

**DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum*
NO BRASIL**

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

2004

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* NO BRASIL

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
2004

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

Silva, Kaesel Jackson Damasceno

Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil /
Kaesel Jackson Damasceno Silva. -- Lavras : UFLA, 2004.
88 p. : il.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Feijão. 2. Doença fungica. 3. Antracnose. 4. Variabilidade genética. 5.
Variabilidade patogênica. 6. Marcadores RAPD. 7. Cultivares
diferenciadoras. 8. AMOVA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65294

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA

DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* NO BRASIL

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 25 de junho de 2004

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

Prof. Dr. Eduardo Bearzoti

UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, proporcionando-me paz, segurança e fé, fortalecendo-me frente a todos os obstáculos da vida.

À minha família, em especial à minha querida mamãe, **Rosiana Pereira Damasceno** e às minhas irmãs,

Karine Gisele e Katherine Gemma.

A meus avós, **Antonio Gomes Damasceno** (in memoriam) e **Maria Benedita Pereira Damasceno.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o que há de mais belo neste mundo, a vida.

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.

À Embrapa Arroz e Feijão, especialmente ao Pesquisador Dr. Aluizio Sartorato, por ter concedido material genético para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Elaine Aparecida de Souza, orientadora, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e pela confiança em mim depositada, além da valiosa contribuição no processo de seleção para o Doutorado.

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos, pelas importantes contribuições dadas à execução deste trabalho, além da disponibilidade para atender-me quando as dúvidas surgiam e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso. Agradeço também pela participação na banca examinadora deste trabalho.

Ao Professor Dr. Eduardo Bearzoti, pela disponibilidade de participação na banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas sugestões para a melhoria deste.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do curso de Genética e

Melhoramento de Plantas: César Brasil, Magno Ramalho, Lisete Davide, e Samuel, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À Professora Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes (UFPI), por abrir as portas para essa longa jornada, além da grande amizade e por estar presente nos momentos mais difíceis desta caminhada.

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

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

Ao Lamartine que, além da amizade, transmitiu-me seus conhecimentos práticos, a partir dos quais foi possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial à Elaine.

Aos companheiros do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças/UFLA: Francine, Marciane, Viviane e Osnil.

A todos os amigos do GEN.

Aos amigos de república: Airton, Breno, Cristóvão Eduardo Lambert, Vladimir e João Luís pela convivência e amizade.

Aos amigos, Ednaldo, Karlison e Welton pelo apoio moral e a grande amizade ao longo de muitos anos.

À Jacqueline, por ser uma grande companheira durante os momentos de vitórias e derrotas.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Referencial Teórico | 2 |
| 2.1 Antracnose do feijoeiro | 2 |
| 2.2 Variabilidade patogênica de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 4 |
| 2.3 Marcadores genéticos..... | 14 |
| 2.4 Marcadores de DNA | 15 |
| 2.5 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos | 17 |
| 2.6 Estrutura genética de populações | 24 |
| 2.7 Análises multidimensionais | 25 |
| 2.7.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade | 25 |
| 2.7.2 Análises de agrupamento | 27 |
| 2.7.3 Análise de componentes principais | 28 |
| 3 Material e Métodos | 30 |
| 3.1 Origem, cultivo e esporulação dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i> | 30 |
| 3.2 Caracterização das raças de <i>C. lindemuthianum</i> | 33 |
| 3.3 Obtenção de massa micelial | 35 |
| 3.4 Extração de DNA total | 35 |
| 3.5 Reação RAPD | 36 |
| 3.6 Estimativa das similaridades genéticas | 37 |
| 3.7 Análise de componentes principais | 39 |
| 3.8 Análise de variância molecular | 39 |
| 4 Resultados e Discussão | 41 |
| 4.1 Identificação de raças de <i>C. lindemuthianum</i> | 41 |
| 4.2 Avaliação por marcadores RAPD | 50 |
| 4.2.1 Avaliação da variabilidade genética..... | 51 |
| 4.2.2 Diversidade genética | 61 |
| 4.2.3 Análise de variância molecular | 63 |
| 5 Conclusões | 66 |
| 6 Referências Bibliográficas | 67 |
| ANEXOS | 79 |

RESUMO

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**: UFLA, 2004. 86p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas)*

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é responsável por prejuízos expressivos à cultura do feijoeiro. Seu controle é dificultado pela elevada capacidade de variação patogênica. Este trabalho teve por objetivo estudar a distribuição de isolados do fungo *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil e verificar se a maior variabilidade do patógeno é devido a diferenças entre ou dentro de raças, utilizando cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD. Para este trabalho, foram selecionados 88 isolados de *C. lindemuthianum* provenientes das micotecas do Departamento de Biologia da UFLA e do CNPAF/EMBRAPA, os quais foram obtidos de diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil, com exceção da raça 2047, obtida da Costa Rica. Inicialmente foi realizada uma caracterização com base na inoculação em cultivares diferenciadoras. Para a análise com os dados de marcadores moleculares foram utilizados 14 *primers* de RAPD e dois *primers* de PCR. Os *primers* amplificaram um total de 64 bandas polimórficas, totalizando, em média, 4,4 bandas polimórficas por *primer*. As similaridades de Nei e Li foram calculadas e, a partir destas, foram feitas análises de agrupamento e construídos dois dendrogramas. Foi estimado o índice de Shannon para cada estado amostrado. Foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA), admitindo-se dois níveis de hierarquização, estados e raças. As raças 65, 81 e 73 foram as mais frequentes e de ocorrência na maioria das regiões produtoras de feijão. Foi constatado o aparecimento das raças 337 e 593, até então não relatadas na literatura. A similaridade genética entre os isolados variou de 0,65 a 0,99, com média de 0,85. As análises descritivas revelaram uma tendência de diferenciação das raças por estados de origem. A estimativa do índice de diversidade de Shannon revelou que o estado de Goiás apresenta maior diversidade genética, possivelmente devido à presença da raça 593, enquanto o estado do Rio Grande do Sul apresentou a menor diversidade genética. Não houve correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas obtidas por marcadores RAPD. Igualmente, não houve uma clara relação entre os locos amostrados por marcadores RAPD e a caracterização realizada por inoculação em cultivares diferenciadoras. A AMOVA demonstrou que 92,45% da variação está contida dentro de estados e 7,55% entre estados, demonstrando a existência de um grande intercâmbio de materiais genéticos dentro de estados. Considerando o estudo em nível de raça, constatou-se que a maior parte da variação foi encontrada dentro de raças (80,85%).

*Comitê de Orientação: Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza (Orientadora), Prof. Dr. João Bosco dos Santos (Co-orientador)

ABSTRACT

SILVA, Kaesel Jackson Damasceno e. **Distribution and characterization of isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil**: UFLA, 2004. 86p. (Dissertation – Master in Agronomy/Plant Genetics and Breeding) *

Colletotrichum lindemuthianum, the causal agent of anthracnose, is responsible for expressive damages to the common bean crop. The high pathogenic variability is the main problem for effective and long-term control. The aim of this work were to study the distribution of isolates of *C. lindemuthianum* originating from different regions of Brazil and to verify if the largest variability of the pathogen it is due to differences among or within races, using differential cultivars and RAPD markers. Eighty-eight isolates from common bean from different producing regions in Brazil, except for the race 2047, obtained from Costa Rica. Initially a characterization was carry out based on the inoculation of differential cultivars. Fourteen RAPD *primers* and two PCR *primers* were used in the molecular analysis. The *primers* amplified a total of 64 polymorphic bands, with average of 4.4 polymorphic bands per *primer*. Pairwise similarities of Nei and Li were calculated and two dendrograms were generated. The Shannon diversity index was estimated for each sampled state. An analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out, considering two hierarchization levels, states and races. The races 65, 81 and 73 were the most frequent, occurring in most of the common bean producing regions. The emergence of races 337 and 593 was verified. The genetic similarity among the isolates varied from 0.65 to 0.99, with average of 0.85. The descriptive analyses revealed a tendency of differentiation of races for origin areas. The Shannon diversity index revealed that the state of Goiás presents larger genetic diversity, possibly due to the presence of race 593, whereas the state of Rio Grande do Sul presents the smallest genetic diversity. There was no correlation between the geographical distances and genetic similarities obtained by RAPD markers. No correlation was observed between the RAPD markers and the characterization accomplished by inoculation with differential cultivars. AMOVA demonstrated that 92.45% of the variation was contained within states and 7.55% among states, showing the existence of a great exchange of genetic materials within states. At the race level most of the variation (80.85%) was observed within races.

*Guidance Committee: Dra. Elaine Aparecida de Souza (Major Professor), Dr. João Bosco dos Santos

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produção do feijoeiro, a ocorrência de patógenos é a que mais se destaca. O fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é um dos fitopatógenos de maior ocorrência e responsável por prejuízos expressivos à cultura. A antracnose pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores cultivar suscetível, ambiente favorável ao patógeno e sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo.

Entre as medidas de controle desse patógeno, destacam-se: o uso de sementes certificadas, a rotação de culturas, o controle químico e a resistência genética, sendo esta última a mais eficaz, por minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. O emprego da resistência genética para a produção de germoplasma comercial tem sido dificultado pela elevada capacidade de variação patogênica que este fungo apresenta, reduzindo a vida útil de uma cultivar.

Estudos associando o uso das cultivares diferenciadoras à análise de DNA por meio de marcas moleculares têm revelado a existência de um nível de variabilidade surpreendente em campos de produção de feijão em regiões distintas. Tendo em vista o aparecimento constante de novas raças que têm a capacidade de “quebrar” a resistência de cultivares de feijoeiro utilizadas nos programas de melhoramento, uma alternativa viável para orientar a melhor utilização da área é o monitoramento constante da variabilidade populacional, rotação de culturas e ou o uso de cultivares resistentes às raças prevalentes.

Portanto, este trabalho teve por objetivo estudar a distribuição de isolados do fungo *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil e verificar se a maior variabilidade do patógeno deve-se a diferenças entre ou dentro de raças, utilizando cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antracnose do feijoeiro

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro, que pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores cultivar suscetível, ambiente favorável ao patógeno e sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo (Zaumeyer & Thomas, 1957; Rava et al., 1994; González et al., 1998). Esta doença também deprecia a qualidade do produto por provocar manchas no grão, tornando-o indesejável para o consumo (Chaves, 1980).

O agente causal da antracnose é conhecido por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., que foi descrito originalmente por Saccardo & Magnus, em 1878, como *Gloeosporium lindemuthianum* (Bailey & Jeger, 1992), em material coletado por Lindemuth, em Bonn, Alemanha. Posteriormente, Scribner, ao verificar a presença de setas, que são estruturas filamentosas produzidas entre os conidióforos e as margens dos acérvulos, o transferiu para o gênero *Colletotrichum*. Este fungo pertence à classe dos Deuteromicetos e à ordem Melanconiales (Cardoso, 1978; Rava et al., 1994), apresentando duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita.

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* se reproduz assexuadamente produzindo os conídios ou esporos assexuais, num corpo de frutificação chamado acérvulo (Taber & Taber, 1974; Sutton, 1992). Na fase assexuada, o fungo apresenta micélio septado e ramificado, e sua coloração, à medida que envelhece, varia de hialina à quase negra (Walker, 1959). Em estado sexual, é conhecido como *Glomerella cingulata* (Stonem Spauld & V. Schrenk f.sp. *phaseoli*), pertencente à classe dos Ascomicetos e à ordem Diaportales, sendo

inicialmente denominado *Glomerella lindemuthianum* Briosi & Cav. Nesta fase o fungo produz peritécio e ascos, dentro dos quais originam-se os esporos, denominados de ascósporos (Kimati, 1980).

O patógeno sobrevive de uma estação a outra, ou de um cultivo a outro, como micélio dormente no interior do tegumento da semente nas células dos cotilédones ou em restos culturais, na forma de esporos. A transmissão a longa distância é realizada pela semente contaminada e a curta distância, pelos respingos da água de chuva, insetos, animais, homens e implementos agrícolas (Vieira et al., 1993). O fungo desenvolve-se principalmente em regiões tropicais onde as temperaturas variam entre 13°C e 27°C e alta umidade relativa (Kimati, 1980).

Os sintomas de antracnose aparecem em todos os órgãos aéreos da planta e raramente nas raízes. As lesões podem aparecer no hipocótilo, pecíolo, caule, nas folhas, vagens (sintomas mais típicos) e sementes (Kimati, 1980). Quando a fonte de infecção é a semente, os primeiros sintomas aparecem nas folhas cotiledonares ou nos cotilédones, como lesões necróticas. A infecção pode ocorrer também nas hastes da folha, enfraquecendo-a a tal ponto que a folha dobra-se no sítio da lesão. As lesões foliares ocorrem, inicialmente, na parte inferior das folhas e na extensão das nervuras principais, na forma de pequenas manchas de cor vermelho-alaranjado à púrpura, tornando-se, posteriormente, de cor escura. Nas vagens, as lesões coloridas apresentam-se como cancrios deprimidos delimitados por um anel preto com borda laranja-avermelhado (Pastor-Corrales & Tu, 1989).

Têm sido desenvolvidas várias estratégias para tornar eficaz o controle da antracnose e, entre elas, salientam-se o uso de sementes sadias (livres do patógeno), a rotação de culturas, principalmente com o milho, podendo resultar na redução da quantidade inicial de inóculo (Zaumeyer & Thomas, 1957; González et al., 1998) e o uso de cultivares resistentes.

A antracnose tem distribuição ampla, ocorrendo em diversos países do mundo, onde provoca prejuízos de ordem econômica, tais como o México (Crispín-Medina & Campos-Ávila, 1976), Costa Rica, Guatemala, Colômbia, Venezuela (Echandi, 1976), Canadá (Tu, 1981) e Nicarágua (Rava et al., 1993). No Brasil ocorre na maioria dos estados produtores, sobretudo em Minas Gerais (Peloso, 1992), Paraná (Menezes, Mohan & Bianchini, 1982), Rio Grande do Sul (Balardin, 1997) e outros.

2.2 Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *C. lindemuthianum* possui ampla diversidade de virulência, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética. Esta ampla variabilidade torna essencial o monitoramento constante deste patógeno, para que sejam descobertas novas fontes de resistência ao patógeno e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de novas cultivares resistentes de feijão, com o fim de controlar a doença (Rava et al., 1994). Pastor-Corrales et al. (1994) mencionam que tal diversidade é função da coevolução patógeno x hospedeiro.

O primeiro relato a respeito da variabilidade de *C. lindemuthianum* foi feito por Barrus (1911, 1918) ao observar que cultivares de feijão se comportaram de formas diferentes quando inoculadas com isolados de diferentes procedências, denotando a existência de duas raças distintas do patógeno, as quais foram denominadas de Alfa e Beta. Estudos efetuados posteriormente tornaram possível a identificação de outras raças. Em 1923, Burkholder identificou uma terceira raça, a qual foi denominada raça Gama. Schreiber (1932) identificou também as três raças, Alfa, Beta e Gama, ao passo que Andrus & Wade (1942), citados por Walker (1969), relataram a ocorrência de uma quarta raça descoberta na Carolina do Norte, a raça Delta.

No México, Yerkes Jr. & Ortiz (1956) mencionaram a ocorrência de dez raças denominadas de MA – 1 a MA – 10; estas foram divididas em três grupos de reação, denominados grupos Mexicanos I, II e III, com base no caráter patogenicidade, por meio da reação de três cultivares diferenciadoras americanas e cinco mexicanas. Posteriormente, Yerkes Jr. (1958) identificou as raças MA – 11, MA – 12 e MA – 13, pertencentes ao grupo Alfa. No Brasil, o primeiro estudo para identificação de raças em *C. lindemuthianum* foi realizado em 1966, por Kimati, a partir de isolados de São Paulo, no qual foram identificadas duas raças pertencentes aos grupos Alfa Mexicano II e Delta. Para este estudo foram utilizadas como diferenciadoras as cultivares Michelite, Dark Red Kidney e Perry Marrow. A partir de isolados coletados no Rio Grande do Sul, nas safras de 1965 e 1966, foram identificadas as raças Alfa e Beta (Augustin & Costa, 1971). As raças Brasileiro I, Mexicano I, Alfa (70% de frequência) e Beta foram encontradas em isolados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina; a raça Gama em isolados de Santa Catarina (Oliveira et al., 1973) e o grupo Brasileiro II, em Minas Gerais (Oliari et al., 1973).

Oliari et al. (1973), utilizando isolados de Minas Gerais, subdividiram os grupos Alfa, Mexicano II, Brasileiro I e Brasileiro II em sete raças, denominadas BA 1 a BA 7, usando como diferenciadoras as cultivares Michelite, Dark Red Kidney, Perry Marrow, Emerson 847, *Phaseolus aborigineus* 283 e Costa Rica 1031. Paradelo Filho & Pompeu (1975) registraram a ocorrência dos grupos Brasileiro I e Alfa em um levantamento realizado em diferentes regiões do estado de São Paulo. Em 1977, duas raças que ainda não tinham sido encontradas na natureza foram identificadas em Ebnet na Alemanha e foram posteriormente denominadas de Capa (Kruger et al., 1977) e Iota (Hubbeling, 1977). Fouilloux (1976) identificou, na França, a primeira raça com a capacidade de “quebrar” a resistência da cultivar Cornell 49-242, devido ao gene ARE; essa raça foi denominada de Alfa-Brasil. Pio Ribeiro & Chaves (1975),

trabalhando com isolados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, identificaram no Paraná, as raças BA 8 (grupo Mex II), BA 9 (grupo Mex I) e BA 10 (grupo Delta).

Menezes et al. (1982) identificaram as raças Alfa, Delta, Epsilon, Capa e Lambda, e um isolado que quebrou a resistência da variedade TO, posteriormente denominado como raça Zeta (Menezes, 1985), enquanto Menezes & Dianese (1988) fizeram menção à ocorrência das raças Alfa, Epsilon e Eta, pertencentes ao grupo Alfa, além de Delta, Mu, Teta, Lambda e Capa, pertencentes ao grupo Delta. Dudienas & Pompeu (1985) relataram a ocorrência de uma raça denominada Sigma.

Bolaños (1984), trabalhando com quinze isolados no CIAT, provenientes do México, verificou que estes foram virulentos a fontes de resistência importantes do México, tais como as cultivares TO, TU, PI 207262, México 222, AB 136, Evoluite e BAT 841.

Menezes & Dianese (1988) relataram que a cultivar México 222 foi suscetível a apenas 8,96% dos 201 isolados testados. Esta cultivar possui o gene Mex. 1a, que confere resistência a várias raças, incluindo algumas altamente virulentas, como a Capa (Fouilloux, 1976).

Os resultados dos diversos trabalhos realizados demonstram que o *C. lindemuthianum* possui ampla variabilidade patogênica, tanto entre quanto dentro de uma localidade, sendo indispensável a utilização de uma metodologia padrão para a identificação e denominação de raças. Após esta revisão, depreende-se claramente que até meados da década de 1970, havia uma enorme preocupação em tentar padronizar o uso das cultivares diferenciadoras para: comparar resultados de avaliação de cultivares de diferentes regiões, facilitar a permuta de fontes de resistência e verificar a real dinâmica populacional do patógeno o que, até então, eram dificultado por esta falta de padronização. Com o objetivo de decompor este problema, Pio-Ribeiro & Chaves (1975)

propuseram um sistema de identificação de raças fisiológicas, baseado na definição de uma série de cultivares diferenciadoras que poderiam ser utilizadas internacionalmente.

Habgood (1970), também buscando minimizar este problema, apresentou uma proposta para designação de raças fisiológicas, que consiste na utilização de um grupo de cultivares diferenciadoras em uma ordem preestabelecida, utilizando um método binário e obtido por expansão binomial, de tal forma que o nome da raça é um número. No caso de *C. lindemuthianum*, foram recomendadas doze cultivares diferenciadoras pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em 1990. Esse sistema, combinado com as duas classes de resposta à infecção (resistência ou suscetibilidade), permite classificar um total de $2^n = 2^{12} = 4096$ raças, em que “n” é o número de linhagens diferenciadoras. O Quadro 1 mostra as doze cultivares diferenciadoras, dispostas de A a L, os seus respectivos valores binários e um exemplo hipotético de como classificar um isolado numa dada raça. Nesse exemplo, foi considerado o isolado 337, valor esse que corresponde ao somatório dos valores binários referente às cultivares com as quais o isolado apresentou reação de compatibilidade (1 + 16 + 64 + 256).

Este sistema de identificação de raças proposto pelo CIAT (1990) foi adotado por vários pesquisadores. Os resultados obtidos a partir do uso desta metodologia, internacionalmente reconhecida, denotaram grande variabilidade de *C. lindemuthianum* e, conseqüentemente, facilitou-se o intercâmbio de materiais genéticos.

Abreu et al. (1993) observaram a predominância de três raças (raça 81, 89 e 119), nas regiões do Alto Paranaíba e Sul de Minas Gerais. Rava et al. (1993) verificaram a presença das raças 713, 649, 1609, 1737, 1608, 1545 e 1865, na Nicarágua. Neste levantamento, todos os isolados foram virulentos à cultivar TU e à Cornell 49-242. Este resultado mostra o quão importante é a

QUADRO 1 Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro para a caracterização de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum*, seus valores binários.

| | Cultivares diferenciadoras | Série binomial | Valor binário | Reação |
|------|-----------------------------|-----------------|---------------|--------|
| A | Michelite ^b | 2 ⁰ | 1 | S |
| B | MDRK ^a | 2 ¹ | 2 | R |
| C | Perry Marrow ^a | 2 ² | 4 | R |
| D | Cornell 49-242 ^b | 2 ³ | 8 | R |
| E | Widusa ^b | 2 ⁴ | 16 | S |
| F | Kaboon ^a | 2 ⁵ | 32 | R |
| G | México 222 ^b | 2 ⁶ | 64 | S |
| H | PI 207262 ^b | 2 ⁷ | 128 | R |
| I | TO ^b | 2 ⁸ | 256 | S |
| J | TU ^b | 2 ⁹ | 512 | R |
| K | AB 136 ^b | 2 ¹⁰ | 1024 | R |
| L | G 2333 ^b | 2 ¹¹ | 2048 | R |
| Raça | | | 337* | |

Centros de Origem: ^a Andino; ^b Mesoamericano

*Exemplo hipotético

realização da inspeção de materiais antes de sua introdução em uma dada região, pois, até então, na literatura brasileira não foram encontrados relatos de raças com alta patogenicidade. Reação incompatível foi detectada entre as cultivares diferenciadoras Dark Red Kidney, Perry Marrow, Widusa, Kaboon e G2333 e todos os isolados testados.

Estudos realizados por Pastor-Corrales et al. (1994), no período de 1976 a 1993, utilizando um total de 380 isolados de *C. lindemuthianum*, oriundos de diferentes regiões geográficas do continente americano, constataram que somente a cultivar diferenciadora G2333 foi resistente a todos os isolados

ênfatizando a importância da utilização desta cultivar em programas de melhoramento, além de possuir outras qualidades, como grande adaptabilidade, elevada produção de sementes em muitos ambientes e tolerância a solos com baixa fertilidade. Entre as raças que foram encontradas, pode-se mencionar a raça 2047 (Costa Rica) que apresenta reação de compatibilidade com todas as diferenciadoras, exceto com a G2333.

Ravaet al. (1994), no período de 1989 a 1993, estudando isolados de *C. lindemuthianum* de diferentes regiões do Brasil, identificaram 25 raças pertencentes aos grupos Alfa, Delta, Gama, Mexicano I, Mexicano II e Brasileiro I. As raças 65 e 87 apresentaram a maior distribuição geográfica e foram encontradas em cinco e seis estados, respectivamente. Ressaltam estes autores ainda que a utilização freqüente de uma cultivar como fonte de resistência na genealogia das cultivares atualmente em uso deve ser bem avaliada, como é o caso da cultivar TU (alelo Mex.3), que apresentou reação compatível com a raça 585 identificada no Espírito Santo. Outro fato importante é que 94,07% dos isolados testados apresentaram compatibilidade com o alelo Mex. 1a, presente na cultivar México 222. Estes resultados contrastaram com os obtidos por Menezes & Dianese (1988), em que apenas 8,96% dos isolados testados apresentaram reação compatível, revelando a evolução na população do patógeno em direção à compatibilidade com o alelo Mex. 1a.

Balardin (1997) identificou oito raças de *C. lindemuthianum* (5, 17, 23, 31, 55, 65, 73 e 453) no período de 1988 a 1992, em nove regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul, onde as variedades diferenciadoras TU, AB 136 e G2333 apresentaram ampla resistência às raças fisiológicas encontradas. A raça 5 destacou-se como a mais freqüente. A raça 73, até aquele momento, não tinha sido encontrada no Rio Grande do Sul. Considerando o levantamento, foi indicado como estratégia para aumentar a durabilidade da resistência, o uso de pirâmide de genes. O autor adverte para o fato de que isolados de ocorrência

restrita devem ser apreciados pelos programas de melhoramento genético, pois poderão ter sua frequência intensificada.

Balardin et al. (1997), com o objetivo de verificar a diversidade de virulência e molecular, fizeram um levantamento de 138 isolados de *C. lindemuthianum* em seis países (Argentina, Brasil, República Dominicana, Honduras, México e Estados Unidos). Entre os isolados estudados foram caracterizadas 41 raças distintas, denominadas com base na inoculação dos isolados em conjunto de doze cultivares diferenciadoras. As raças 7, 65 e 73 foram as mais comuns (28%). A raça 7 foi encontrada somente uma vez na Argentina e no México, mas foi encontrada freqüentemente nos Estados Unidos. A raça 65 foi encontrada repetidamente no Brasil e Estados Unidos.

Sicard et al. (1997) estudaram a diversidade de virulência em três centros de diversidade de *P. vulgaris*. Neste estudo foram amostrados 128 isolados de *C. lindemuthianum* e identificadas, entre esses, 25 raças distintas. Na Argentina, as cultivares diferenciadoras mais suscetíveis foram: Perry Marrow e MDRK, cultivares de origem Andina. Já no México, as cultivares mais suscetíveis foram Cornell, México 222 e TO, todas de origem Mesoamericana. Além disso, foi observado que dez raças foram encontradas especificamente no México e treze na Argentina. Foram observados 44 isolados da raça 0 (principalmente no Equador), entre os 128 isolados estudados. A partir destes dados os autores sugeriram que as cultivares diferenciadoras não permitem uma descrição apropriada da diversidade de virulência no Equador. Atualmente, o conjunto de diferenciadoras não contém nenhuma cultivar de origem do Norte dos Andes. Verificaram ainda que todas as raças de origem mexicana, exceto uma, foram exclusivamente virulentas a cultivares de origem Mesoamericana. Embora as raças Argentinas tenham sido capazes de infectar tanto cultivares de origem Andina como Mesoamericana, elas foram mais freqüentes nas primeiras. Estes

resultados sugerem uma adaptação das raças mexicanas e argentinas para cultivares da mesma origem geográfica.

Estudos realizados por Balardin & Kelly (1998), em países da América do Sul, Central e do Norte, concluíram que a raça 73 tem se caracterizado como o isolado de *C. lindemuthianum* de mais ampla ocorrência, devendo converter-se em referencial quanto aos genes de resistência mínimos que devem estar presentes em uma cultivar de feijoeiro recomendada para estas regiões de produção.

González et al. (1998), estudando cinco regiões produtoras de feijão no México, observaram a ocorrência de dez raças de *C. lindemuthianum* (0, 8, 256, 264, 320, 384, 392, 448, 1088 e 1472). As raças 320 e 1472 foram encontradas exclusivamente em Zacatecas, a raça 1088 em Durango, a raça 384 em Jalisco e as raças 8 e 264 em Michiocán. É provável que as diferenças nas populações de patógenos reflita a diferença no germoplasma utilizado e as práticas culturais empregadas em cada região, ressaltando-se a viabilidade do melhoramento específico para cada região. Elevada variabilidade foi encontrada na região de Michiocán (cultivo de pequenas áreas em consórcio), onde foram identificados apenas seis isolados, entre os quais foram observadas seis raças distintas, enquanto que em Chihuahua (grande áreas e monocultura), onde apenas uma cultivar é plantada há vários anos, apenas uma raça foi encontrada.

No mesmo estudo foi observado, também, que somente cinco cultivares diferenciadoras (México 222, PI 207262, To, Cornell 49-242 e AB 136) foram infectadas, tendo México 222, PI 207262 e TO apresentado reação de compatibilidade mais freqüente. Além disso, os seus autores compilaram dados relativos a levantamentos realizados no México para verificar se esta ocorrência é generalizada, o que possibilitou a confirmação de que as cultivares México 222, PI 207262 e TO são as mais suscetíveis naquele país. A infecção preferencial nestas três diferenciadoras reflete a adaptação do patógeno dentro

do México para superar alelos de resistência que são comumente encontrados neste país. Neste trabalho ficou evidenciada também a coevolução patógeno-hospedeiro, visto que nenhum dos isolados infectou cultivares Andinas: MDRK, Perry Marrow e Kaboon (América do Sul), tendo todos sido encontrados em cultivares Mesoamericanas (México e América Central). Foi gerada também uma importante informação para os melhoristas, pois as cultivares Widusa, TU (Co 5) e G2333 (Co 4², Co 5 e Co 7) não foram infectadas, o que ressalta a importância da obtenção de cultivares com estes alelos de resistência, além da possibilidade de sucesso da combinação com linhagens de origem Andina, podendo assim obter resistência efetiva a *C. lindemuthianum*.

Estudos realizados por Somavilla & Prestes (1999) relataram ocorrência de onze raças de *C. lindemuthianum* (5, 23, 64, 65, 67, 73, 81, 83, 87, 89 e 321), com base em um levantamento realizado em oito regiões produtoras de feijão no Rio Grande do Sul. Pela primeira vez, foi mencionada a ocorrência da raça 321, sendo 81 e 65 as mais frequentes, na proporção de 39% e 23%, respectivamente. Naquela ocasião, as raças 67 e 83 ainda não tinham sido identificadas no estado. Um aumento na frequência da raça 73, encontrada em três municípios do Rio Grande do Sul, foi evidenciado, comparado ao que havia sido identificado por Balardin (1997), que a encontrou em apenas um município (Santa Maria). A baixa frequência com que a raça 5 foi encontrada em relação à relatada por Balardin (1997) foi atribuída à redução no uso da cultivar Turrialba (suscetível), não mais recomendada no estado.

Carbonell et al. (1999) identificaram nove raças de *C. lindemuthianum* (23, 31, 65, 73, 81, 87, 89, 95 e 127) no estado de São Paulo, com predominância das raças 65, 81 e 89, de ocorrência frequente em todo o país. Isto deve-se principalmente ao livre comércio de grãos entre os estados, o qual facilita a disseminação dessas raças. Destas raças, apenas a 127 ainda não tinha sido relatada. É importante salientar que as cultivares TO, TU, AB136 e G2333,

muito utilizadas em programas de melhoramento, não tiveram a sua resistência “quebrada”. Observaram ainda que, das 17 cultivares recomendadas para aquele estado, apenas sete apresentaram resistência a todas as raças nele encontradas. Esses mesmos autores, ao inocularem três isolados da raça 81, dois isolados da raça 31 e dois isolados da raça 65 em um grande número de genótipos, atentaram para as diferenças dentro de raça, sugerindo que o grupo de cultivares diferenciadoras não é suficiente para a diferenciação da diversidade de patogenicidade dos isolados, devido a possíveis interações e combinações gênicas existentes entre os genes para resistência ao patógeno.

No estado do Paraná, trabalhos de identificação de raças de *C. lindemuthianum*, realizados por Thomazella et al. (2002) ressaltaram a ampla variabilidade do patógeno. Estes autores encontraram obtidos 18 isolados oriundos de diferentes regiões produtoras de feijão, dos quais foram identificados nove raças: 7, 31, 65, 69, 73, 81, 87, 89 e 95.

Talamini et al. (2002) ao estudarem a reação das cultivares diferenciadoras aos 17 isolados de *C. lindemuthianum* no estado de Minas Gerais, verificaram a ocorrência de quatro raças (8, 65, 81 e 87), sendo a 65 e a 81 as de maior frequência. As cultivares diferenciadoras TO, TU, AB136 e G2333 não foram suscetíveis a nenhum dos isolados avaliados. Ao confrontar este resultado com os obtidos por Abreu et al. (1993), sugere-se o desaparecimento das raças 89 e 119, demonstrando a importância da realização de levantamentos periódicos para o direcionamento dos programas de melhoramento e, assim, torná-los mais eficientes.

Levantamentos realizados por Sartorato (2002), em oito estados do Brasil, demonstraram a ocorrência de 26 raças de *C. lindemuthianum*, dentre as quais, naquele momento, onze (77, 85, 93, 96, 105, 109, 111, 123, 125, 127 e 193) ainda não haviam sido identificadas. As raças 65, 69, 73 e 81 foram as que

apresentaram a maior distribuição geográfica. A raça 73 foi mencionada como a mais freqüente.

Mahuku & Riascos (2004) ao realizarem um levantamento em vários países do mundo, identificaram 90 raças entre os 200 isolados amostrados, incluindo a ocorrência das raças 3481, 3545, 3977 e 3993. É possível observar, por meio deste levantamento, que todas as cultivares diferenciadoras, inclusive a G2333, já tiveram a sua resistência quebrada por isolados de *C. lindemuthianum*. Este fato evidencia que o uso de cultivares diferenciadoras não é eficiente para determinação da variabilidade patogênica.

Ao estudarem 43 isolados de *C. lindemuthianum*, Talamini et al. (2004) identificaram onze raças diferentes e verificaram que aquelas capazes de infectar germoplasma Mesoamericano foram mais frequentes nas regiões amostradas e somente as cultivares diferenciadoras Kaboon, PI 207262, AB136 e G2333 não foram suscetíveis aos isolados estudados.

Várias metodologias podem ser empregadas na quantificação da variabilidade genética de qualquer espécie; entre elas destaca-se, atualmente, o uso de marcadores genéticos.

2.3 Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança mendeliana simples, facilmente reconhecidas (Robinson, 1998). Eles possibilitam comparações genotípicas e são bastante úteis no estudo genético, já que permitem verificar a herança de caracteres, ajudam na construção de mapas genéticos e permitem verificar a relação entre os genótipos.

Os marcadores morfológicos foram a principal ferramenta usada por naturalistas para identificação, descrição e classificação dos seres vivos (Mühlen et al., 2000). Eles serviram para desenvolver as teorias Mendelianas, as teorias sobre ligações gênicas e para construção dos primeiros mapas

genéticos (Steiner & Greene, 1996). Até meados da década de 1960, os estudos de genética e melhoramento eram realizados com base em genes associados a caracteres morfológicos, de fácil identificação visual. Entretanto, estes ocorrem em número reduzido, limitando a sua utilização (Ferreira & Grattapaglia, 1998), além de estarem sujeitos a forte influência ambiental, mascarando o fenótipo.

Com o desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, seguido do advento das técnicas modernas de biologia molecular, que possibilitaram o surgimento de métodos variados para detecção de polimorfismo genético, diretamente em nível de DNA (marcadores de DNA), o número de marcadores genéticos aumentou substancialmente, possibilitando a sua aplicabilidade em todas as espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.4 Marcadores de DNA

Com o conhecimento das enzimas de restrição foi possível o desenvolvimento da classe dos marcadores moleculares que, atualmente, agrupa diversas técnicas que podem fornecer um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos para qualquer organismo vivo. Marcadores moleculares de DNA diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Os distintos tipos de marcadores hoje disponíveis distinguem-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade no âmbito de DNA.

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), estes marcadores apresentam a vantagem de identificar elevado nível de polimorfismo e são, geralmente, neutros em relação a efeitos ambientais, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico, possibilitando também a identificação de genótipos em estágios precoces de desenvolvimento além de não serem influenciados pelo ambiente.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (“Restriction

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

Cada ciclo de amplificação, na técnica de PCR, compreende três etapas: a) desnaturação da molécula de DNA, com temperatura entre 91°C e 94°C; b) anelamento dos *primers* às regiões complementares no DNA e c) extensão dos *primers* pela DNA polimerase (Passos-Bueno & Zatz, 1995). A possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, via PCR, causou grande revolução, visto que tornou possível a detecção de DNA a olho nu, diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos. Entretanto, a técnica apresentava uma importante limitação: a construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse, havendo, então, a necessidade da clonagem e sequenciamento da região (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em 1990, Welsh & McClelland e Williams e colaboradores descreveram que os produtos genômicos amplificados por *primers* arbitrários poderiam ser usados como marcadores genéticos. A técnica descrita por Williams et al. (1990) foi denominada RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), a qual amenizou a limitação maior da técnica de PCR e tornou-se a técnica de marcadores moleculares mais popular. Esta técnica vem sendo utilizada em vários estudos, como na estimação de variabilidade genética, identificação de alelos favoráveis e construção de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD têm contribuído substancialmente com os programas de melhoramento, por meio da identificação de polimorfismos e de alelos de resistência a doenças em feijoeiro (Kelly, 1995; Santos, Castanheira & Melo, 1996; Silva, 2000), na identificação de híbridos verdadeiros em feijoeiro (Alzate-Marin et al., 1996) e na virulência e diversidade genética em *C. lindemuthianum* (Vilarinhos et al., 1995; Alzate-Marin, 1996; Pastor-Corrales, 1996; Balardin et al., 1997; Balardin & Kelly, 1998; González et al., 1998; Thomazella et al., 2002).

Vários estudos para detecção de variabilidade genética têm sido realizados utilizando metodologias variadas, como isoenzimas, RFLP e RAPD. Em geral, os resultados das análises por isoenzimas e RFLP têm mostrado alta repetibilidade, porém, têm revelado baixos níveis de polimorfismo. Resultados das análises de RAPD têm revelado elevado nível de polimorfismo e baixa repetibilidade dos resultados (Hosokawa et al., 2000). A técnica RAPD, no entanto, apresenta uma série de vantagens em relação aos demais métodos, que tornam o seu uso bastante viável e popular. Dentre essas vantagens estão a rapidez, o baixo custo e a necessidade de pouco material.

McKay & Latta (2002) sugerem que marcadores moleculares e caracteres fenotípicos comportam-se de maneira diferente na divergência adaptativa das populações e, por isso, não se deve extrapolar as conclusões de um para outro.

2.5 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos

O uso das cultivares diferenciadoras para o estudo da variabilidade genética de *C. lindemuthianum* é limitado por levar em conta somente o caráter patogenicidade, representando apenas uma diminuta fração do genoma do patógeno. Pode, ainda, sofrer forte pressão de seleção, devido às variações do hospedeiro e patógeno, sendo necessário o uso de outras ferramentas que

possibilitem o estabelecimento de informações mais detalhadas sobre a estrutura populacional do patógeno. A análise da estrutura populacional de um patógeno, visando o estabelecimento de inferências evolutivas, pode ser mais bem visualizada se forem utilizados marcadores genéticos seletivamente neutros (RFLP, RAPD, AFLP e etc.), pois fornecem informações sobre todo o genoma, dão idéia de parentesco, além de não sofrerem variações ambientais, tornando, assim, o estudo mais conciso.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar e estudar o grau de divergência genética de raças de *C. lindemuthianum*, por meio de marcadores moleculares (Vilarinhos et al., 1995; Pastor-Corrales, 1996; Alzate-Marin et al., 1997; Balardin et al., 1997; Balardin & Kelly, 1998; González et al., 1998; Thomazella et al., 2002, Talamini et al., 2004).

Vilarinhos et al. (1995), ao estudarem a dissimilaridade genética de algumas raças de *C. lindemuthianum*, verificaram baixa dissimilaridade genética entre as raças Alfa-Brasil (grupo Alfa), Delta e Capa (grupo Delta) e Zeta (grupo Brasileiro I) e as classificaram em um único grupo (grupo II). Por outro lado, a raça 585 formou um grupo separado (grupo I). Os autores atribuíram a não correspondência entre as marcas moleculares e a caracterização realizada por meio das cultivares diferenciadoras, à diferença no número de locos amostrados por meio das duas técnicas, já que RAPD permite a comparação simultânea de um grande número de locos e a outra técnica amostra poucos locos do genoma. Além disso, aventaram que as influências ambientais, a falta de controle das variáveis, tais como tempo de incubação e concentração de esporos, bem como a subjetividade na avaliação dos sintomas, afetam drasticamente os procedimentos usados (cultivares diferenciadoras). Ressaltaram ainda os autores, que o *fingerprinting* de DNA definido para cada raça de *C. lindemuthianum* pode ser útil para a identificação de novas raças e também para assistir programas de

melhoramento, objetivando o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à antracnose.

Analisando a diversidade genética de raças de *C. lindemuthianum*, Alzate-Marin et al. (1997) conseguiram agrupar 22 raças em três grupos distintos. As raças previamente agrupadas por testes de virulência não apresentaram correlação com a classificação obtida por marcadores RAPD. Este resultado era esperado, visto que a diversidade genética medida por marcadores moleculares baseia-se na análise aleatória de todo o genoma do fungo, podendo não haver correlação entre os locos utilizados na classificação molecular com os locos de patogenicidade. Os autores acreditam que o fungo tem sofrido um processo de evolução convergente, ou seja, indivíduos geneticamente divergentes têm adquirido o mesmo fenótipo de virulência.

No presente trabalho também não foi observada correlação entre os grupos de raças com a origem geográfica. A não existência de correlação foi atribuída aos tipos de métodos de melhoramento de feijoeiro aplicados no Brasil, que se baseiam na introdução e avaliação de um grande número de linhagens de diferentes origens, criando uma alta variabilidade do fungo nos locais de cultivo. Um aspecto não abordado pelos autores e que, provavelmente, pode ter interferido nestes resultados, é o intercâmbio de germoplasma de uma região para outra, fato mensurável, visto que o patógeno pode ser propagado por meio de sementes contaminadas.

Segundo Pastor-Corrales (1996), *C. lindemuthianum* poderia estar dividido em dois grupos de acordo com sua virulência, sendo um especializado em hospedeiros do conjunto gênico Mesoamericano e outro do conjunto gênico Andino.

Sicard et al. (1997), ao estudarem a diversidade genética de *C. lindemuthianum* em três centros de diversidade de *Phaseolus vulgaris* por meio de RAPD, utilizando um total de quatro primers, constataram polimorfismo

entre os 128 isolados testados. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 58,46% da diversidade foi entre regiões. A AMOVA revelou que há maior distância genética entre isolados do México e regiões Andinas do que entre isolados da Argentina e Equador. Foi observado também um elevado nível de diversidade molecular dentro de regiões Mexicanas. A maioria dos alelos encontrados no Equador e Argentina foi também encontrada no México, sugerindo que as populações Andinas do patógeno surgiram a partir de populações de origem Mesoamericana. Estes resultados reforçam a idéia de que a coevolução leva à formação de grupos diferentes do patógeno quando comparados ao conjunto gênico de *Phaseolus vulgaris*.

Neste trabalho também foi estimado o índice de diversidade de Shannon, por meio do qual foi possível observar que os isolados do México apresentaram a maior diversidade em relação aos outros países estudados; contudo, estes resultados não corroboram com os detectados com base na inoculação em cultivares diferenciadoras, tendo a maior diversidade sido observada na Argentina. É importante mencionar que o índice de Shannon foi calculado com base em informação de marcadores RAPD, os quais não estão diretamente relacionados aos locos para virulência.

Balardin et al. (1997), utilizando a técnica de RAPD, verificaram que as raças 31, 73, 81 e 89 formaram um só grupo e a raça 2047 permaneceu em um grupo isolado. Por meio deste estudo não foi possível observar padrões geográficos evidentes, além da não observação de correlação entre a classificação obtida por meio de marcadores RAPD e o conjunto das doze cultivares diferenciadoras. Observaram também variabilidade dentro das raças 65 e 73. Balardin & Kelly (1998) também encontraram variabilidade molecular dentro das raças 7, 17, 31 e 73.

Mesquita et al. (1998) propuseram o uso de marcadores RAPD como ferramenta auxiliar na classificação de raças de *C. lindemuthianum*, visto que a

classificação com base nas cultivares diferenciadoras apresenta algumas limitações, anteriormente citadas nesta revisão. Para tal proposta, foi realizada uma amostragem de onze isolados da raça 73, seis da raça 65 e dez da raça 64, os quais constituíram um bulk, para a análise de bulk segregante. Foram identificadas bandas específicas para cada uma destas três raças, levando-os a concluir que poderia ser criado um banco de bandas de DNA raça-específica, para serem usadas como ferramenta auxiliar, por fitopatologistas e melhoristas, em programas de melhoramento visando ao desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose.

González et al. (1998), ao estudarem 59 isolados de *C. lindemuthianum* de diferentes regiões do México, em um período de quatro anos, detectaram a presença de dez raças; entre estas, três (8, 1472 e 1088) ainda não tinham sido encontradas. Mostraram ainda que houve uma tendência de, tanto com marcadores RAPD quanto AFLP, ocorrer agrupamento dos isolados de acordo com a sua localização geográfica. Marcadores AFLP discriminaram melhor os grupos, provavelmente devido ao maior número de bandas polimórficas (aproximadamente quatro vezes o gerado por RAPD) que foram geradas utilizando esta técnica. As análises realizadas com os dois marcadores não revelaram relação direta entre o genótipo e a reação observada nas diferenciadoras. Os autores sugerem que a combinação de marcadores moleculares à inoculação em cultivares diferenciadoras constitui uma eficiente estratégia para o estudo de populações de *C. lindemuthianum*.

Estudos de divergência genética entre e dentro de raças (7, 31, 65, 69, 73, 81, 87, 89, 95 e 2047) de *C. lindemuthianum*, via RAPD, realizados por Thomazella et al. (2002), revelaram alta dissimilaridade genética entre as raças 7 e 2047, com distância de 94,33%. Por outro lado, as raças 73 e 81 apresentaram a menor distância genética, cuja magnitude foi de 21,66%. Verificaram também a formação de quatro grupos: grupo I, incluindo as raças 73, 81, 87, 31, 69, 89 e

65; grupo II, a raça 95; grupo III, a raça 2047 e o grupo IV, a raça 7. Ressaltaram ainda que estas duas raças comportam-se como virulentas somente nas diferenciadoras de origem Mesoamericanas. Observaram também variabilidade molecular dentro das raças 7, 31 e 81. Estes dados sugerem que *C. lindemuthianum* poderia estar dividido em dois grupos de acordo com sua virulência, sendo um especializado em hospedeiros do conjunto gênico Mesoamericano e outro do conjunto gênico Andino e corroboram com os resultados apresentados por Pastor-Corrales et al. (1996).

Talamini et al. (2004) estudaram a divergência entre e dentro de 41 isolados de *C. lindemuthianum*, divididos em seis grupos com similaridade relativa de 75%. O grupo VI, formado pelos três isolados da fase sexuada de *C. lindemuthianum*, foi o mais divergente. O agrupamento obtido por meio dos marcadores RAPD não apresentou relação com as raças classificadas utilizando cultivares diferenciadoras. Foi observada tendência de se agrupar isolados com relação à origem geográfica por meio de marcadores RAPD. O intercâmbio de sementes infectadas com *C. lindemuthianum* entre regiões pode ter sido uma das causas para dificultar o agrupamento dos isolados por região. A falta de relação entre alguns grupos formados pelo RAPD e a origem geográfica dos isolados pode ser atribuída ao método de melhoramento baseado na introdução e avaliação de grande número de linhagens de diferentes origens.

A importância relativa dos marcadores moleculares para discriminar grupos pode ser demonstrada pelo trabalho apresentado a seguir. Em *Phaeoisariopsis griseola*, fungo causador da mancha angular no feijoeiro, até o momento são conhecidos dois grupos o Mesoamericano e o Andino; no entanto, novas evidências na literatura relatam a ocorrência de um terceiro grupo, Afro-Andino, cujos isolados têm sido identificados somente na África. Para avaliar a existência deste novo grupo marcadores moleculares do tipo RAPD e RAMS (“Random Amplified Microsatellites” – Hantula et al.,1996) foram empregados

e, a partir dos dados gerados, foram feitas estimativas populacionais. A análise da diversidade genética revelou que não há diferenciação ($G_{ST} = 0,004$) entre isolados Afro-Andinos e Andinos da África. Entretanto, significantes níveis de diferenciação genética ($G_{ST} = 0,39$) foram observados entre isolados Afro-Andinos ou Andinos da África e isolados Andinos da América Latina, revelando significativa diferenciação geográfica dentro de linhagens Andinas. Estes resultados demonstram que isolados Afro-Andinos não constituem um novo grupo de *P. griseola* (Mahuku et al., 2002).

Um estudo comparativo entre marcadores RAPD e AFLP para demonstrar a estrutura populacional de *Botrytis cinerea*, fungo haplóide que apresenta reprodução assexuada, foi realizado por Moyano et al. (2003). Neste trabalho ficou clara a eficiência de marcadores RAPD para o estudo de organismos haplóides, visto que a sua natureza dominante não interfere nos resultados. A melhor inferência sobre a estrutura genética das populações deste microrganismo foi demonstrada por marcadores RAPD, pois gerou maior polimorfismo por loco (56%) comparado ao marcador AFLP (32%). A maior proporção da diversidade total (H_T) das populações encontra-se dentro (H_S) de populações, perfazendo um total de 96% da diversidade, enquanto a diversidade entre populações foi de apenas 4%, independentemente do marcador utilizado para a análise. Nas diferentes áreas em função dos levantamentos realizados, estes resultados são muito importantes, segundo os autores, partindo do princípio de que a principal causa da dificuldade do manejo de cultivares é o limitado entendimento da estrutura genética de populações de *Botrytis cinerea*.

Mahuku & Riascos (2004) realizaram estudo de diversidade molecular e de virulência entre 200 isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diversas partes do mundo. Foram utilizados marcadores RAMS e Rep-PCR (DNA de sequência repetitiva) por meio dos quais identificou-se elevado nível de

diversidade genética, revelando que este patógeno apresenta alta variabilidade. A análise molecular não revelou separação de classes por centros de origem.

A revisão apresentada demonstra o quão importante é realizar estudo da estrutura genética de populações para entender como está distribuída a variabilidade do fungo *C. lindemuthianum*, possibilitando, assim, interferir no desenvolvimento de novas raças, adotando estratégias de melhoramento baseadas cientificamente.

2.6 Estrutura genética de populações

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

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

O conhecimento da população do patógeno contribui para a maior eficiência de técnicas de manejo de resistência, tais como o melhoramento para

resistência durável, piramidação de genes, uso de multilinhas e o uso de misturas varietais (Mizubuti, 2002).

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

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

2.7 Análises multidimensionais

2.7.1 Medidas de similaridade ou dissimilaridade

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

A similaridade é uma medida estabelecida entre um genótipo i e um genótipo j (s_{ij}) e geralmente apresenta valores entre 0 e 1. A expectativa de um coeficiente de similaridade é representar a regressão linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de p variáveis. Associada a ela, a dissimilaridade, medida por $d_{ij} = 1 - s_{ij}$, é simétrica e não negativa. Segundo

Krzanowski (1988), é grande o número de coeficientes que já foram propostos para estimar esta medida.

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

Os diferentes coeficientes propostos combinam as quantidades a, b, c e d. Os coeficientes que não consideram a quantidade d são preferidos em estudos com marcadores dominantes, já que não se sabe, precisamente, a natureza molecular da ausência da banda.

Duarte et al. (1999) estudaram oito coeficientes de similaridade, nas subseqüentes análises de agrupamento e ordenação de 27 cultivares de feijão analisados por marcadores RAPD. Estes autores concluíram que, dentre os coeficientes estudados, o de Sorensen-Dice ou Nei & Li foi o mais eficiente na dispersão dos genótipos em um plano bidimensional e, por isso, consideram-no o mais eficaz na análise de marcadores RAPD.

TABELA 1 Tabela de contigência, mostrando as quatro possíveis combinações dos tipos concordância e discordância de comparações de dois genótipos por marcadores dominantes.

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

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

2.7.2 Análises de agrupamento

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

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

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

As delimitações dos grupos podem ser definidas por meio de exame visual do dendrograma. Estabelecendo-se cortes em certos pontos do dendrograma, definem-se os grupos e seus respectivos números de indivíduos.

Isto constitui uma das dificuldades de utilização do método hierárquico devido à arbitrariedade na escolha destes pontos de corte. Segundo Cruz (1990), deve-se evidenciar pontos de alta mudança de nível.

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

$$d_{(ij)} = \text{mín}(d_{ij})$$

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

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

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

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

Diversos trabalhos na literatura utilizaram métodos de agrupamento com a finalidade de estudar a divergência genética de fungos fitopatogênicos por meio de marcadores moleculares. Esta metodologia foi usada por González et al. (1998), Mahuku et al. (2002), Luz et al. (2003) e Moyano et al. (2003).

2.7.3 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*principal components analysis – PCA*) é, essencialmente, uma técnica da redução da dimensionalidade espacial

dos dados, assim como a análise de agrupamento. Isso é feito a partir da estimação de componentes ditos principais, que correspondem a combinações lineares de todas as variáveis sob estudo. Trata-se de uma análise simultânea de múltiplas variáveis que são condensadas em uns poucos componentes, sem perda substancial de informação (Dias, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Resistência de Plantas a Doenças, Genética Molecular e em casa de vegetação, localizados na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Origem, cultivo e esporulação dos isolados de *C. lindemuthianum*

Para este trabalho, foram selecionados 88 isolados de *C. lindemuthianum* provenientes das micotecas do Departamento de Biologia da UFLA e do Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão – CNPAF/EMBRAPA. Estes isolados foram obtidos de diferentes origens geográficas (Tabela 2): região Sudeste, representada pelos estados de MG e SP; região Sul, representada por PR, SC e RS; região Centro-Oeste, representada por DF, GO e MS e região Nordeste, representada pela BA. Estas regiões são representativas das principais áreas de produção comercial no Brasil. Foi também usado um isolado (raça 2047) da Costa Rica, além de três isolados da fase sexuada (*Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*).

Os isolados de *C. lindemuthianum* foram coletados a partir de folhas, vagens e caule, provenientes de plantas de feijão coletadas no campo. Esses isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de tecidos periféricos das áreas lesionadas; em seguida, foram imersos em álcool 70% durante dois minutos e, posteriormente, em hipoclorito de sódio a 1%, durante dois minutos. Logo após, foi feita lavagem em água destilada estéril. O cultivo do fungo foi realizado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), mediante plaqueamento de tecidos de vagens, de hastes e de folhas infectados. A partir das colônias produzidas foram isoladas colônias monospóricas (linhagens).

Para a esporulação, os isolados foram repicados para vagens previamente esterilizadas, dentro de tubos de ensaio, parcialmente imersas em meio ágar-água, por um período de incubação de oito a dez dias, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. A partir destas vagens, foram preparadas suspensões de conídios (esporos) homogêneos em água destilada estéril, quantificados em câmara de newbawer e diluídos para a concentração final de $1,2 \times 10^6$ conídios.ml⁻¹.

TABELA 2 Origem geográfica e raças dos isolados de *C. lindemuthianum* utilizadas.

| Raças | Cultivar | Origem | |
|-------|----------------|---------------------|--------|
| | | Município | Estado |
| 81*1 | Carioca | Feira de Santana | BA |
| 69*1 | Carioca | - | DF |
| 69*3 | Rudá | - | DF |
| 65*1 | Rudá | - | DF |
| 69*2 | Pérola | Planaltina | DF |
| 593*1 | Pérola | Cristalina | GO |
| 65*21 | Tipo I Precoce | Cristalina | GO |
| 593*2 | Pérola | Cristalina | GO |
| 55 | - | Goiânia | GO |
| 81*2 | Rudá | Luziania | GO |
| 69*4 | Pérola | São João da Aliança | GO |
| 65*13 | Pérola | Buriti | MG |
| 65*14 | Pérola | Buriti | MG |
| 69*5 | Pérola | Buriti | MG |
| 81*11 | Pérola | Buriti | MG |
| 65*9 | Pérola | Coromandel | MG |
| 65*23 | Pérola | Januária | MG |
| 65*6 | - | Lambari | MG |
| 65*8 | - | Lambari | MG |
| 8 | UTF 0013 | Lavras | MG |
| 64*1 | CNFC 8044 | Lavras | MG |
| 65*7 | 9D3 | Lavras | MG |
| 65*11 | Carioca | Lavras | MG |
| 73*1 | Carioca | Lavras | MG |
| 73*2 | Carioca | Lavras | MG |

“...Continua...”

“TABELA 2, Cont.”

| | | | |
|---------------------|------------------------------|--------------------|----|
| 81*4 | Pérola | Lavras | MG |
| 81*8 | Carioca | Lavras | MG |
| 81*9 | Carioca | Lavras | MG |
| 89*1 | Carioca | Lavras | MG |
| 89*2 | - | Lavras | MG |
| 73*Gc1 ^a | F. Sexuada - 13 ₃ | Lavras | MG |
| 73*Gc2 ^a | F. Sexuada - 42 ₃ | Lavras | MG |
| 73*Gc3 ^a | F. Sexuada - CV ₃ | Lavras | MG |
| 81*18 | Pérola do Sul | Lavras | MG |
| 65*24 | Olath Pinto | Lavras | MG |
| 81*16 | - | Heliadora Natércia | MG |
| 65*12 | Pérola | Luminárias | MG |
| 65*20 | Pérola | Monte Carmelo | MG |
| 65*22 | Pérola | Monte Carmelo | MG |
| 81*3 | CNFC 8060 | Patos de Minas | MG |
| 81*7 | CNFC 8060 | Patos de Minas | MG |
| 87*3 | Carioca | Patos de Minas | MG |
| 81*10 | Campeão 2 | Unaí | MG |
| 65*2 | CNFC 8062 | Viçosa | MG |
| 65*3 | CNFC 8062 | Viçosa | MG |
| 65*4 | ALC 2970026 | Viçosa | MG |
| 65*5 | ALC 2970103 | Viçosa | MG |
| 65*10 | ALC 2970168 | Viçosa | MG |
| 81*5 | C-III-R-3 | Viçosa | MG |
| 81*6 | Rosinha G2 | Viçosa | MG |
| 83*1 | Carioca | Viçosa | MG |
| 87*1 | ALC 2970061 | Viçosa | MG |
| 87*2 | ALC 2970061 | Viçosa | MG |
| 337*1 | Talismã | Viçosa | MG |
| 337*2 | Pérola | Viçosa | MG |
| 337*3 | CNFC 8045 | Viçosa | MG |
| 337*4 | CNFC 8045 | Viçosa | MG |
| 65*15 | - | Viçosa | MG |
| 81*17 | UFV-75M | Viçosa | MG |
| 81*12 | Carioca | Dourados | MS |
| 93*1 | Rubi | Castrolândia | PR |
| 91*1 | Rubi | Fundação ABC | PR |
| 85*1 | Rubi | Fundação ABC | PR |
| 64*2 | Uirapuru | Lapa | PR |
| 0 | FT-120 | Lapa | PR |

“...Continua...”

“TABELA 2, Cont.”

| | | | |
|--------|---------------|-----------------|------------------------|
| 73*5 | BZ 9792-180-2 | Londrina | PR |
| 69*6 | Valente | Ponta Grossa | PR |
| 81*13 | Valente | Ponta Grossa | PR |
| 65*16 | Valente | Ponta Grossa | PR |
| 73*3 | IAPAR 81 | Ponta Grossa | PR |
| 81*14 | CNFP 8023 | Ponta Grossa | PR |
| 65*17 | Valente | Ponta Grossa | PR |
| 65*18 | CNFC 9474 | Ponta Grossa | PR |
| 67*1 | Aporé | Ponta Grossa | PR |
| 73*4 | CNFP 10035 | Ponta Grossa | PR |
| 65*19 | CNFC 8006 | Ponta Grossa | PR |
| 73*6 | CNFP 10035 | Ponta Grossa | PR |
| 81*15 | CNFR 8035 | Ponta Grossa | PR |
| 93*2 | CNFR 8035 | Ponta Grossa | PR |
| 97*1 | Valente | Passo Fundo | RS |
| 69*7 | Valente | Passo Fundo | RS |
| 87*4 | Valente | Passo Fundo | RS |
| 73*7 | FT BIO NOBRE | Passo Fundo | RS |
| 73*8 | Pérola | Campos Novos | SC |
| 73*10 | FT BONITO | Paranapanema | SP |
| 73*11 | FT BONITO | Paranapanema | SP |
| 73*9 | IAPAR 44 | Pindamonhangaba | SP |
| 2047*1 | - | C. Rica | C. Rica ^b . |

^a *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*

^b Isolado oriundo da Costa Rica

*Número do isolado que acompanha a raça

3.2 Caracterização das raças de *C. lindemuthianum*

Para distinguir as diferentes raças de *C. lindemuthianum*, foi usado o conjunto de doze cultivares diferenciadoras, proposta pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (1990), cada uma designada pelo número binário proposto por Habgood (1970) (Quadro 1). Foram semeadas 16 sementes de cada cultivar diferenciadora, em bandeja de isopor contendo substrato plantmax.

As suspensões de esporos de cada isolado ($1,2 \times 10^6$ conídios.ml⁻¹) foram inoculadas após a expansão completa das folhas primárias das plântulas,

aproximadamente sete a dez dias após a semeadura, pulverizando-se ambas as faces das folhas e os talos das plântulas com pulverizador “De Vilbiss” acionado por um compressor, em toda a plântula até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as bandejas foram incubadas em câmara de nebulização por 48 horas em câmara úmida com temperatura em torno de 20°C, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, as bandejas foram transferidas à casa de vegetação, local onde permaneceram até a avaliação dos sintomas. A avaliação dos sintomas foi realizada sete dias após a inoculação, de acordo com a seguinte escala descritiva (Rava et al., 1993):

- 1 – ausência de sintomas;
- 2 – até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas;
- 3 – maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas;
- 4 – até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas;
- 5 – maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas;
- 6 – manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos;
- 7 – manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos;
- 8 – manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas;
- 9 – a maioria das plantas mortas.

Foram consideradas resistentes (reação incompatível) as plantas com notas de 1 a 3 e suscetível (reação compatível) de 4 a 9. Se a média das notas das plântulas de uma mesma cultivar for maior ou igual a 3,6, a cultivar era considerada suscetível.

3.3 Obtenção de massa micelial

Para obter-se a massa micelial, foram retirados das bordas das colônias pequenos discos de meio de cultura contendo micélio do fungo de cada um dos 88 isolados (Tabela 2). Logo após, estes foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 ml, os quais continham 125 ml de meio líquido M3 (Junqueira et al., 1984). Estes frascos foram mantidos a 22°C em incubadora (Shaker) com agitação, na rotação de 110 RPM, até obter micélio abundante e de coloração clara, após aproximadamente sete dias.

Obtida a massa micelial, foi retirada, parcialmente, a umidade, por meio de bomba a vácuo e, em seguida, o micélio foi congelado a -20°C, para posterior desidratação. Logo após, o micélio foi liofilizado (liofilizador Labconco Freeze Dry System/Freezone 4.5), durante 36 horas, sendo posteriormente armazenado em vidraria esterilizada em ambiente fresco e seco para posterior extração de DNA.

3.4 Extração de DNA total

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

O macerado foi mantido em banho-maria a 65°C, por 30 minutos, sendo agitado, por suaves inversões, a cada 10 minutos; logo após as amostras foram submetidas a resfriamento durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução clorofórmio: álcool isoamil (24:1), seguido da homogeneização e centrifugação durante 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30 mL da solução álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e levado ao freezer (-20 °C) por seis horas, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7). O DNA dissolvido foi submetido a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil, sendo o sobrenadante coletado e misturado com o triplo de seu volume com álcool a 95%:acetato de sódio 3M (20:1) e mantido no freezer (-20 °C) por seis horas, no mínimo. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada e o DNA dissolvido em 50-100 µL de TE.

Após este processo, o material foi quantificado, usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100. Para isso, foram utilizados 2 µL da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4), juntamente com 0,1 µL.mL⁻¹ do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE para uma concentração de 10 ng.mL⁻¹, para as reações RAPD.

3.5 Reação RAPD

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD. Cada reação de amplificação de 14 µL, semelhante ao procedimento utilizado por Talamini et al. (2004), continha 4µL de água, 3,5 µL de DNA(10 ng.mL⁻¹), 0,66 µL de dNTP (mistura equitativa de dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0,2 mM cada), 3,0µL (1,0 mM) de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1,65 µL de tampão de reação (50 mM tris pH 8,0; 2,0 mM de MgCl₂; 20 mM de KCl; 250 µg.mL⁻¹ de albumina soro bovino; 1% de ficoll 400 e 1 mM de tartrazine) e 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331. Os ciclos de amplificação foram subdivididos em dois programas: 1) nos dois primeiros ciclos, a desnaturação do DNA foi feita a 94°C por dois minutos, o anelamento a 37°C por 15 segundos, e a elongação a 72°C por um minuto; 2) adicionalmente, mais 38 ciclos diferiram apenas no tempo de desnaturação (15 segundos). Após 40 ciclos, procedeu-se a extensão final por dois minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de ágar 2% imerso em tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70 volts, durante 4,5 horas. Logo após, foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg.mL⁻¹ e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com a câmara fotográfica EDA - 290 da KODAK.

3.6 Estimativa das similaridades genéticas

Ao avaliar os géis, cada banda polimórfica foi tratada como um carácter único. Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1 (Tabela 1A), a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) das bandas polimórficas, presentes nas 88 amostras. A estimativa da similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de isolados, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da expressão (Rohlf, 1992).

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

Os significados de a , b e c foram apresentados na Tabela 1.

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000).

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

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

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

A análise de agrupamento das similaridades foi feita pelo método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendrograma, por meio do mesmo programa.

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

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

em que t é o valor tabelado da distribuição t de Student a 1% de probabilidade com $n-2$ graus de liberdade e \bar{s}_{sg} o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Para a obtenção da estimativa da correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas, obtiveram-se as similaridades genéticas entre os locais de coleta por meio da média das similaridades de dois grupos de indivíduos, sendo utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

A estimativa da diversidade dentro de 6 estados de coleta (estados com mais de duas amostras) do patógeno, *C. lindemuthianum*, foi realizada utilizando-se o índice de Shannon, dado pela seguinte expressão:

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

em que:

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

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

3.7 Análise de componentes principais

Foi realizada uma análise exploratória dos dados binários por meio da análise dos componentes principais e, posteriormente, construído um biplot para plotar os escores fornecidos pelos dois primeiros componentes. Para tanto foi utilizado um procedimento do SAS denominado PRINQUAL (Principal Components of Qualitative Data), capaz de generalizar PCA convencional (PROC PRINCOMP) para análise de dados não quantitativos (DIAS, 1998).

3.8 Análise de variância molecular

A análise de variância molecular foi realizada com o auxílio do programa ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al., 2000). Inicialmente, esta análise foi realizada considerando uma estrutura hierárquica na qual cada estado (com mais de duas amostras) foi considerado como uma população. Um resumo desta análise de variância está apresentado na Tabela 3. Uma segunda estrutura hierárquica foi estudada, na qual considerou-se cada raça (com mais de duas amostras) fisiológica como uma população.

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

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

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

em que:

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

TABELA 3 Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).

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

A : Número de estados ou raças amostrados (acima de duas amostras); N : número de indivíduos amostrados;

σ^2_a : componente de variância devido às diferenças entre estados ou raças;

σ^2_b : componente de variância devido às diferenças entre amostras dentro de estados ou raças;

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

ou estado de coleta. $n = \frac{N - \sum \frac{N^2_a}{N}}{A - 1}$, em que N^2_a : número de indivíduos na

população A (estados ou raças).

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de raças de *C. lindemuthianum*

Foram determinadas 19 raças distintas entre os 88 isolados estudados. O elevado número de raças é um indicativo da ampla variabilidade do patógeno em termos de patogenicidade.

A distribuição geográfica das raças encontra-se na Tabela 4. A maior frequência de isolados foi detectada no estado de Minas Gerais (54,5%). Essa maior frequência deve-se à maior facilidade de obtenção dos isolados nesta área geográfica. Houve dificuldade em amostrar isolados de outros estados; por isso, a diversidade encontrada deve ser observada com cautela. Interessante ressaltar que os estados com maior produção de feijão foram bem amostrados, como, por exemplo, Minas Gerais e Paraná.

Acentua-se que algumas raças ocorrem em apenas um local, tais como: a raça 0 (PR), 8 (MG), 55 (GO), 67 (PR), 83 (MG), 85 (PR), 89 (MG), 91 (PR), 93 (PR), 97 (RS), 337 (MG), 593 (GO). Observa-se também que no estado de São Paulo apenas uma raça (73) foi encontrada entre os três isolados estudados. No Distrito Federal predominou a raça 69, tendo ocorrido outra raça apenas para um isolado entre os quatro amostrados (raça 65). Faz-se necessário enfatizar que esta ampla variabilidade, provavelmente, reflete a utilização de diferentes cultivares de uma região produtora para outra, além das condições a que a cultura é submetida em cada uma destas regiões, tais como: monocultivo, consórcio, rotação de culturas e plantio direto. Isto torna clara a necessidade do monitoramento da população do patógeno, para que os programas de melhoramento possam ser mais direcionados e eficazes.

González et al. (1998) ao estudarem a variabilidade do fungo *C. lindemuthianum* em diferentes regiões produtoras de feijão no México,

TABELA 4 Distribuição geográfica das raças de *C. lindemuthianum*.

| Raças | Unidades da Federação | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|
| | BA | DF | GO | MG | MS | PR | RS | SC | SP | C.Rica* |
| 0 | | | | | | 1 | | | | |
| 8 | | | | 1 | | | | | | |
| 55 | | | 1 | | | | | | | |
| 64 | | | | 1 | | 1 | | | | |
| 65 | | 1 | 1 | 18 | | 4 | | | | |
| 67 | | | | | | 1 | | | | |
| 69 | | 3 | 1 | 1 | | 1 | 1 | | | |
| 73 | | | | 5 | | 4 | 1 | 1 | 3 | |
| 81 | 1 | | 1 | 12 | 1 | 3 | | | | |
| 83 | | | | 1 | | | | | | |
| 85 | | | | | | 1 | | | | |
| 87 | | | | 3 | | | 1 | | | |
| 89 | | | | 2 | | | | | | |
| 91 | | | | | | 1 | | | | |
| 93 | | | | | | 2 | | | | |
| 97 | | | | | | | 1 | | | |
| 337 | | | | 4 | | | | | | |
| 593 | | | 2 | | | | | | | |
| 2047 | | | | | | | | | | 1 |
| Total de isolados | 1 | 4 | 6 | 48 | 1 | 19 | 4 | 1 | 3 | 1 |

*Isolado oriundo da Costa Rica

avertaram que as diferenças nas populações de patógenos, provavelmente, refletem a diversidade no germoplasma utilizado e as práticas culturais empregadas em cada região.

As raças 0, 337 e 593 foram encontradas somente nos estados do Paraná (Lapa), Minas Gerais (Viçosa) e Goiás (Cristalina), respectivamente (Tabela 5). As raças 337 e 593 ainda não tinham sido detectadas no Brasil (Rava et al., 1994; Balardin, 1996; Alzate-Marin et al., 1997; Carbonell et al., 1999; Somavilla & Prestes, 1999; Sartorato, 2002; Talamini et al., 2002; Thomazella et al., 2002). Entretanto, a raça 0 já havia sido encontrada em

levantamento feito no México por González et al. (1998), onde detectou-se a presença de apenas um isolado dessa raça. Sicard et al. (1997), ao estudarem a diversidade de virulência em três centros de diversidade de *P. vulgaris*, especificamente na Argentina, Equador e México, observaram, entre os 128 isolados estudados, alta frequência da raça 0 (44 isolados), dos quais 66% foram encontrados no Equador. Esta alta frequência levou os autores a sugerirem que as cultivares diferenciadoras não permitem uma descrição apropriada da diversidade de virulência no Equador.

Assim como a raça 0, a raça 593 também já tinha sido detectada em um estudo de variabilidade realizado na Índia por Sharma et al. (1999). Ainda não há relatos na literatura a respeito da ocorrência da raça 337. É importante ressaltar que a raça 2047 ainda não foi detectada em nenhuma região produtora de feijão no Brasil.

A constatação das raças 337 e 593 é de grande importância, pois as mesmas promovem a “quebra” de resistência da cultivar TO (alelo Mex.2 ou *Co-4*) e TU (alelo Mex.3 ou *Co-5*), respectivamente (Tabela 5). É importante destacar que essas raças mais complexas têm sido encontradas principalmente em campos experimentais, nos quais são feitas avaliações frequentes de novos materiais a serem lançados no mercado. Os alelos *Co-4* e *Co-5* têm sido utilizados como fontes de resistência em alguns programas de melhoramento. Portanto, o surgimento dessas novas raças pode ter sido consequência da pressão de seleção exercida do hospedeiro sobre o patógeno. A raça 337, por exemplo, pode ter evoluído a partir da raça 81, ao adquirir um alelo de virulência capaz de quebrar a resistência do alelo *Co-4*, enquanto que a raça 85 pode ter passado por um processo evolutivo no qual adquiriu um alelo de virulência capaz de quebrar a resistência do alelo *Co-5*, dando origem à raça 593. Esse fato está de acordo com a hipótese de Vanderplank (1968), o qual relata que a adaptação das raças ocorre em função do número de alelos desnecessários para virulência. Isto pode

ser explicado da seguinte forma: a introdução de um novo alelo para resistência no hospedeiro promove uma seleção direcional na população do patógeno no sentido de aumentar a frequência da raça. Até o momento em que não haviam sido introduzidos estes novos alelos, a seleção estabilizadora provavelmente estava atuando no sentido de reduzir a frequência de uma raça quando ela tem alelos desnecessários para virulência.

Em levantamento realizado no Brasil por Rava et al. (1994), foram encontradas as raças (339, 343 e 453), que apresentaram reações compatíveis com a cultivar TO (*Co-4*), enquanto que a raça 585 apresentou reação de compatibilidade com a cultivar TU (*Co-5*). Esses resultados indicam a necessidade da substituição da fonte de resistência a ser utilizada nos programas de melhoramento. No Brasil, ainda é rara a ocorrência de raças com tão amplo espectro de patogenicidade, porém, cuidados devem ser tomados com a introdução de cultivares de uma região para outra e maiores precauções devem ser tomadas com a introdução de cultivares de outros países, pois, como visto, o espectro de patogenicidade em outros países é diferente do apresentado no Brasil (Rava et al., 1993 e González et al., 1998). Em alguns países, como a Nicarágua, por exemplo, 100% das raças promoveram reação compatível com a cultivar TU, além de reações compatíveis com a cultivar AB136, à exceção da raça 713 (Rava et al., 1993). A ocorrência de tais raças decorre da utilização continuada da mesma fonte de resistência, proporcionando o estabelecimento da coevolução entre planta e patógeno. Pode ser observado, de maneira geral, pelos relatos da literatura, que as raças mais complexas aparecem esporadicamente, sendo de baixa frequência quando comparadas com raças mais simples. Esse é um forte indício para a seleção estabilizadora proposta por Vanderplank (1968), que atua contra o alelo de virulência do patógeno no sentido de reduzir a frequência da raça com maior número de alelos desnecessários para virulência; conseqüentemente, a raça 65 seria a mais adaptada, pois apresenta apenas dois

alelos para virulência. Ressalta-se que esta afirmação concorda com a teoria de De Wit (2002), na qual pode-se constatar que raças mais simples, com maior número de alelos para avirulência provocam maior severidade, pois os alelos de avirulência teriam a função de aumentar a severidade impedindo a função da proteína receptora. Por conseguinte, se o hospedeiro que tem os alelos para resistência vertical estiver na presença de raças mais simples, será desencadeada pela planta reação de hipersensibilidade; portanto, raças mais simples tornar-se-ão mais adaptadas se estas forem capazes de causar doença.

Foi possível verificar que as raças 65 (27,27%), 81 (20,45%) e 73 (15,91%) são as mais freqüentes e, juntas, representam 63,63% do total (Tabela 5). Essas raças são amplamente disseminadas e adaptadas no Brasil, possivelmente devido ao livre comércio de grãos entre os estados e, principalmente, o uso de cultivares que é suscetível a elas, como, por exemplo, a cultivar Pérola e a Carioca.

Resultados obtidos em levantamentos realizados por Rava et al. (1994) revelaram que as raças 73 (29,66%) e 65 (13,56%) foram as mais freqüentes entre os 118 isolados. Resultados semelhantes foram encontrados por Balardin et al. (1997), ao verificarem que as raças 65 e 73 foram as mais freqüentes. O mesmo foi constatado em levantamentos realizados por Sartorato (2002), que observou maior freqüência da raça 73 (26,4%) e 65 (13,6%). Carbonell et al. (1999) relataram a maior freqüência da raça 65 em um levantamento realizado em São Paulo. No estado do Rio Grande do Sul, Somavilla & Prestes (1999) verificaram que a raça 65 foi a segunda mais freqüente, enquanto Sartorato (2002) e Talamini et al. (2002), em seus estudos, obtiveram como raças mais freqüente, respectivamente, as raças 73 e 65. Entretanto, a baixa freqüência de ocorrência de outras raças não implica que não seja dada atenção a estas. A atenção deve ser dispensada para atenuar o surgimento de novos alelos para virulência ou mesmo de novos genes de patogenicidade capazes de “quebrar” a

resistência de genes amplamente utilizados nos programas de melhoramento. Por conseguinte, torna-se necessária a adoção de um planejamento adequado, observando-se as regiões de ocorrência de raças e cultivares hospedeiras, a fim de retardar a disseminação ou o surgimento de novas raças, em determinadas regiões e, conseqüentemente, prolongar a vida útil das cultivares indicadas para cultivo do agricultor.

TABELA 5 Reação das cultivares diferenciadoras aos isolados de *C. lindemuthianum* e identificação das raças fisiológicas.

| Raças | Cultivares diferenciadoras ^a | | | | | | | | | | | nº de isolados | |
|-------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| | 2 ^{0c} | 2 ^{1b} | 2 ^{2b} | 2 ^{3c} | 2 ^{4c} | 2 ^{5b} | 2 ^{6c} | 2 ^{7c} | 2 ^{8c} | 2 ^{9c} | 2 ^{10c} | | 2 ^{11c} |
| 0 | - ^d | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 8 | - | - | - | + ^e | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 55 | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 64 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 2 |
| 65 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 24 |
| 67 | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 69 | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 7 |
| 73 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | 14 |
| 81 | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | 18 |
| 83 | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 85 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 87 | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | 4 |
| 89 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | 2 |
| 91 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 93 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | 2 |
| 97 | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | 1 |
| 337 | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | 4 |
| 593 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | - | - | 2 |
| 2047 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | 1 |
| Total | 84 | 9 | 18 | 21 | 37 | 3 | 85 | 1 | 5 | 3 | 1 | 0 | |

^aMichelite (2⁰), Michigan Dark Red Kidney – MDRK (2¹), Perry Marrow (2²), Cornell 49-242 (2³), Widusa (2⁴), Kaboon (2⁵), México 222(2⁶), PI 207262 (2⁷), TO (2⁸), TU (2⁹), AB136 (2¹⁰) e G2333 (2¹¹).

^bCentro de origem Andino; ^cCentro de origem Mesoamericano;

^dReação incompatível (-); ^eReação compatível (+)

O número de raças (19) diferentes dá um indicativo da variabilidade em termos de patogenicidade. Entretanto, para obter mais informações das interações que ocorrem entre os patógenos e as cultivares diferenciadoras, o número de isolados infectando cada cultivar diferenciadora foi determinado (Tabela 5 e Figura 1A). A Figura 1B é resultado de dados compilados da literatura dos últimos dez anos e mostra se o padrão de infecção das cultivares diferenciadoras por isolados brasileiros de *C. lindemuthianum* é um fenômeno geral observado em outros estudos. Estes resultados compilados da literatura indicam que as reações compatíveis são mais frequentes com as cultivares diferenciadoras: Michelite, México 222, Widusa, Cornell 49242, Perry Marrow, MDRK e Kaboon. Por meio de comparação entre os gráficos da Figura 1A e Figura 1 B é possível observar que o padrão de interações compatíveis, em geral, não mudou expressivamente, ao longo dos últimos dez anos. Esta comparação com os dados compilados da literatura salienta uma boa amostragem das raças, além da não tendência de modificação do padrão de infecção em cultivares diferenciadoras. Resultados semelhantes foram obtidos por González et al. (1998).

Dois centros de domesticação de *P. vulgaris* têm sido determinados, um Mesoamericano e outro Andino (Koenig & Gepts, 1989). No conjunto das doze cultivares diferenciadoras são encontradas três cultivares de origem Andina (MDRK, Perry Marrow e Kaboon) e as demais são de origem Mesoamericana. Entre os 88 isolados analisados, 22 infectaram, no mínimo, uma das cultivares diferenciadoras pertencentes ao Grupo Andino e 87 isolados infectaram pelo menos uma das diferenciadoras pertencentes ao Grupo Mesoamericano. Portanto, isolados de *C. lindemuthianum* infectaram tanto cultivares diferenciadoras de origem Mesoamericanas quanto de origem Andina.

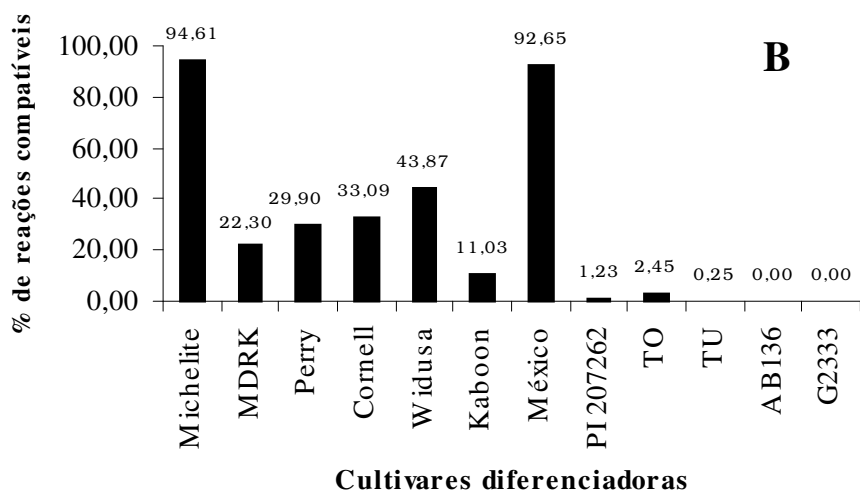
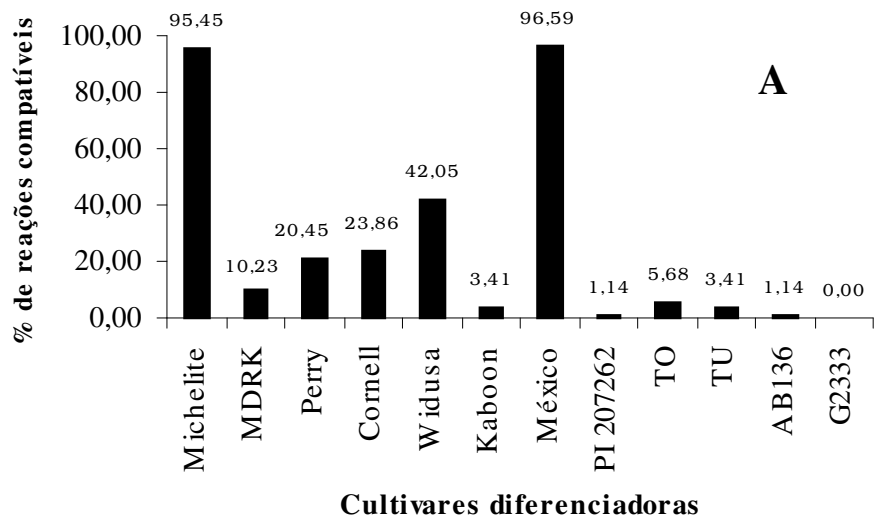


FIGURA 1 Percentagem de reações compatíveis entre as cultivares diferenciadoras e os isolados estudados. **A** – dados do presente trabalho. **B** – dados compilados de estudos de isolados de *C. lindemuthianum* dos últimos 10 anos no Brasil.

Para este estudo, exceção é feita à raça 2047 (Costa Rica) para melhor discriminar a diversidade existente no Brasil. Entre as 18 raças distintas, 15 apresentaram reação compatível com as cultivares diferenciadoras Michelite e México 222 (*Co-3* ou *Mex.1*). Resultados semelhantes foram relatado por Rava et al. (1994) em levantamentos realizados em diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil, onde observaram que 94,07% dos isolados apresentaram compatibilidade com o gene *Co-3* presente na cultivar México 222. Similarmente, Talamini et al. (2002), ao caracterizarem isolados provenientes de diferentes regiões produtoras de feijão de Minas Gerais, concluíram que as cultivares diferenciadoras Michelite e México 222 apresentaram suscetibilidade a 16 dos 17 isolados testados. Resultados similares foram observados em outros levantamentos (Balardin, 1997; Carbonell et al., 1999 e Somavila & Prestes, 1999).

As cultivares diferenciadoras PI 207262 (*Co-4³* e *Co-9*), AB136 (*Co-6* e *co-8*) e G2333 (*Co-4²*, *Co-5* e *Co-7*) não foram infectadas por nenhuma raça (exceção à raça 2047), evidenciando que são importantes fontes de resistência para um programa de melhoramento visando o controle da antracnose (Figura 1A). Esses resultados contrapõem-se aos levantamentos realizados na Nicarágua por Rava et al. (1993), em que as cultivares diferenciadoras TU e AB136 foram suscetíveis a quase todos os isolados testados. González et al. (1998), a partir de estudos realizados em diferentes regiões produtoras de feijão no México, observaram que nenhum isolado infectou as cultivares diferenciadoras Michelite, MDRK, Widusa, Kaboon, TU e G2333, entre as quais encontra-se as três cultivares diferenciadoras de origem Andina. Resultados semelhantes foram relatados por Carbonell et al. (1999) e Talamini et al. (2002); estes autores observaram que as cultivares TO, TU, AB 136 e G2333 não tiveram a sua resistência “quebrada”. É indispensável salientar que o aparecimento de raças com capacidade de “quebrar” a resistência dessas cultivares está diretamente

vinculado à cultivar que é utilizada em um determinado local, corroborando com o que é preconizado para a coevolução patógeno-hospedeiro. Fica claro que, para cada região, deve-se fazer um levantamento da variabilidade do patógeno, pois essa é ampla de tal forma que cultivares que se apresentem completamente resistentes em um local podem ser totalmente suscetíveis em outro.

A “quebra” da resistência das cultivares diferenciadoras TO (*Co-4* ou *Mex.2*) e TU (*Co-5* ou *Mex.3*) pelas raças 337 e 593, respectivamente, revela que novas estratégias devem ser priorizadas para a introdução de novas fontes de resistência na região de origem dessas raças, para que possa ser evitado um possível aumento da frequência dessas. Destaca-se como uma boa estratégia a piramidação de alelos de resistência, devendo o melhorista empenhar-se em introduzir, por meio de retrocruzamentos, por exemplo, um maior número de alelos para resistência vertical em uma mesma cultivar, podendo utilizar como genitor não-recorrente a cultivar AB136 e ou a cultivar G2333.

A “quebra” da resistência da cultivar TO já havia sido observada em levantamentos realizados por Rava et al. (1994), em que foram encontradas as raças 339 (MS), 343 (MS) e 453 (PR). Um levantamento para estudar a variabilidade do fungo *C. lindemuthianum* no Rio Grande do Sul foi realizado por Balardin (1997), no qual foi possível observar a presença da raça 453 e Somavilla & Prestes (1999) detectaram a presença da raça 321 (reação compatível com a cultivar TO). Essa raça (321) também foi detectada em um isolado oriundo do estado do Paraná, por Sartorato (2002). Reação compatível com a cultivar TU foi observada por Rava et al. (1994), que verificaram a ocorrência de reação compatível com a raça 585 (ES).

4.2 Avaliação por marcadores RAPD

Para este estudo foram utilizados 14 *primers* de RAPD, que amplificaram um total de 62 bandas polimórficas, e dois *primers* de PCR (duas

bandas polimórficas), totalizando 64 bandas polimórficas, as quais foram utilizadas para avaliação de 88 isolados de *C. lindemuthianum* (Tabela 6). Número de bandas polimórficas semelhante foi utilizado por Camargo Jr. (2004), o qual utilizou 62 bandas polimórficas em seu estudo de identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* por meio de marcadores RAPD.

Foram geradas, em média, 4,4 bandas polimórficas por *primer*. Estudando a fase perfeita do fungo *C. lindemuthinum* (*G. cingulata*), por meio de marcadores RAPD, Camargo Jr. (2004) observou uma média de 1,87 bandas polimórficas por *primer*.

4.2.1 Avaliação da variabilidade genética

Com base nas 64 bandas polimórficas (Tabela 1A), foi construída uma matriz de similaridades genéticas por meio do coeficiente de similaridade de Dice. A similaridade genética entre os isolados variou de 0,65 a 0,99, com média de 0,85. Outros estudos de similaridade genética em *C. lindemuthianum* revelaram variações de 0,28 a 0,98 (Talamini et al., 2004). Resultados similares a esse foram relatados por Alzate-Marin et al. (1997) que, ao analisarem a diversidade genética em *C. lindemuthianum*, verificaram variação entre 0,66 e 0,96 nas estimativas de similaridades.

Para uma melhor visualização da similaridade genética entre os isolados, foi construído um dendrograma e realizada uma análise exploratória dos dados binários, foi feita por meio da análise de componentes principais, apresentados nas Figuras 2A (Anexos) e 2, respectivamente. A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sg_m), à direita (acima) da qual os acessos são considerados semelhantes. O sg_m a 1% de probabilidade foi de 0,891. Por meio do dendrograma foi possível verificar a formação de sete grupos (com pelo menos dois isolados). Os grupos formados são apresentados na Tabela 7. Entre

os isolados avaliados, vinte não formaram grupo dentro do intervalo estabelecido.

Essa análise descritiva revelou que o Grupo I é formado por 49 isolados, entre os quais 28 são de Minas Gerais; isto indica que 57,14% dos isolados pertencentes a este grupo são representados por amostras oriundas de Minas Gerais. Nesse mesmo grupo estão presente nove dos 19 isolados do Paraná. O Grupo II é formado por quatro isolados de Minas Gerais e um isolado do Paraná.

TABELA 6: *Primers* de RAPD e PCR que detectaram polimorfismo nos isolados de *C. lindemuthianum*, com suas respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas.

| Primer | Seqüências | N.º de bandas polimórficas |
|------------|-------------------------------|----------------------------|
| OPA – 13 | 5' CAGCACCCAC 3' | 07 |
| OPAQ – 11 | 5' GACGCCTCCA 3' | 02 |
| OPAS – 19 | 5' TGACAGCCCC 3' | 05 |
| OPBA – 03 | 5' GTGCGAGAAC 3' | 07 |
| OPBA – 06 | 5' GGACGACCGT 3' | 05 |
| OPBA – 08 | 5' CCACAGCCGA 3' | 04 |
| OPBB – 01 | 5' AACTGGCTG 3' | 04 |
| OPBB – 03 | 5' TCACGTGGCT 3' | 04 |
| OPBB – 05 | 5' GGGCCGAACA 3' | 05 |
| OPBB – 08 | 5' TCGTCGAAGG 3' | 02 |
| OPBB – 12 | 5' TTCGGCCGAC 3' | 05 |
| OPBB – 13 | 5' CTTCGGTGTG 3' | 07 |
| OPBB – 15 | 5' AAGTGCCCTG 3' | 02 |
| OPBB – 19 | 5' TTGCGGACAG 3' | 03 |
| CLPG (H01) | 5'CAAGGGCACCACCACCTTTGGCTAC3' | 01 |
| CLPG (H02) | 5'GCTCGACGTTGACACTGGGACGGT3' | |
| HPHR (G11) | 5'GCAGCCGGTCGCGGAGGCCATGG3' | 01 |
| HPHR (G12) | 5'CGCCCGGAGCCGCGGCGATCCTGC3' | |
| Total | | 64 |

TABELA 7 Grupos de isolados considerando os resultados do UPGMA e do dendrograma, referentes aos 88 isolados estudados (Figura 2A).

| GRUPO I | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------|--------|----|--------|----|-------|----|-------|----|
| I ^{1/} | E ^{2/} | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 8 | MG | 55 | GO | 64*1 | MG | 64*2 | PR | 65*1 | DF |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 65*2 | MG | 65*3 | MG | 65*5 | MG | 65*7 | MG | 65*8 | MG |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 65*9 | MG | 65*10 | MG | 65*12 | MG | 65*15 | MG | 65*16 | PR |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 65*19 | PR | 65*20 | MG | 65*21 | GO | 65*22 | MG | 65*23 | MG |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 69*3 | DF | 69*4 | GO | 69*6 | PR | 73*2 | MG | 73*3 | PR |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 73*4 | PR | 73*8 | SC | 73*9 | SP | 73*10 | SP | 81*3 | MG |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 81*5 | MG | 81*6 | MG | 81*7 | MG | 81*8 | MG | 81*10 | MG |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 81*11 | MG | 81*16 | MG | 81*17 | MG | 81*18 | MG | 85*1 | PR |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 87*1 | MG | 87*3 | MG | 87*4 | RS | 89*1 | MG | 89*2 | MG |
| I | E | I | E | I | E | | | | |
| 91*1 | PR | 93*2 | PR | 97*1 | RS | | | | |
| GRUPO II | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | I | E | I | E | I | E |
| 65*6 | MG | 65*24 | MG | 65*14 | MG | 81*4 | MG | 81*15 | PR |
| GRUPO III | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | I | E | | | | |
| 91*1 | PR | 93*2 | PR | 97*1 | RS | | | | |
| GRUPO IV | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | I | E | I | E | | |
| 337*1 | MG | 337*2 | MG | 337*3 | MG | 337*4 | MG | | |
| GRUPO V | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | | | | | | |
| 0 | PR | 69*2 | DF | | | | | | |
| GRUPO VI | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | I | E | | | | |
| 73*Gc1 | MG | 73*Gc2 | MG | 73*Gc3 | MG | | | | |
| GRUPO VII | | | | | | | | | |
| I | E | I | E | | | | | | |
| 593*1 | GO | 593*2 | GO | | | | | | |

^{1/} Isolados

^{2/} Estados de origem.

Três isolados formam o Grupo III, todos pertencentes à região Sul do país; desses, dois são do Paraná (Ponta Grossa) e um do Rio Grande do Sul. Quatro isolados (raça 337) de Viçosa, MG, constituíram o Grupo IV. O Grupo V foi formado por apenas dois isolados (PR e DF), um da raça 0 e outro da raça 69. Os três isolados da fase sexuada do fungo formaram o Grupo VI e dois isolados da raça 593, oriundos de Cristalina, GO, formaram o Grupo VII.

É válido frisar, mediante esta análise descritiva, que houve uma tendência à formação de grupos por estado de origem, notando a ocorrência de trocas de material genético dentro do estado. Esses resultados são fortalecidos por meio dos resultados de González et al. (1998) e Sicard et al. (1997), que verificaram que os agrupamentos promovidos por marcadores RAPD evidenciaram uma tendência de agrupar os isolados em relação à sua origem geográfica. Estes resultados discordam dos relatados por Alzate-Marin et al. (1997) que, ao analisarem a diversidade genética de raças de *C. lindemuthianum* não observaram correlação entre os grupos de raças com a origem geográfica; este resultado pode, talvez, ser atribuído à amostragem ineficiente das populações deste patógeno.

O Grupo IV, por exemplo, foi originado, possivelmente, por uma introdução de germoplasma no estado de Minas Gerais, visto que, além de os quatro isolados pertencerem a uma mesma região, constitui-se de uma só raça. Assim, a pequena dissimilaridade que os acompanha pode ter sido gerada pela necessidade de adaptação em uma outra cultivar. Observa-se que dois desses isolados, 337*3 e 337*4, foram encontrados infectando uma mesma cultivar, no mesmo campo de produção, o que pode justificar a maior similaridade existente entre esses dois isolados. Essa evidência pode ser extrapolada para o Grupo VII.

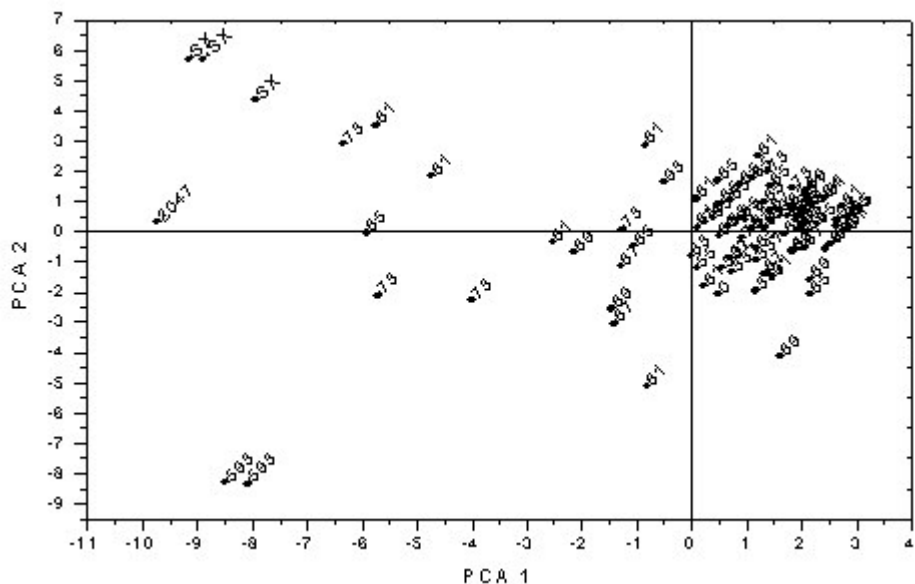


FIGURA 2 Diagrama de dispersão dos escores dos dois primeiros componentes para os dados binários obtidos por meio de marcadores RAPD.

Levando em consideração o caráter patogenicidade, não foi possível observar relação direta entre esses e o agrupamento fornecido por marcadores RAPD, o que já era conjecturado. Contudo, por meio da análise de componentes principais (Figura 2), foi evidenciada uma tendência de separação das raças mais raras (593 e 2047) quando comparadas às mais frequentes. Embora isso tenha ocorrido, permanece uma dúvida se esse efeito foi apenas regional, já que esses isolados são de regiões diferentes. Além disso, a probabilidade de as marcas utilizadas estarem associadas aos locos para patogenicidade é praticamente nula. Esses resultados concordam com os obtidos por Alzate-Marin et al. (1997). Ao analisarem a diversidade genética de raças de *C. lindemuthianum*, estes autores observaram que as raças previamente caracterizadas por testes de virulência não apresentaram correlação com a classificação obtida por marcadores RAPD, resultado aparentemente esperado,

visto que, a diversidade genética medida por marcadores moleculares baseia-se na análise aleatória de todo o genoma do fungo, podendo não haver correlação entre os locos utilizados na classificação molecular com os locos de patogenicidade. Os autores acreditam que o fungo tem sofrido um processo de evolução convergente, ou seja, indivíduos geneticamente divergentes têm adquirido o mesmo fenótipo de virulência. Porém, é válido frisar que isto pode ser verdadeiro para comparação entre raças mais simples; no entanto, quando comparam-se raças mais simples a raças mais complexas, tem-se observado uma certa separação; ainda não foi possível, contudo, diferenciar se isto é devido à complexidade das raças ou ao efeito de origem geográfica. Vários trabalhos relatam resultados similares (Vilarinhos et al., 1995; González et al., 1998; Alzate-Marin et al., 2001; Thomazella et al., 2002; Talamini et al., 2004).

É interessante ressaltar uma clara distinção entre os isolados pertencentes à fase assexual (*Colletotrichum lindemuthianum*) do fungo e à fase sexual (*Glomerella congulata*) – isolados 73 Gc1, 73 Gc2 e 73 Gc3 (Grupo VI) (Figuras 2 e 3). A melhor visualização foi permitida pela Figura 2 e deixa clara a separação dos isolados da fase sexuada (SX) em relação aos demais isolados. A maior divergência deve-se, possivelmente, à troca de material genético, proporcionando a formação de um grupo individualizado. Foi possível observar que essas raças (com fase sexual) apresentaram alta similaridade entre si. A troca de material genético justifica a dissimilaridade em relação aos isolados da fase assexuada. Esses resultados corroboram com os de Talamini et al. (2004), ao observarem a formação de um grupo (fase sexual) separado dos demais (fase assexual). É importante ressaltar que, ao utilizar marcadores tipo PCR, por exemplo, o gene CLPG - que codifica para a poligalactorunase, enzima importante para promover a degradação da parede celular do hospedeiro - não foi observada amplificação para dois isolados da fase sexuada (73*Gc1 e 73*Gc2), o que pode justificar as diferenças em termos de reação (sintomas mais

brandos) quando esses isolados são inoculados nas cultivares diferenciadoras. O oposto foi verificado na reação de amplificação do *primer* HPHR (gene de resistência à higromicina), em que não foi observada amplificação para o isolado 73*Gc3. Portanto, verifica-se que alguns isolados possuem a capacidade de apresentar desenvolvimento mesmo na presença de antibióticos. Camargo (2004), estudando isolados da fase sexuada por meio de marcadores RAPD, evidenciou a grande variabilidade que é gerada por este microrganismo por meio da meiose.

A maior similaridade genética (99%) foi detectada entre os isolados 337*3 e 337*4 (raça 337), os quais foram provenientes de Viçosa, além de terem sido encontrados infectando a mesma cultivar, CNFC 8045. Esse resultado fornece evidências à evolução adaptativa de Darwin, pois as duas raças estão sob as mesmas condições ambientais (infectam a mesma cultivar, no mesmo ambiente), por isso, possivelmente, o loco para patogenicidade é o mesmo e a parte do genoma amostrado mantém alta similaridade. Já os isolados 337*1 e 337*2 (raça 337), provavelmente, passaram por um processo evolutivo, o qual foi necessário para sobreviver em um novo ambiente (cultivar Talismã e Pérola, respectivamente). Resultados semelhantes foram relatados por Talamini (2004).

É possível visualizar que a raça 2047 proveniente dos Estados Unidos da América (USA) apresentou-se dissimilar em relação à maioria das raças estudadas (Figuras 2A e 2), evidenciando a distinção das raças de acordo com a sua origem geográfica. Esse resultado evidencia a necessidade de um organismo adaptar-se às condições em que vive; daí a maior diferenciação em relação aos outros isolados. No Brasil, ainda não há relato da presença dessa raça infectando a cultura do feijoeiro. Resultado semelhante foi registrado por Talamini et al. (2004), em que o estudo de similaridade genética revelou seis grupos, entre os quais o grupo II foi formado apenas pela raça 2047. Balardin et al. (1997), estudando a divergência genética em raças de *C. lindemuthianum*, verificaram

que a raça 2047 permaneceu em um grupo separado. Resultados similares também foram relatados por Thomazella et al. (2002) ao estudarem a divergência genética entre e dentro de raças (7, 31, 65, 69, 73, 81, 87, 89, 95 e 2047) por meio de RAPD. Neste estudo foi observada alta dissimilaridade genética entre as raças 7 e 2047, com distância de 94,33%; verificaram também a formação de quatro grupos, entre os quais o grupo III constituiu-se apenas pela raça 2047.

Um dos agrupamentos formados constituiu-se apenas pela raça 593 (593*1 e 593*2), revelando que raças mais complexas tendem a apresentar maior dissimilaridade em relação às raças mais simples. Isso foi também observado para os isolados das raças 337 e 2047. Talamini et al. (2004) não verificaram a separação da raça 593 em relação às raças 0, 8, 55, 64 e 83.

Elevada similaridade (98,39%) foi observada entre as raças 85*1 e 93*2; essas duas raças foram isoladas de plantas infectadas no estado do Paraná. O mesmo ocorreu com as raças 65*2 e 81*6 (97,6% de similaridade). Essas duas raças foram isoladas de campos de produção de Viçosa, MG. As raças 85*1, 93*2, 65*2, 81*6, 81*17 (Viçosa, MG) e 81*5 (Viçosa, MG) formaram um grupo com 96,67% de similaridade. Enfatiza-se que quatro desses isolados são de Viçosa, MG e dois são do estado do Paraná; isso leva à conclusão de que pode ter existido intercâmbio de sementes infectadas por *C. lindemuthianum* entre regiões, dificultando o agrupamento por região.

Esses resultados corroboram com os resultados de González et al. (1998), que verificaram ligeira tendência a agrupar isolados em relação à sua origem geográfica. Sicard et al. (1997) observaram certa relação entre a origem e o agrupamento promovido pelo RAPD. Já Fabre et al. (1995) não observaram relação entre a origem geográfica e o agrupamento utilizando a mesma técnica. Thomazella et al. (2002) verificaram que as raças 73, 81, 37, 87, 31, 69, 89 e 65 foram agrupadas em um só grupo, enquanto que Balardin et al. (1997),

utilizando a mesma técnica, verificaram o agrupamento das raças 81, 89, 31 e 73.

Uma possível explicação do agrupamento não consistente dos isolados por estado de coleta pode ser devido ao livre intercâmbio de sementes de feijoeiro possivelmente contaminadas, no Brasil. Outra hipótese para explicar o não agrupamento é o fato de raças estáveis, como as raças 65, 73 e 81, estarem presentes em vários locais, dificultando, portanto, o agrupamento. Esse fato é concordante com a falta de correlação ($r = 0,02$) evidenciada entre as similaridades médias dos isolados e distâncias geográficas entre os estados.

Devido à maior representatividade dos isolados de Minas Gerais, foi construído um dendrograma (Figura 3A) para melhor visualização da similaridade genética entre esses isolados. Esse dendrograma relaciona as sub-regiões do estado de Minas Gerais para melhor visualizar a dispersão dos isolados. Entre os 48 isolados, 20 são oriundos do Sul de Minas (SM), 16 da Zona da Mata Mineira (ZM), dez do Alto Paranaíba (AP), um do Noroeste de Minas (NW) e um do Norte de Minas (NM). A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sg_m), à direita (acima) do qual os acessos são considerados semelhantes. O sg_m para 1% de probabilidade foi de 0,896.

Considerando o dendrograma (Figura 3A), é possível observar a formação de cinco grupos (1% de significância). Os grupos formados são apresentados na Tabela 8. Entre os isolados avaliados, oito não formaram grupo a 1% de probabilidade.

O Grupo A é formado por 29 isolados, entre os quais situam-se onze (55%) dos isolados oriundos do Sul de Minas, além de 50% (oito) dos isolados oriundos da Zona da Mata. Entre os dez isolados provenientes da região do Alto Paranaíba, oito (80%) estão classificados nesse grupo. O Grupo B é formado por dois isolados, um da Zona da Mata (65*10ZM) e outro do Sul de Minas (65*7SM). Dois isolados provenientes do Sul de Minas (65*24SM e 65*6SM)

TABELA 8 Grupos de isolados considerando os resultados do UPGMA e do dendrograma, referentes aos isolados do estado de Minas Gerais (Figura 3A).

| ISOLADOS | | | | | |
|------------------------|-----------|-----------------------|----------|----------|----------|
| GRUPO A | | | | | |
| 8 SM ^{1/} | 64*1 SM | 65*2 ZM ^{2/} | 65*3 ZM | 65*5 ZM | 65*8 SM |
| 65*9 AP ^{3/} | 65*12 SM | 65*14 AP | 65*15 ZM | 65*20 AP | 65*22 AP |
| 65*23 NM ^{4/} | 73*2 SM | 81*3 AP | 81*4 SM | 81*5 ZM | 81*6 ZM |
| 81*7 AP | 81*8 SM | 81*10 NW | 81*11 AP | 81*16 SM | 81*17 ZM |
| 81*18SM | 87*1 ZM | 87*3 AP | 89*1 SM | 89*2 SM | |
| GRUPO B | | | | | |
| 65*7 SM | 65*10 ZM | | | | |
| GRUPO C | | | | | |
| 65*6 SM | 65*24 SM | | | | |
| GRUPO D | | | | | |
| 337*1 ZM | 337*2 ZM | 337*3 ZM | 337*4 ZM | | |
| GRUPO E | | | | | |
| 73*Gc1 SM | 73*Gc2 SM | 73*Gc3 SM | | | |

^{1/} Região Sul de Minas Gerais

^{2/} Zona da Mata Mineira

^{3/} Região do Alto Paranaíba

^{4/} Região Norte de Minas Gerais

constituem o Grupo C. Os quatro isolados pertencentes à raça 337 formam o Grupo D e são todos procedentes da Zona da Mata. Já o Grupo E é formado pelos isolados referentes à fase sexual do fungo *C. lindemuthianum*. Por intermédio desses resultados, pode-se inferir que existe uma tendência à formação de grupos de acordo com a região de origem, principalmente para raças de ocorrência rara.

É necessário enfatizar que a existência de uma tendência de agrupamento por raça, como pode ser observado nos Grupos B, C, D e E, não era esperado, visto que marcadores RAPD fazem uma amostragem geral do genoma e a caracterização da raça é feita com base em poucos locos. Pode-se explicar a formação proporcionada pelos grupos C, D e E pelo fato de os isolados terem sido encontrados em um mesmo campo de produção, portanto, em constante

evolução com as mesmas cultivares e sob mesmas condições ambientais. Vários trabalhos relatam a não existência de correlação entre a classificação obtida por meio da inoculação em cultivares diferenciadoras e o agrupamento obtido por marcadores RAPD (Alzate-Marin et al., 1997; Balardin et al., 1997; Talamini et al., 2004).

Percebe-se que houve uma tendência de agrupamento dos isolados por região de origem (sub-regiões do estado de Minas Gerais) por meio de marcadores RAPD. A dificuldade para agrupar os isolados por região pode ser explicada pelo livre intercâmbio de sementes infectadas com esporos de *C. lindemuthianum* entre regiões. Adicionalmente, os programas de melhoramento são, em maioria, baseados na introdução e avaliação de grande número de linhagens de diferentes origens. Vários levantamentos objetivando explicar a variabilidade do patógeno permitiram a observação de tendência de agrupamentos por região de origem (Alzate-Marin et al., 1997; Balardin et al., 1997; Sicard et al., 1997; González et al., 1998; Thomazella et al., 2002; Talamini et al., 2004).

4.2.2 Diversidade genética

Como mencionado, alguns índices (Nei e Shannon) de diversidade têm sido utilizados. O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera que, quanto mais próximo o valor for de zero, menor é a diversidade. Os índices de diversidade variaram de 0,1625 a 0,2623. Os índices para cada estado de coleta estão resumidos na Tabela 9.

A menor diversidade foi encontrada para o estado do Rio Grande do Sul, resultado aparentemente discordante do apresentado com base na inoculação em cultivares diferenciadoras, em que foi possível verificar a ocorrência de quatro raças distintas entre os quatro isolados amostrados; contudo, essas quatro raças diferem em poucos locos para patogenicidade, levando à baixa diversidade

detectada. A maior diversidade foi detectada para o estado de Goiás. Neste caso, os resultados apresentados pelo índice de Shannon concordam com os determinados com base na inoculação em cultivares diferenciadoras. A presença da raça 593 neste estado pode ter contribuído para a maior diversidade, podendo levar a uma hipótese de introdução do patógeno na região. Devido à dificuldade de amostragem de isolados de diferentes regiões, a análise da diversidade deve ser interpretada com cautela. O índice de Shannon foi estimado por Sicard et al. (1997), ao estudarem isolados de diferentes centros de diversidade de *P. vulgaris*. Estes autores encontraram maior diversidade entre os isolados do México e relataram que o índice de Shannon calculado com base em marcadores RAPD não corrobora com os resultados detectados por inoculação em cultivares diferenciadoras, tendo a maior diversidade sido detectada na Argentina. É importante frisar que o índice de Shannon foi calculado com base em informação de marcadores RAPD, os quais não estão diretamente relacionados aos locos para virulência.

TABELA 9 Índices de diversidade de Shannon, amplitude, média e variância das similaridades genéticas para 6 estados de coleta de isolados de *C. lindemuthianum*.

| Estados | Índice de Shannon | Amplitude das similaridades | Média das similaridades | Variâncias das similaridades |
|-------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Distrito Federal | 0,1725 | 0,7475-0,9310 | 0,8466 | 0,0049 |
| Goiás | 0,2623 | 0,6292-0,9697 | 0,7732 | 0,0122 |
| Minas Gerais | 0,1894 | 0,5753-0,9903 | 0,8538 | 0,0071 |
| Paraná | 0,2209 | 0,6222-0,9839 | 0,8237 | 0,0085 |
| Rio Grande do Sul | 0,1625 | 0,7789-0,9286 | 0,8512 | 0,0025 |
| São Paulo | 0,1814 | 0,7647-0,9027 | 0,8212 | 0,0052 |

A maior média e a amplitude das similaridades genéticas de Nei (Tabela 9) foram observadas no estado de Minas Gerais, enquanto que a menor média e a menor amplitude foram verificadas para os estados de Goiás e São Paulo, respectivamente. Os resultados observados para média de similaridade e o índice de Shannon indicam uma correlação negativa, alta e significativa ($r = - 0,89$), demonstrando que quanto menor a média da similaridade, maior será a diversidade genética.

É possível perceber, na Tabela 9, a existência de correlação positiva, alta e significativa ($r = 0,9754$) entre a variância das similaridades genéticas em cada estado com o índice de Shannon detectado. Portanto, a variância das similaridade genéticas pode ser usada para inferir sobre a diversidade de populações. Moura (2003), trabalhando com acessos de jaborandi, verificou a não existência de correlação entre a variância das similaridades genéticas e o índice de Shannon, a qual foi atribuída ao efeito de amostragem.

4.2.3 Análise de variância molecular

Para facilitar a discriminação da ocorrência de variação genética foram feitas hierarquizações da população em estudo e, posteriormente, realizada uma análise de variância molecular (AMOVA).

Na Tabela 10, encontra-se o resumo da análise de variância molecular dos resultados (5000 permutações) obtidos a partir de uma hierarquização feita em nível de Estados, em que cada estado foi considerado como uma população.

Pela AMOVA, verificou-se que a diferenciação genética existente entre os estados amostrados é altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0,075$, $p < 0,000$), sendo que 7,55% da variação genética está contida entre estados e 92,45% da variação existente encontra-se dentro das populações (estados). A livre troca de sementes dentro dos estados pode ter contribuído, substancialmente, para o incremento da variação dentro, em detrimento da variação entre estados. Estes resultados

TABELA 10 Resumo da análise de variância molecular para seis estados (mais de um isolado) de ocorrência do fungo (*C. lindemuthinum*) analisados por marcadores RAPD.

| F.V. | GL | SQ | Comp. de variância | % Total | Φ_{ST} | P |
|-------------------|----|---------|--------------------|---------|-------------|-------|
| Entre estados | 5 | 74,124 | 0,6582 | 7,55 | 0,075 | 0,000 |
| Dentro de estados | 78 | 628,959 | 8,0636 | 92,45 | | |
| Total | 83 | 703,083 | 8,7218 | 100,00 | | |

corroboram com os relatados por Mahuku et al. (2002) que, ao estudarem populações de *Phaeoisariopsis griseola* verificaram a não existência de diferenciação ($G_{ST} = 0,004$) entre os isolados, evidenciando que a variação total está contida dentro das raças.

Resultados diferentes foram relatados por Sicard et al. (1997), ao estudarem a diversidade genética entre isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de três centros de diversidade de *Phaseolus vulgaris*. Por meio da AMOVA ficou evidenciado que 58,46% da diversidade foi encontrada entre regiões. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de a amostragem diferir para cada país (México, Equador e Argentina), além de não ocorrer intercâmbio de sementes contaminadas entre estes países. Contudo, é essencial citar que nos países onde foram feitos os levantamentos dos isolados, plantam-se cultivares de conjunto gênicos (Andino e Mesoamericano) diferentes. Foi observado ainda que os isolados de países com maior proximidade física, no caso, Equador e Argentina, apresentaram maior similaridade.

Outra hierarquização foi feita em nível de raças, em que cada raça foi considerada como uma população. Posteriormente, foi feita a análise de variância molecular (Tabela 11). Neste caso, à semelhança da análise anterior, a maior parte da variação foi encontrada dentro de raças (80,85%). Verificou-se também que a diferenciação genética existente entre raças foi altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0,192$, $p < 0,000$).

TABELA 11 Resumo da análise de variância molecular para onze raças (mais de um isolado) do fungo (*C. lindemuthinum*) analisados por marcadores RAPD.

| F.V. | GL | SQ | Comp. de variância | % Total | Φ_{ST} | P |
|-----------------|----|---------|--------------------|---------|-------------|-------|
| Entre raças | 10 | 182,311 | 1,7047 | 19,15 | 0,192 | 0,000 |
| Dentro de raças | 68 | 489,309 | 7,1957 | 80,85 | | |
| Total | 78 | 671,620 | 8,9004 | 100,00 | | |

Diferentes isolados pertencem à mesma raça quando apresentam em comum, necessariamente, o mesmo genótipo para patogenicidade. Porém, os locos que foram amostrados por marcadores RAPD não necessariamente são iguais para uma mesma raça, justificando a elevada variação encontrada dentro das populações, pois, como foi observado, não houve relação entre as marcas moleculares e as raças caracterizadas por meio das diferenciadoras. Esses resultados estão de acordo com o agrupamento dos isolados, tanto no Brasil quanto em Minas Gerais, quando somente as raças raras ocorreram em grupos isolados, como a 593, a 337 e a 73 (provenientes de reprodução sexual). A maior parte da variação entre raças advém, por exemplo, do ocorrido com os isolados da raça 65 em Minas Gerais, nos grupos B e C. Possivelmente, a raça desses grupos originaram-se de raças diferentes por mutações e seleção direcional convergente. Inversamente, o grande número de raças diferentes dentro do mesmo grupo, dado o elevado grau de parentesco entre elas, possivelmente originou-se por mutações de uma mesma raça.

Fica, portanto, evidenciado que existe grande variação dentro de raças, o que fornece subsídios aos trabalhos que ressaltam o grande potencial deste fungo em gerar variabilidade (González et al., 1998; Camargo, 2004). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Moyano et al. (2003) ao estudarem populações de *Botrytis cinerea*, no qual verificaram que 96% da variação encontra-se dentro das populações.

5 CONCLUSÕES

As raças 65, 81 e 73 apresentam maior estabilidade em relação às demais, fato evidenciado por sua maior frequência observada neste levantamento e nos levantamentos dos últimos dez anos. Além disso, apresentaram maior dispersão geográfica.

O aparecimento das raças 337 e 593 justifica a necessidade de monitoramento da variabilidade do patógeno.

Não houve relação entre os locos amostrados por marcadores RAPD e a caracterização realizada por inoculação em cultivares diferenciadoras.

A maior variação está contida dentro de raças, evidenciando a elevada capacidade de variação deste patógeno.

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. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 199. p. 45.

ALZATE-MARIN, A. L. **Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares.** 1996. 65 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S.; FALEIRO, F. G.; CARVALHO, G. A.; PAULA Jr. , T. J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 85-88, mar. 1997.

ALZATE-MARIN, A. L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G. A. de; BAÍA, G. S.; PAULA JR. , T. J.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Identificação de marcadores RAPD para resistência à antracnose do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA/CNPAP, 1996. v. 1, p. 242-244.

AUGUSTIN, E.; COSTA, J. G. C. da. Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. no melhoramento do feijoeiro no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 265-272, 1971.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International/British Society for Plant Pathology, 1992. 388 p.

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, mar. 1997.

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. Interaction 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 bean in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, St. Paul, v. 1, p. 190-195, 1911.

BARRUS, M. F. Varietal susceptibility of beans to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) B. and C. **Phytopathology**, St. Paul, v. 8, p. 589-614, 1918.

BOLOÑOS, J. I. **Variación patogénica de aislamientos mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. Agente causal de la antracnosis del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1984. 70 p. Dissertação (Mestrado em Cali) - Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

BURKHOLDER, W. H. The gamma strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Brit. et Cav. **Phytopathology**, St. Paul, v. 13, n. 2, p. 316-323, 1923.

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.

CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; POMPEU, A. S.; FRANCISCO, F. G.; RAVAGNANI, 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, 1999.

CARDOSO, C. O. N. Fungos. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T. et al. **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1978. v. 1, p. 58-123.

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

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Informe Anual 1988**: programa de frijol. Cali, 1990. p. 128-129. (CIAT. Documento de Trabajo, 72).

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHUARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. (Ed.) **Problemas de produccion de frijol**: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticos de *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIATI, 1980. p. 37-53.

CRISPÍN-MEDINA, M. A.; CAMPOS-ÁVILA, J. Bean disease of importance in Mexico in 1975. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 60, n. 7, p. 534-535, July 1976.

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

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

De WIT, P. J. G. M. On guard. **Nature**, London, v. 416, p. 801-803, 2002.

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

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

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

DUDIENAS, C.; POMPEU, A. S. Nova raça fisiológica de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. no Estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 2., 1985, Campinas. **Resumos...** Campinas: IAC, 1985.

ECHANDI, E. Principales enfermedades de hongo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en los trópicos americanos em diferentes zonas ecológicas. **Phytopathology**, St. Paul, v. 8, p. 171-177, 1976.

EXCOFFIER, N. C.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

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.

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

FOUILLOUX, G. L'anthracnose du haricot (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. et Magn.): Nouvelles sources de résistance et nouvelles races physiologiques. **Annales De L'Amélioration des Plantes**, Paris, v. 26, p. 443-453, 1976.

GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; ZAVALA, M. E.; JABOCO, J. L.; HERNÁNDEZ, F.; ACOSTA, J.; MARTÍNEZ, O.; SIMPSON, J. 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.

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

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

HANTULA, J.; DUSABENYAGASANI, M.; HAMELIN, R. C. Random Amplified Microsatellite (RAMS) - a novel method for characterization genetic variation within fungi. **European Journal Forest Pathology**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 159-166, June 1996.

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

HUBBELING, N. Selection for resistance to antracnose particularly in respect to the Ebnet race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, v. 19, p. 49-50, 1976.

HUBBELING, N. The new iota race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, v. 20, p. 58, 1977.

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

KELLY, J. D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major genes resistance to plant pathogens. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 3, p. 461-465, June 1995.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro – *Phaseolus vulgaris* L. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 297-318.

KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: Further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 78, n. 6, p. 809-817, 1989.

KRUGER, J.; HOFFMANN, G. M.; HUBBELING, N. The kappa race of *Colletotrichum lindemuthianum* and sources of resistance to Anthracnose in *Phaseolus* beans. **Euphytica**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 23-25, Apr. 1977.

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

LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; FALEIRO, F. G.; DANTAS NETO, A.; MATSUOKA, K.; MARQUES, J. R. B. Diversidade genética de isolados de *Phytophthora capsici* de diferentes hospedeiros com base em marcadores RAPD patogenicidade e morfologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, set./out. 2003.

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

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.

McKAY, J. K.; LATTA, R. G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 17, n. 6, p. 285-291, June 2002.

MENEZES, J. R. de. **Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. em *Phaseolus vulgaris* L.** 1985. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MENEZES, J. R. de; DIANESE, J. C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 650-655, June 1988.

MENEZES, J. R. de; MOHAN, S. K.; BIANCHINI, A. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. No Estado do Paraná. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1., 1982, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1982. p. 287-298. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 1).

MESQUITA, A. G. G.; PAULA Jr., T.; BARROS, E. G. de. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the Aid of PCR – Based Molecular markers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1084-1087, Oct. 1998.

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

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOYANO, C.; ALFONSO, C.; GALLEGU, J.; RAPOSO, R.; MELGAREJO, P. Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 5, p. 512-522, June 2003.

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

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

OLIARI, L.; VIEIRA, C.; WILKINSON, R. E. Physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Plant Disease Report**, Beltsville, v. 57, n. 10, p. 870-872, Oct. 1973.

OLIVEIRA, E. A.; ANTUNES, I. F.; COSTA, J. G. C. da. **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)

PARADELA FILHO, D.; POMPEU, A. S. Ocorrência do grupo brasileiro I de *Colletotrichum lindemuthianum* da antracnose do feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 3, p. 194-197, maio/jul. 1975.

PASSOS-BUENO, M. R.; ZATZ, M. A. A técnica de PCR e suas aplicações em doenças genéticas humanas. In: LARA, F. J. S. (Org.). **Hibridação de ácidos nucléicos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p. 72-98.

PASTOR-CORRALES, M. A. Traditional and molecular confirmation of the coevolution of bean and pathogens in Latin América. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 1996.

PASTOR-CORRALES, M. A.; ERAZO, 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.

PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, A. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104.

PELOSO, M. J. Del. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. A. **La antracnosis del frijól comum, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali: CIAT, 1992. p. 86-108. (Doc. de trabajo, 113).

PIO-RIBEIRO, G.; CHAVES, G. M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, Viçosa, v. 19, n. 7, p. 95-118, Abr. 1975.

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

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMAN, M.; BRIONES, I. Determinación de Razas Fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 388-391, 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.

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

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

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

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

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

SANTOS, J. A. B. dos; CASTANHEIRA, A. L. M.; MELO, L. C. Emprego de marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a antracnose no feijão. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6., 1996, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA/CNPAF, 1996. v. 1, p. 263-264.

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.

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

SCHREIBER, F. Resistenzzuchtung bei *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 4, p. 415-454, 1932.

SHARMA, P. N.; KUMAR, A.; SHARMA, O. P.; SUD, D.; TYAGI, D. Pathogenic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* na evaluation of resistance in *Phaseolus vulgaris* in the North-Western Himalayan region of India. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 1, p. 41-45, 1999.

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, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 8, p. 807-813, Aug. 1997.

SILVA, M. V. da. **Identificação de marcadores RAPD ligado ao alelo Co-7 de resistência do feijão ao agente causal da antracnose**. 2000. 41 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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.

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

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology, and control**. Wallingford: CAB International/British Society for Plant Pathology 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.; ISHIKAWA, F. H. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão-comum em Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa, UFV: 2002. p. 187-189.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.; ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 371-375, abr./jun. 2004a.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; FERNANDES, F. R.; 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, 2004b. No prelo.

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. 35-37.

TU, J. C. Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) on white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Southern Ontario; spread of the disease from an infection focus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 477-480, June 1981.

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

VEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. de O. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa: EPAMIG, 1993. 131 p.

VILARINHOS, A. D.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 194-198, jun. 1995.

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

WALKER, J. C. **Plant pathology**. New York: Mcgraw-Hill, 1969. 819 p.

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

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

YERKES Jr., W. D. Additional new races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. **Pant Disease Report**, Beltsville, v. 42, n. 3, p. 329, Mar. 1958.

YERKES Jr., W. D.; ORTIZ, M. T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. **Phytopathology**, St. Paul, v. 46, n. 10, p. 564-567, Oct. 1956.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. **A monographic study of bean diseases and methods for theirs control**. Washington D.C.: USDA, 1957. 255 p. (USDA. Bulletin, 869).

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, Mar. 1994.

ANEXOS

ANEXO A

| | Página |
|--|---------------|
| TABELA 1A Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos 88 isolados (Isol.) de <i>C. lindemuthianum</i> | 79 |
| FIGURA 2A Dendrograma das similaridades genéticas entre os isolados de <i>C. lindemuthianum</i> oriundos de diferentes regiões do Brasil | 85 |
| FIGURA 3A Dendrograma das similaridades genéticas entre os isolados de <i>C. lindemuthianum</i> oriundos do estado de Minas Gerais..... | 86 |

TABELA 1A Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos 88 isolados (Isol.) de *C. lindemuthianum*.

| Isol. | Dados binários | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 55 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 64*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 64*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 65*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 65*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 65*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 65*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 65*6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 65*7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 65*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| 65*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 65*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 65*11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 65*12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| 73*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 73*1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 73*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | |
| 81*6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 81*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 83*1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 87*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 87*2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 87*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 89*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 89*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 337*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 337*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 337*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 337*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 593*1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 2047*1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| 73*Gc1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 73*Gc2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 73*Gc3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 81*2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 69*6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 65*13 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*13 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 65*16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 73*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 91*1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 93*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 69*3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 65*14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*17 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*12 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 67*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 97*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*19 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 85*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 69*7 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 87*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 73*6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 93*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 65*20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*24 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*17 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 593*2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 65*22 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| Amost. | Dados binários | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64*2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 65*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 65*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*6 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*7 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 65*8 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 65*9 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 65*11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 65*12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 73*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 73*1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 73*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 81*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 81*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 81*6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 81*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 83*1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 87*1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 87*2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 87*3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 89*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 89*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 337*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 337*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 337*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 337*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 593*1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2047*1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 73*Gc1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 73*Gc2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 73*Gc3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 69*6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 81*13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 73*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 69*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

“...Continua...”

“TABELA 1 A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 73*3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | |
| 69*2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 91*1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 93*1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 69*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 81*14 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*17 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*18 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*10 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 67*1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 69*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 97*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*19 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 85*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*7 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 87*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 93*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*20 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*24 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*16 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*17 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 593*2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| Amost. | Dados binários | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64*2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 65*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 65*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 65*7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*8 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*9 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*10 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 65*12 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 73*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 73*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 81*5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 81*8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 81*9 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 83*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 87*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 87*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 87*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 89*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 89*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 337*1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 337*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 337*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 337*4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 593*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2047*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*Gc1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 73*Gc2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 73*Gc3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 65*13 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 81*13 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 73*8 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 73*3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 69*2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 91*1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 93*1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 69*3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 65*14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 65*17 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*18 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65*1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 81*1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 65*15 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*10 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 81*11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 67*1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69*4 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 97*1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*4 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 65*19 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 85*1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 73*5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 73*11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 69*7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 87*4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73*6 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 73*7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*15 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 93*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 81*18 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 65*20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 65*21 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 65*24 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 81*16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 65*23 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 81*17 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 593*2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 65*22 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

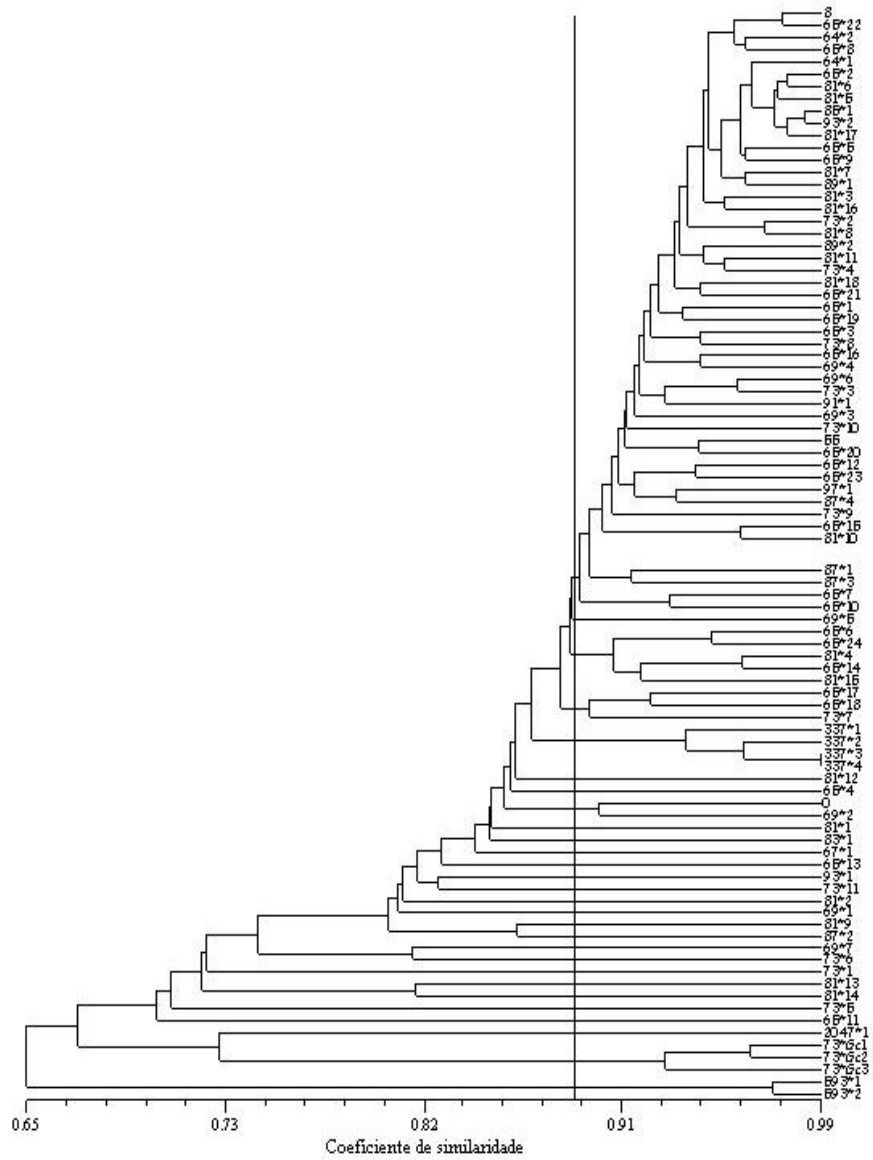


FIGURA 2A Dendrograma das similaridades genéticas entre os isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil.

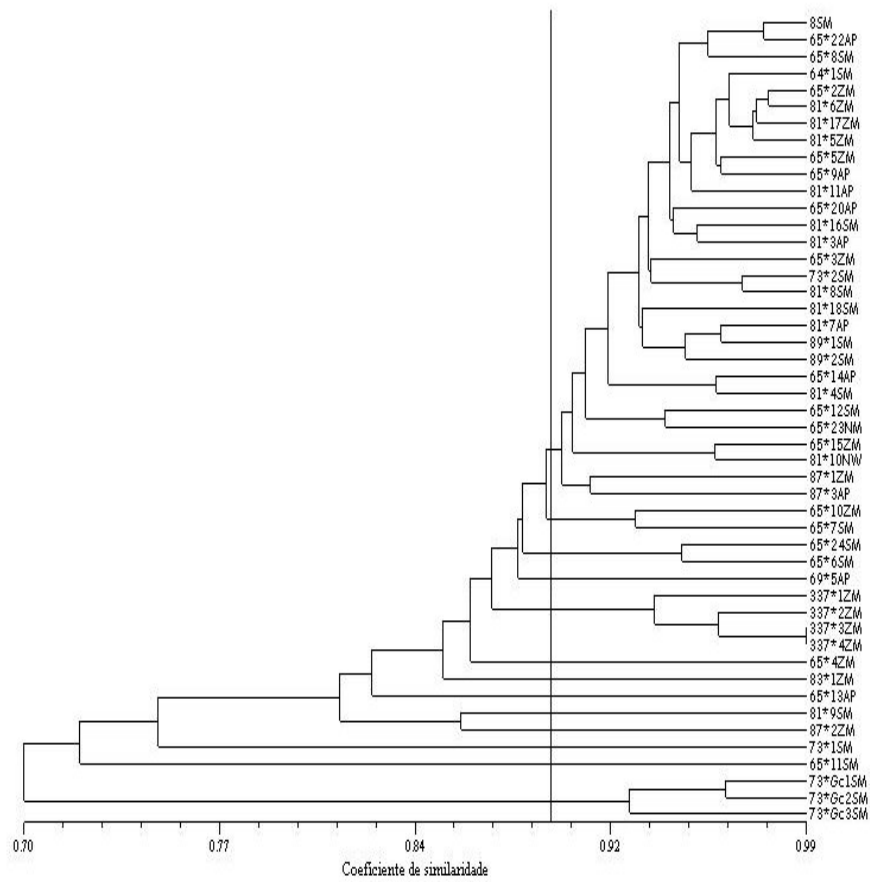


FIGURA 3A Dendrograma das similaridades genéticas entre os isolados de *C. lindemuthianum* oriundos do estado de Minas Gerais.