de 0 e 1, obtida pelas análises de compatibilidade de hifas dos 13 isolados..	52

TABELA 1A Matriz de 0 e 1, obtida pelos padrões de bandas RAPD dos 13 isolados avaliados.

Bandas*	LV28	LV29	LV55	LV57	LV58	LV59	LV61	LV73	LV80	LV89	LV90	CL837	CL844
AO7a	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	9	0
AO7b	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	9	1
AO7c	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	9	0
BB8a	1	1	1	9	1	0	0	0	0	1	1	1	1
BB8b	0	0	1	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0
L15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
BB10a	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
BB10b	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
BB10c	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
BB10d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
BB10e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
BB10f	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
BB10g	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
AR12a	0	0	0	0	9	0	0	1	1	1	1	0	0
AR12b	0	0	0	0	9	0	0	1	1	1	1	0	0
AR12c	1	0	1	1	9	0	0	1	1	1	1	1	1
AR12d	0	0	0	0	9	0	0	1	1	1	1	0	0
AR12e	1	0	0	1	9	0	0	0	1	1	0	0	0
AS03a	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
AS03b	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
AS03c	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
AS03d	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AS03e	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
AS03f	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
AS03g	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
AS03h	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
AS03i	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
AS02a	0	0	1	1	1	1	0	1	1	9	9	1	1
AS02b	1	0	0	0	0	1	0	1	1	9	9	1	1
AS02c	0	0	1	1	1	0	0	0	1	9	9	1	1
AS02d	1	0	0	0	0	0	1	0	1	9	9	1	0
AS02e	0	0	1	0	0	1	1	0	1	9	9	1	1
BB02a	1	1	1	1	1	1	1	0	9	1	1	1	1
BB03b	0	0	0	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0
BB07a	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
BB07b	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
BB07c	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
AR08a	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
AR08b	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AR11a	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
AR11b	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
AR11c	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
AR11d	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
AR11e	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

...CONTINUA...

TABELA 1 A, Cont.

Bandas*	LV28	LV29	LV55	LV57	LV58	LV59	LV61	LV73	LV80	LV89	LV90	CL837	CL844
AS19b	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
AR06a	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
AR06b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR06c	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR06d	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
AS06a	1	1	0	1	9	1	0	1	0	1	9	1	1
AS06b	1	1	0	1	9	1	0	1	1	1	9	0	0
AS06c	1	1	1	1	9	0	0	1	0	0	9	0	1
AS06d	0	0	0	1	9	1	0	1	0	1	9	1	0
AS06e	1	1	1	1	9	1	1	1	0	1	9	0	1
AS08a	1	1	1	0	1	9	1	1	1	0	0	1	1
AS08b	1	1	1	1	0	9	1	1	1	1	0	0	1
AS08c	0	0	0	0	1	9	1	1	1	0	0	1	0
AQ12b	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
AQ12a	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
M19	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
M20	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
BB09	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
BB16a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
BB16b	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
BB16c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BB16d	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
BB16e	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
BB16f	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
BB18a	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
BB18b	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
BB18c	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
BB18d	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
BB18e	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AT08a	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
AT08b	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
AT08c	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AT11	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
AT13a	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	9
AT13b	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	9
AT13c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	9
AT13d	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	9
AT13e	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	9

* cada banda é indicada pelo nome do *primer* seguida de um letra do alfabeto. A letra “a” corresponde à banda de maior tamanho e as demais letras, em ordem alfabética, indicam as bandas de tamanhos decrescentes.

TABELA 2 Matriz de 0 e 1, obtida pelas análises de compatibilidade de hifas dos 13 isolados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
3	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
4	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
6	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
9	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
10	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
11	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
12	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
13	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1