



**JOYCE MENDES ANDRADE PINTO**

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS SEXUAIS E  
ASSEXUAIS DE LESÕES DE ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**JOYCE MENDES ANDRADE PINTO**

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS SEXUAIS E ASSEXUAIS DE LESÕES  
DE ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

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

Orientadora

Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS – MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Pinto, Joyce Mendes Andrade.

Variabilidade de isolados sexuais e assexuais de lesões de  
antracnose do feijoeiro / Joyce Mendes Andrade Pinto. – Lavras :  
UFLA, 2012.  
103 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.  
Orientador: Elaine Aparecida de Souza.  
Bibliografia.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. *Glomerella cingulata* f. sp.  
*phaseoli*. 3. Variabilidade genética. 4. Compatibilidade sexual. 5.  
Conídios. 6. Tubos de anastomose. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

**JOYCE MENDES ANDRADE PINTO**

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS SEXUAIS E ASSEXUAIS DE LESÕES  
DE ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

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

APROVADA em 3 de julho de 2012.

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dra. Marisa Vieira de Queiroz	UFV
Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2012**

*Aos meus pais, Rozanita e Miguel, pelo amor, carinho e apoio ininterruptos. Ao meu esposo, Antônio, pelo amor, carinho, dedicação e paciência.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que está à frente de todas minhas decisões e vitórias.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o Doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos no exterior (doutorado sanduíche).

À University of Kentucky (EUA) e ao Department of Plant Pathology, por ter me recebido como estudante visitante e permitido o aperfeiçoamento deste trabalho.

À professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza, pelos conselhos, compreensão, ensinamentos e amizade nesses anos de convivência.

À Dra. Lisa Vaillancourt, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na University of Kentucky e pela orientação e valiosas contribuições a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, professor Eduardo Alves, professor João Bosco dos Santos, professora Marisa Vieira de Queiroz e professora Patrícia Gomes de Cardoso, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Rafael, Mariana, Quélen, Tânia, Lucas, Jerônimo, Francine e Larissa, pela ajuda, conselhos, sugestões e convivência diária.

À amiga Suellen, pelo auxílio na realização de trabalhos e pelo imenso carinho com que nos relacionamos.

Ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Ao professor Eduardo Alves e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, que permitiram a realização de parte dos trabalhos.

Aos colegas do *Department of Plant Pathology* da University of Kentucky, Maria, Sladna, Etta, Gao, Olga, Melanie e Mihir, pela convivência e por terem me recebido, sempre muito prestativos.

À minha querida amiga Ester, que facilitou imensamente minha adaptação no período em que estive nos EUA, pelos momentos inesquecíveis e pelo auxílio nos trabalhos realizados.

Aos funcionários do DBI, Zélia, Rafaela, Heloísa, Irondina e Du, e a Elaine Ribeiro, pela convivência e auxílio durante o curso.

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

A toda minha família e, principalmente, a minhas irmãs.

A cada um dos meus amigos eternos de graduação, que deixaram saudades da convivência diária e maravilhosa, quando tudo se iniciou.

A meus pais, que me deram toda educação e discernimento para lutar e nunca desistir e, principalmente, pelo amor e carinho.

Ao meu esposo, Antonio, por quem o tempo de convivência só fez aumentar a admiração e o carinho, por me apoiar e por lutar junto comigo.

A todos aqueles que lutaram, pensaram ou agiram em meu favor, obrigada por existirem.

## RESUMO

Antracnose do feijoeiro, causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, interfere negativamente na produção do feijão no Brasil. A fase sexual do patógeno, *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, tem sido isolada de lesões de antracnose em plantas de feijoeiro coletadas do campo no Brasil. Entretanto, os isolados da fase sexual têm demonstrado características que os diferem dos isolados assexuais. Dessa forma, este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar populações da fase assexual e sexual, obtidas a partir de lesões de antracnose do feijoeiro, visando detectar e quantificar a diversidade dentro e entre as populações. Para tanto, foram analisados dados de patogenicidade, morfológicos, fisiológicos, culturais e moleculares de cada população, para fomentar as discussões a respeito da hipótese de mais de uma espécie estar envolvida neste complexo sistema. Foram avaliados 74 isolados de *C. lindemuthianum* e 73 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Os caracteres avaliados demonstraram alta variabilidade dentro e entre as populações. Testes de patogenicidade indicaram que, diferente da população assexual, os isolados da população sexual não causam sintomas quando inoculados na cultivar suscetível Pérola, exceto para seis isolados que apresentaram esporulação semelhante aos isolados da fase assexual. O índice de velocidade do crescimento micelial e o diâmetro colonial demonstraram que os isolados sexuais apresentam crescimento micelial mais rápido que os isolados assexuais. Porcentagem de germinação da população sexual, na média, também foi superior à apresentada pelos isolados assexuais. Na comparação das dimensões dos esporos, os conídios da população assexual foram maiores do que os conídios da população sexual. Em ambas as populações foram observados tubos de anastomose entre conídios (CATs) e septo nos conídios germinados, em proporções variando de acordo com o isolado. Para os ascósporos não se detectaram tubos de anastomose e 100% se mostraram septados após a germinação. Não foi observada compatibilidade sexual entre os isolados da população assexual, fato que ocorreu entre os isolados da população sexual. O par de *primers* específico para os isolados de *C. lindemuthianum* amplificou somente para os isolados assexuais, enquanto o par de *primers* desenhado para a população sexual amplificou para os isolados sexuais, exceto para aqueles que apresentaram sintomas quando inoculados na cultivar Pérola. Estes isolados não se agruparam com nenhum outro isolado na árvore filogenética, a qual também separou os isolados sexuais do isolado de *C. lindemuthianum*. Conjuntamente, os resultados apresentados neste estudo sugerem que mais de uma espécie está envolvida neste sistema patógeno-hospedeiro. Sugerimos, portanto, que os isolados da fase sexual, descritos na literatura como *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, os quais são provenientes de colônias monoscópicas, não pertencem à mesma espécie dos isolados da fase

asexual, provenientes de colônias monospóricas, descritos na literatura como *C. lindemuthianum*.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*. *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Variabilidade genética. Compatibilidade sexual. Tubos de anastomose entre conídios.

## ABSTRACT

Common bean anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, resulting in severe yield losses in Brazil. The sexual phase, *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, have been isolated from anthracnose lesions on common bean plants in the field in Brazil. However, sexual isolates show several characteristics not coincident with asexual isolates. The objective of this work was to analyse asexual and sexual populations from lesions of anthracnose beans to investigate the variability within and between populations. We evaluated several characteristics like pathogenicity, morphology, physiology, cultural and molecular data from each population, to discuss the hypothesis if there is more than one species in this complex system. We analysed 74 isolates of *C. lindemuthianum* and 73 isolates of *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. All characteristics showed high variability within and between populations. Pathogenicity assays indicated, differently of asexual isolates, sexual isolates do not cause symptoms when inoculated on susceptible cultivar Perola, excepting for six isolates that present sporulation similar to asexual isolates. Indexes of mycelial growth rate and colony diameter assays indicated that sexual isolates grow faster than asexual isolates. Percentage of germination of sexual population was higher than the percentage showed by the asexual population. Conidial cytology indicated that asexual population presents conidia bigger than sexual population. In both population, sexual and asexual, were observed fusion of conidial anastomosis tubes (CATs) and septa formation after germination, in different proportions, depending of strain analysed. We did not observe anastomosis tubes in ascospores and 100% of them presented septa after germination. Sexual compatibility was showed only to isolates of sexual population. Specific primers to *C. lindemuthianum* isolates (HMGCLF e HMGCLR) amplified only to isolates of asexual population. Whereas primers designated to sexual population (HMGGLOF e HMGGLOL) amplified to *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* isolates, excepting for six isolate that cause symptoms when inoculated on susceptible cultivar Perola. Those six isolates did not group with another isolate in the phylogenetic tree. In the phylogenetic tree *C. lindemuthianum* isolate did not group with the sexual isolates tested. Those results showed in this study suggest that more than one species can be found on this pathogen-host system. Therefore, we conclude that isolates of sexual phase, described in the literature as *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* are not from the same species that isolates of asexual phase, described in the literature as *C. lindemuthianum*.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*. *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Genetic variability. Sexual compatibility. Conidial anastomosis tubes.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Antracnose do feijoeiro .....	14
2.2	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ( <i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i> ) .....	16
2.3	Variabilidade patogênica em <i>C. lindemuthianum</i> .....	18
2.4	Variabilidade genética de caracteres morfológicos e fisiológicos em <i>C. lindemuthianum</i> e suas fontes de variação .....	21
2.4.1	Ciclo parassexual .....	23
2.4.2	Recombinação via fusão de CATs .....	24
2.4.3	Reprodução sexual .....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1	Isolamento e condições de cultivo .....	31
3.2	Testes de patogenicidade .....	32
3.3	Caracterização morfológica das colônias sexuais .....	36
3.4	Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial .....	37
3.5	Avaliação da porcentagem de germinação .....	37
3.6	Caracterização citológica dos esporos .....	38
3.7	Compatibilidade sexual .....	39
3.8	Extração de DNA total .....	39
3.9	Análises de PCR .....	40
3.10	Sequenciamento e análise filogenética .....	42
3.11	Compatibilidade vegetativa .....	43
3.12	Análises de RAPD .....	45
3.13	Análises estatísticas .....	47
4	RESULTADOS .....	48
4.1	Testes de patogenicidade .....	48
4.2	Caracterização morfológica das colônias sexuais .....	49
4.3	Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial .....	50
4.4	Avaliação da porcentagem de germinação .....	53
4.5	Caracterização dos esporos e anastomose entre conídios e entre ascósporos .....	54
4.6	Compatibilidade sexual .....	58
4.7	Análises de PCR .....	73
4.8	Sequenciamento e análise filogenética .....	73
4.9	Compatibilidade vegetativa .....	75
4.10	Análises de RAPD .....	78

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro comum, no Brasil, é submetida a muitos estresses bióticos e abióticos que causam redução expressiva na produtividade e afetam a qualidade do produto. Entre eles destaca-se a ação de fitopatógenos causadores de doenças. A antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro, especialmente em localidades com temperaturas de moderadas a frias e alta umidade relativa, com perdas que podem chegar a ordem de 100% (KIMATI et al., 1997).

*Colletotrichum lindemuthianum* é um fungo filamentosos que se reproduz assexualmente (SUTTON, 1992). No entanto, a estrutura populacional e a diversidade genética e fenotípica deste patógeno são semelhantes às de populações originadas de reprodução sexuada (BRYGOO et al., 1998). A fase sexual do patógeno é denominada *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (KIMATI; GALLI, 1970). Em algumas regiões produtoras de feijão, no Brasil, a fase sexual tem sido isolada com frequência a partir de lesões típicas de antracnose do feijoeiro provenientes do campo, sem nenhum tipo de indução (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2010b; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010).

Além da reprodução sexual, outros mecanismos que permitem a transferência de material genético tem sido descritos na literatura para *C. lindemuthianum*, tais como o ciclo parassexual (CASTRO-PRADO et al., 2007) e a recombinação assexual via fusão de tubos de anastomose entre conídios (ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011). Visto que a maior limitação para o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro resistentes à antracnose é a alta variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum*, estes mecanismos podem auxiliar consideravelmente o aumento da diversidade genética apresentada por este patógeno.

Estudos utilizando isolados pertencentes à fase sexual do patógeno demonstram que estas colônias apresentam algumas características que as diferem das colônias da fase assexuada (BARCELOS, 2010; BARCELOS; SOUZA; SILVA, 2011; ISHIKAWA et al., 2010b). Sintomas em plântulas de feijoeiro, quando inoculadas com *G. cingulata* f. sp. *Phaseoli*, são mais brandos e diferentes daqueles induzidos pela fase assexuada (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007). Barcelos (2010) analisou os eventos pós-infecção utilizando linhagens transformantes expressando a proteína verde fluorescente. Em experimentos de coinoculação do isolado sexual transformante e o isolado assexuada selvagem, foi observada a formação de hifas do isolado transformante sobre as lesões de antracnose causadas pelo isolado selvagem, sugerindo que ambos os isolados podem colonizar as mesmas lesões de antracnose.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar, separadamente, uma população de 74 isolados da fase assexuada do patógeno e uma população de 73 isolados da fase sexual do patógeno, visando detectar e quantificar a diversidade dentro de cada população e entre as populações. Para tanto, foram analisados dados de patogenicidade, morfológicos, fisiológicos, culturais e moleculares para fomentar as discussões a respeito da hipótese de mais de uma espécie estar envolvida nesse complexo sistema.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Antracnose do feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos componentes básicos da dieta alimentar em países em desenvolvimento das regiões subtropicais, sendo uma importante fonte de proteínas, carboidratos, ferro e fibra alimentar, especialmente para a população de baixa renda (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa, com produção anual de 3,5 milhões de toneladas (BRASIL, 2011). No entanto, a produtividade média do feijoeiro em todo o território nacional ainda está muito aquém de seu potencial produtivo, com rendimento de 950 kg/ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2011), devido a uma série de fatores bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam os problemas fitossanitários, que acarretam perdas para a qualidade e a produtividade do feijoeiro (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2010).

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro comum em regiões subtropicais e temperadas, especialmente em localidades com temperaturas de moderadas a frias (13-27 °C) e alta umidade relativa (acima de 91%) (KIMATI et al., 1997). As perdas ocasionadas por esta doença podem ser da ordem de 100%, principalmente quando sementes contaminadas são utilizadas para plantio e ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (CHAVES, 1980). Além de diminuir o rendimento da cultura, os sintomas da antracnose depreciam a qualidade do produto, por ocasionarem manchas nos grãos, tornando-os impróprios para o consumo (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

Os sintomas da antracnose aparecem em todos os estágios de crescimento, nos órgãos aéreos da planta, a partir de seis dias do contato com o fungo (CHAVES, 1980; KIMATI et al., 1997). O patógeno pode afetar as sementes, produzindo lesões nos tecidos dos cotilédones logo após a emergência das plântulas. As sementes infectadas são ligeiramente descoloridas, podendo apresentar cancras, cuja coloração varia de amarelo a café-escuro ou negro (SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994). No pecíolo e no caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura (SARTORATO, 1988). Nas folhas, as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escuras a negras. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por um bordo de coloração laranja-avermelhada. Essas lesões podem coalescer e cobrir parcialmente as vagens. Sob temperatura e umidade adequadas, observa-se a esporulação rosada no centro das lesões (SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994).

Diversas estratégias para o controle da doença têm sido propostas para este patógeno (PINTO; SOUZA; OLIVEIRA, 2010; WORDELL FILHO, 2004). Atualmente, a mais comumente utilizada é o emprego de cultivares resistentes do feijoeiro comum, por apresentar grande potencial para minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. Entretanto, devido à existência de muitas raças fisiológicas e da alta variabilidade de *C. lindemuthianum*, o controle genético e a obtenção de cultivares resistentes duráveis se tornam extremamente difíceis (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Para o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose, algumas informações são necessárias. Entre elas, destacam-se o conhecimento dos níveis de variabilidade dentro e entre populações do patógeno e a

determinação das raças predominantes nas principais regiões de cultivo do feijoeiro comum (PINTO et al., 2010; RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2003).

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

O patógeno *C. lindemuthianum* (Sacc. e Magn.), agente etiológico da antracnose do feijoeiro (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994), é um fungo hemibiotrófico intracelular e se reproduz assexuadamente, produzindo conídios hialinos, unicelulares e cilíndricos (KIMATI et al., 1997). Na fase perfeita, o patógeno é conhecido como *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, pertencente à classe dos Ascomicetos. Produz, em estado sexual, peritécio e ascos, dentro dos quais se originam os conídios denominados ascósporos (KIMATI; GALLI, 1970).

O patógeno apresenta várias estruturas infectivas, dentre as quais se encontram tubos germinativos, apressórios, hifas primárias e secundárias. Os conídios de *C. lindemuthianum* apresentam capa esponjosa, porosa, composta por uma série de glicoproteínas. Durante o processo infectivo, o conídio adere à cutícula e germina, emitindo o tubo germinativo que se diferencia, formando o apressório. Dos apressórios emergem as hifas de penetração, que penetram diretamente na cutícula (O'CONNELL et al., 2000).

Nas cultivares suscetíveis para o patossistema *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris*, as células penetradas se mantêm, inicialmente, vivas. Durante a fase biotrófica, a membrana plasmática e o protoplasma da célula do vegetal se expandem e invaginam em torno da vesícula infectiva e da hifa primária. Após 24 horas da penetração, a membrana plasmática do hospedeiro perde a integridade, o que causa a degeneração e a consequente morte da célula vegetal. As hifas intracelulares começam a retirar nutrientes das células mortas, iniciando a fase necrotrófica. Sem a indução dos mecanismos de defesa por parte da

planta, a morte das células vegetais acarreta o aparecimento dos sintomas macroscópicos da doença. Hifas primárias continuam os processos biotróficos e as hifas secundárias colonizam o tecido, intra e intercelularmente. Com isso, iniciam-se a apresentação de sintomas e a produção de compostos de defesa na planta, a partir do sexto dia após o início da infecção (KIMATI et al., 1997; O'CONNELL et al., 2000).

Na sua fase sexual, o fungo produz um corpo de frutificação denominado peritécio, com diâmetro que varia de 85 a 300  $\mu\text{m}$ . A parede do peritécio é hialina e, à medida que envelhece, torna-se enegrecida a partir do ápice. O canal do peritécio é forrado por paráfises (filamentos estéreis dos corpos de frutificação) e os rostros, quando presentes, medem de 30 a 80  $\mu\text{m}$ . Dentro dos peritécios estão os ascos em formato de bastão ou cilíndricos, com parede fina contendo de 1 a 8 ascósporos arranjados aleatoriamente. Os ascos são em número médio de 30 por peritécio, medem 60 x 8  $\mu\text{m}$  e são envolvidos por paráfises filiformes e delicadas até o 27º dia do seu desenvolvimento. Os ascósporos não possuem septo, sendo hialinos, fusiformes e curvados. Os mesmos podem ser alantoides (20 x 6,5  $\mu\text{m}$ ) e elipsoidais (10 x 4  $\mu\text{m}$ ) (BAILEY; JEGER, 1992; KIMATI; GALLI, 1970).

Na literatura, tem sido descrito que os sintomas em plântulas de feijoeiro, quando inoculadas com *G. cingulata* f. sp. *Phaseoli*, são mais brandos e diferentes que aqueles induzidos pela fase assexual (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007). Ishikawa et al. (2010a) concluíram que essa diferença de sintomas apresentada pelas fases do patógeno, sexual e assexual, não são caracterizadas por eventos de pré-penetração, pois os mesmos são similares, quando comparados por meio do uso de microscopia eletrônica. Barcelos (2010) verificou, em estudo posterior utilizando microscopia de luz e de fluorescência, que as estruturas pós-penetração, como vesícula de infecção e hifas primárias, não foram encontradas para o isolado da fase sexual, 72 horas após a inoculação,

em uma cultivar de feijoeiro suscetível (Pérola). Em contrapartida, o isolado da fase assexual, quando inoculado na mesma cultivar, apresentou a formação destas estruturas após 72 horas da infecção.

Barcelos (2010) também analisou os eventos pós-infecção utilizando linhagens transformantes expressando a proteína verde fluorescente. Em experimentos de coinoculação do isolado sexual transformante e o isolado assexual selvagem, foi observada a formação de hifas do isolado transformante sobre as lesões de antracnose causadas pelo isolado selvagem. Os resultados sugerem que ambos os isolados podem colonizar as mesmas lesões de antracnose e, portanto, explicam porque as linhagens sexuais têm sido isoladas com frequência do campo, a partir de lesões de antracnose.

A estrutura populacional de *C. lindemuthianum* tem revelado que, apesar do modo de reprodução ser predominantemente assexual, as populações mantêm um padrão de espécies de acasalamento ao acaso, ou seja, com equilíbrio gamético, sugerindo que, em algum momento do ciclo do hospedeiro, o patógeno se reproduza sexuadamente (BRYGOO et al., 1998; CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2003). A reprodução sexual permite que novas combinações de alelos sejam geradas a cada ciclo de recombinação, conduzindo a um alto nível de diversidade genética na população do patógeno. Portanto, a ocorrência da reprodução sexual pode explicar grande parte da ampla variabilidade presente em *C. lindemuthianum*.

### **2.3 Variabilidade patogênica em *C. lindemuthianum***

O patógeno *C. lindemuthianum* tem ampla diversidade de virulência, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética (PEREIRA et al., 2010; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Esta alta variabilidade torna essencial o monitoramento

constante deste patógeno para auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes de feijão, como principal alternativa no controle da doença (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994). Segundo Pastor-Corrales et al. (1994), essa alta diversidade pode ser explicada em função da coevolução patógeno x hospedeiro.

A primeira comprovação da existência de variabilidade patogênica em *C. lindemuthianum* foi obtida por Barrus (1911), ao constatar que cultivares de feijoeiro inoculadas com isolados de diferentes procedências apresentavam comportamento diferenciado. Nos anos seguintes, diversos trabalhos foram realizados, indicando a ampla variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* em várias partes do mundo (AUGUSTIN; COSTA, 1971; MENEZES, 1985; OLIVEIRA; ANTUNES; COSTA, 1973; PIO-RIBEIRO; CHAVES, 1975; SCHREIBER, 1932; YERKES; ORTIZ, 1956).

Até meados da década de 1970, diferentes classificações eram utilizadas, não havendo um consenso quanto à nomenclatura das raças, o que dificultava a comparação de resultados e a troca de informações entre os pesquisadores. Com o objetivo de resolver este problema, o Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT (1990) propôs um sistema de identificação de raças fisiológicas baseado na definição de doze cultivares diferenciadoras e no uso do sistema binário proposto por Habgood (1970) (Tabela 1).

Nos anos seguintes, diversos estudos de levantamento de raças foram sendo realizados, comprovando a alta variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* (ISHIKAWA et al., 2005; SARTORATO, 2002; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007; TALAMINI et al., 2004). Recentemente, Pereira et al. (2010), ao estudarem a reação das cultivares diferenciadoras, avaliando 33 isolados de *C. lindemuthianum* oriundos do estado de Minas Gerais, verificaram a ocorrência de seis diferentes raças (1, 64, 65, 66, 73 e 81), sendo as raças 65 e 81 as mais frequentes neste levantamento. Confrontando estes dados com os

resultados obtidos por Abreu, Ramalho e Menu (1993), pode-se reafirmar a importância da realização de levantamentos periódicos para o direcionamento de programas de melhoramento genético, considerando que aqueles autores identificaram a presença das raças 89 e 119 em Minas Gerais, que não mais foram encontradas na região, no levantamento realizado por Pereira et al. (2010).

Tabela 1 Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro utilizadas na atual classificação de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*

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

É possível observar, por meio do levantamento realizado por Mahuku e Riascos (2004) com 200 isolados de vários países no mundo, que todas as cultivares diferenciadoras já tiveram a sua resistência quebrada por isolados de *C. lindemuthianum*. Este fato demonstra que o uso das doze cultivares diferenciadoras não é totalmente eficiente para a determinação da variabilidade patogênica apresentada pelo patógeno. Essa deficiência da metodologia na detecção da variabilidade apresentada pela espécie foi também evidenciada por meio dos resultados obtidos por Davide e Souza (2009) e pode mascarar uma diversidade de raças ainda maior do que a conhecida atualmente. Ishikawa, Ramalho e Souza (2011) realizaram um estudo visando identificar linhagens de

feijoeiro comum que, usadas adicionalmente às 12 cultivares diferenciadoras, seriam capazes de detectar variação dentro da raça 65, raça predominante em levantamentos realizados no estado de Minas Gerais. Eles concluíram que a inclusão de seis linhagens (Estilo, Majestoso, Supremo, União, Valente, Madrepérola e Talismã) no teste de patogenicidade dos isolados da raça 65 poderia auxiliar na detecção real da variabilidade existente para esta raça e, conseqüentemente, para o patógeno.

Atualmente, mais de cem raças de *C. lindemuthianum* já foram identificadas em todo o mundo (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Vários mecanismos são responsáveis pela ampliação desta variabilidade em fungos fitopatogênicos. O estudo destes mecanismos é necessário para a elaboração de estratégias que possam ser utilizadas em programas de melhoramento de cultivares de feijoeiro visando à resistência a esse patógeno.

#### **2.4 Variabilidade genética de caracteres morfológicos e fisiológicos em *C. lindemuthianum* e suas fontes de variação**

A variabilidade genética de *C. lindemuthianum* é demonstrada tanto pela presença de diversas raças quanto pela ocorrência de numerosas características morfológicas, fisiológicas e culturais (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Algumas características deste patógeno, essenciais para o desenvolvimento e a disseminação do mesmo, apresentam grande variação entre diferentes isolados, inclusive entre isolados de uma mesma raça patogênica. Entre esses caracteres podem-se destacar o índice de velocidade do crescimento micelial, o diâmetro colonial e a porcentagem de germinação dos conídios (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Outras características, igualmente variáveis, podem ainda ser utilizadas na taxonomia do gênero *Colletotrichum*. Ocorrência da fase sexual, dimensão dos esporos e presença ou

ausência de septo em esporos após a germinação são exemplos de caracteres que são utilizados para este fim (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992).

Tanto a forma meiospórica como a mitospórica são altamente variáveis (SUTTON, 1992). Alguns trabalhos foram realizados para analisar a amplitude de variação do comprimento e da largura dos conídios de espécies do gênero *Colletotrichum*, demonstrando que esta característica pode ser utilizada para a identificação das diferentes espécies do gênero (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). As espécies desse gênero, em geral, se caracterizam pela presença de septos em conídios germinados. No entanto, dados da literatura afirmam que a espécie *C. lindemuthianum* não apresenta a formação de septo nos conídios germinados em condições de laboratório (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992). Para a fase sexual, trabalhos também demonstram ampla variação no comprimento e largura de ascósporos (ROCA et al., 2003; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007).

A mutação é a fonte básica de variação genética e a heterocariose e a heteroplasmose conduzem à variação em fungos selvagens (HASTIE, 1981). A recombinação por meio do ciclo sexual é a forma mais comum de aumento da variabilidade genética. No entanto, em fungos filamentosos pode haver outros mecanismos de transferência de material genético, como a ocorrência do ciclo parassexual (CASTRO-PRADO et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2012) e a recombinação não meiótica via fusão de CATs (ISHIKAWA et al., 2012; ROCA et al., 2004) que podem levar, conjuntamente ou separadamente, ao polimorfismo cromossômico (KISTLER; MIAO, 1992; O'SULLIVAN et al., 1998) e ao rearranjo do genoma (O'SULLIVAN et al., 1998).

### 2.4.1 Ciclo parassexual

Anastomoses entre hifas é um evento de conexão celular que pode ser de dois tipos: em forma de H e adjacente. Nos fungos, para que ocorra cruzamento, é necessária a fusão entre tipos sexuais diferentes, um pré-requisito para a reprodução sexuada. No entanto, fusões entre hifas vegetativas são observadas em fungos filamentosos. Para tal, o processo inicial de anastomose também é requerido (GRIFFITHS, 1995).

A heterocariose é conseguida em fungos filamentosos, por meio das anastomoses entre hifas que permitem a troca ou passagem do núcleo, bem como parte do citoplasma. Anastomoses entre hifas foram encontradas em *C. lindemuthianum*, sem verificar a passagem de núcleo, por Ishikawa, Souza e Davide (2008), Mendes-Costa, Davide e Roca (1998) e Rodriguez-Guerra et al. (2003). O próximo passo deste processo seria a fusão de núcleos, obtendo-se diploides heterozigotos e, em seguida, haveria a produção dos recombinantes (AZEVEDO, 1998).

Existem mecanismos genéticos que restringem a formação de heterocários entre indivíduos geneticamente diferentes (GLASS; JACOBSEN; SHIU, 2000). Em fungos filamentosos existem o reconhecimento sexual, que é controlado pelos locos *mat* e o reconhecimento vegetativo, que é controlado pelo loco *het* (SAUPE, 2000). Quando indivíduos sofrem a fusão celular, se estes tiverem o mesmo genótipo *het*, ocorre a heterocariose. Se eles diferirem geneticamente para este loco, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (SAUPE, 2000).

Acredita-se que a incompatibilidade vegetativa funcione como um sistema de reconhecimento da fusão entre diferentes indivíduos para limitar a passagem de elementos infecciosos, prevenir a exploração por núcleos mal

adaptados e/ou prevenir que recursos sejam retirados durante a reprodução sexual, sendo, portanto, um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (GLASS; JACOBSEN; SHIU, 2000). Estes mesmos autores sugerem que a seleção atuaria sobre os locos *het* para a manutenção do polimorfismo em populações de fungos. Saupe (2000) comenta que a função dos genes *het* é preservar a individualidade genética.

A compatibilidade vegetativa refere-se à capacidade de uma hifa vegetativa formar anastomose e heterocário estável, podendo ser utilizada na análise da diversidade e da estrutura de populações naturais. Isolados que são vegetativamente compatíveis são descritos como membros de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa, ou VCG (LESLIE, 1993). Isolados dentro de um mesmo grupo VCG são capazes de trocar informações genéticas via ciclo parassexual.

A classificação de isolados em VCGs pode ser uma importante ferramenta para a análise de populações em fungos (SAUPE, 2000). Barcelos, Souza e Silva (2011) utilizaram 47 isolados pertencentes a diferentes raças de *C. lindemuthianum* para análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). Neste trabalho, observou-se a formação de 45 grupos de compatibilidade vegetativa, tendo 44 isolados sido incompatíveis e em apenas uma combinação foi observada a formação do heterocário. A alta incompatibilidade entre os isolados utilizados neste estudo pode ser explicada pela autoincompatibilidade, pois a formação de heterocários foi baixa, evidenciando a grande variabilidade existente nesta espécie.

#### **2.4.2 Recombinação via fusão de CATs**

Outro tipo de conexão celular é anastomose entre conídios. Roca et al. (2003) descreveram um tipo de célula especializada encontrada em diferentes

espécies de *Colletotrichum*, denominado tubos de anastomoses conidiais (*conidial anastomosis tubes* - CATs). A formação destas pontes entre conídios de *C. lindemuthianum* parece ser um processo tardio, uma vez que estas estruturas só foram observadas após o final da esporulação.

Em *C. lindemuthianum*, foi demonstrado que os CATs são responsáveis pela fusão entre conídios em corpos de frutificação assexuais e que núcleos e organelas podem se mover de um conídio para o outro através das anastomoses. CATs acontecem durante o ciclo assexual de *C. lindemuthianum*, dando a oportunidade para genótipos diferentes da espécie encontrarem-se num complexo comum. Esse fato pode levar ao surgimento de fenótipos diferentes, com base em outros preexistentes (ROCA et al., 2004).

Anastomose entre conídios pode ser uma forma alternativa para a ocorrência de troca de metabólitos, organelas e material genético. Ainda que os conídios sejam iguais, do mesmo isolado, os CATs podem ser importantes para incrementar as chances de estabelecimento da colônia e/ou para transferência de genes (ROCA et al., 2003). Além disso, a porcentagem de formação de CATs é influenciada pelo meio utilizado para o crescimento, pela idade da cultura, sendo mais frequente em colônias mais velhas, e também varia de acordo com o isolado analisado (ISHIKAWA et al., 2010b).

Ishikawa et al. (2012) realizaram análises *in vivo* utilizando isolados transformados com proteínas fluorescentes vermelha e verde, respectivamente. Os autores observaram o comportamento nuclear durante a fusão de CATs. A incompatibilidade do heterocário foi observada entre as colônias de isolados vegetativamente incompatíveis, resultando em morte celular. No entanto, a fusão de CATs entre conídios uninucleados destes isolados incompatíveis não causou a reação de incompatibilidade. Os núcleos vermelhos e verdes da combinação destes isolados mostraram migrar de um conídio para outro, formando o heterocário e, posteriormente, ocorreu a mitose. A formação de núcleos

amarelos resultantes desta combinação após a fusão foi observada em 27% dos heterocários formados.

Neste mesmo trabalho, os autores confirmaram que a formação de heterocários como consequência da fusão de CAT pode gerar isolados com fenótipos distintos, provavelmente devido à geração de novos genótipos. Eles realizaram testes de patogenicidade utilizando as cultivares diferenciadoras e a cultivar suscetível Pérola. Foram inoculados os isolados selvagens, os isolados transformantes e quatro isolados derivados de colônias heterocarióticas. Concluiu-se que os isolados recombinantes não foram semelhantes quanto à patogenicidade aos seus respectivos parentais e, portanto, que a fusão de CATs é um mecanismo potencial de recombinação não meiótica nesta espécie, gerando variabilidade por meio da transferência horizontal de genes.

#### **2.4.3 Reprodução sexual**

A reprodução sexual é indicada como a principal fonte de variabilidade para fungos (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000). Edgerton (1914) fez a primeira descrição do sistema sexual em *Glomerella cingulata*. Neste estudo, foram caracterizados dois tipos de isolados autoférteis, “plus” e “minus”. Isolados “plus” formam massas aglomeradas de peritécios férteis em cultura e isolados “minus” produzem peritécios espalhados por toda a superfície em vez de grumos, sendo estes últimos menos férteis. Embora ambos os tipos de isolados fossem homotáticos, quando certas combinações de “plus” e “minus” foram realizadas, uma ponte preta visível de peritécios férteis se desenvolvia no local onde as duas culturas entravam em contato, indicando a presença de cruzamento. Posteriormente, Wheeler e McGahen (1952) propuseram as denominações de CP para peritécios agrupados e SP para a descrição de peritécios espalhados. Estas denominações seriam equivalentes aos isolados “plus” e “minus”, respectivamente.

Os pesquisadores brasileiros Kimati e Galli (1970), observando a produção de peritécios em culturas onde foram pareados isolados de *C. lindemuthianum*, relataram que os isolados foram estéreis quando crescidos sozinhos, mas, em certos pareamentos, desenvolveram alguns peritécios férteis. Eles concluíram que os isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* analisados eram heterotáticos. No entanto, o padrão das combinações férteis, nestes resultados, não era consistente com o modelo de um loco *mating type* com dois alelos, característico dos ascomicetos heterotáticos (BURNETT, 1976).

Anos antes, Wheeler (1954) já havia proposto que o heterotalismo em *G. cingulata* é derivado do homotalismo devido a mutações nos genes que controlam passos na via morfogenética, necessária para a autofertilidade. Entre os vários estágios da reprodução sexual, alelos mutantes poderiam estar atuando como “bloqueadores” genéticos parciais ou completos, interrompendo o processo sexual. Esse tipo especial de heterotalismo foi denominado de não balanceado. Enquanto nos sistemas heterotáticos verdadeiros os genes *mating type* ocupam o mesmo loco genético e progênies autoférteis não são produzidas (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000), no heterotalismo não balanceado a progênie derivada de cruzamentos entre linhagens heterotáticas não balanceadas é homotática, devido à recombinação entre locos mutantes (WHEELER, 1956).

Estudos posteriores indicam que o gênero *Glomerella* não se encaixa exatamente dentro das categorias homotática ou heterotática, apresentando espécies sexualmente ambíguas (BAILEY; JEGER, 1992). Nas espécies *G. cingulata* e *G. graminicola* alguns isolados apresentam heterotalismo verdadeiro ou não balanceado, enquanto outros são homotáticos (VAILLANCOURT; HANAU, 1991, 1992; WHEELER, 1954). Bryson (1990) ressaltou que a sexualidade em *G. cingulata* pode não ser necessariamente correspondente a um sistema de acasalamento simples, devido à ocorrência de isolados homotáticos e

heterotáticos. Este aparente heterotalismo pode ser o resultado de um estímulo mútuo de um ou ambos os isolados, resultando em um “desbloqueio” genético parcial ou completo do processo sexual.

O patógeno *G. graminicola* não apresenta o sistema de *mating type* padrão para fungos ascomicetos, nos quais existe um loco com duas formas alternativas. Para esta espécie acredita-se haver múltiplos *mating types* que são determinados, provavelmente, por mais de um loco no genoma. Em cruzamentos utilizando isolados deficientes em melanina e tipos selvagens, observou-se a produção de peritécios pigmentados e sem pigmentação. Estes resultados evidenciam a natureza não usual deste sistema *mating type*, visto que, em ascomicetos, tanto a parede do peritécio quanto o citoplasma da progênie possuem herança uniparental (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000).

Alguns trabalhos visando estudar o controle genético da sexualidade em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* foram realizados. Entre eles, pode-se destacar o que foi realizado por Mendes-Costa (1996), no qual se obtiveram cruzamentos em todas as combinações possíveis entre os oito ascósporos obtidos de ascos individuais de três linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Neste trabalho, não foi verificada a formação de peritécios na linha de contato entre as colônias e, desse modo, os isolados foram descritos como homotáticos. No entanto, em estudo posterior (não publicado), realizado com o objetivo de explicar a compatibilidade sexual, realizaram-se inúmeros cruzamentos entre linhagens distintas e observou-se, na segregação dos ascos, a ocorrência de recombinantes. Dessa forma, pode-se inferir que o fungo se comporta tanto como homotático quanto heterotático, dependendo das combinações realizadas.

Cisar e TeBeest (1999) realizaram cruzamentos entre cinco isolados autoestéreis de *G. cingulata* de noz-pecã em todas as combinações possíveis. As progênies de ascósporos foram isoladas de cada cruzamento, testadas para autofertilidade e retrocruzadas com ambos os parentais. Os resultados obtidos

foram consistentes com um sistema de cruzamento composto por um único loco *mating type* apresentando múltiplos alelos. Rodriguez-Guerra et al. (2005) realizaram um estudo com 19 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e relataram que todos os isolados eram autoestéreis, tendo somente uma combinação produzido peritécios férteis. Foram obtidas as culturas monoascospóricas, as quais foram analisadas com marcadores AFLP para confirmar o cruzamento sexual entre os dois isolados, ficando evidente o comportamento heterotático da espécie.

Em estudo posterior, Camargo Júnior et al. (2007) realizaram cruzamentos entre isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e identificaram recombinantes provenientes de um dos cruzamentos entre dois isolados, utilizando marcadores RAPD. De acordo com os resultados, foi observado comportamento pseudo-homotático para esses isolados. No entanto, Souza, Camargo Júnior e Pinto (2010) verificaram que os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* apresentaram comportamento homotático, realizando pareamentos dois a dois entre os isolados de ascósporos ao acaso de cinco populações e análises moleculares com marcadores RAPD.

Mais recentemente, García-Serrano et al. (2008) realizaram um trabalho com o objetivo de caracterizar o gene *MATI-2-1* a partir do cruzamento de isolados de *G. cingulata* coletados em diversos hospedeiros, utilizando técnicas de clonagem e sequenciamento. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que, embora este gene seja conservado em ascomicetos, os mecanismos que definem o padrão de acasalamento no gênero *Glomerella* é distinto para o sistema de dois idiomorfos descritos para outros membros do filo, pois ambos os parentais compatíveis sexualmente apresentaram o idiomorfo *MATI-2*.

Nos últimos anos, vêm sendo realizados vários estudos genéticos da fase sexual utilizando marcadores morfológicos e moleculares, evidenciando a formação de recombinantes (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; MENDES-

COSTA, 1996; RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2005; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010). A fase teleomórfica tem sido observada em isolamentos vindos do campo e mantidos em condições de laboratório (BARCELOS, 2010; CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2010a). No entanto, o papel da reprodução sexual em populações naturais deste fitopatógeno ainda é discutido.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento e condições de cultivo

Foram utilizados 147 isolados obtidos a partir de lesões típicas de antracnose em vagens, folhas e pecíolos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) naturalmente infectados, provenientes do campo. As coletas foram realizadas nos municípios de Lavras e Lambari, no sul do estado de Minas Gerais, no ano de 2009, sendo amostradas diversas plantas e diferentes cultivares em um mesmo local. Para os isolamentos, pequenos pedaços de tecidos infectados foram desinfetados e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura M3 (JUNQUEIRA et al., 1984). A partir dos isolamentos, foram selecionadas, visualmente, culturas com morfologia característica da fase assexual da espécie, ou seja, com coloração marrom-clara a negra e ampla produção de conídios (Figura 1A) e culturas com morfologia característica da fase sexual da espécie, ou seja, com coloração branca e produção de peritécios férteis, sem uso de indução à fase sexual (Figura 1B).

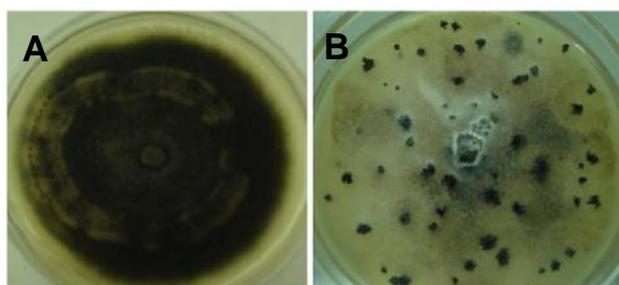


Figura 1 Culturas com morfologia característica da fase assexual *C. lindemuthianum* e da fase sexual *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. (A) Colônia com coloração marrom-escuro e ampla produção de conídios, características da fase assexual da espécie e (B) colônia com coloração branca e produção de peritécios férteis, características da fase sexual da espécie

Para as culturas assexuais foram obtidas 74 culturas monospóricas, provenientes de diferentes lesões. Os códigos utilizados indicam que os isolados pertencem à micoteca da UFLA, a letra C indica que os isolados selecionados são da espécie *C. lindemuthianum* e a numeração caracteriza a lesão da qual o isolado foi proveniente. Os isolados monospóricos foram mantidos em meio de cultura M3, a 22 °C, no escuro (Tabela 2). Para as culturas sexuais, um ou dois peritécios por colônia foram esmagados e, destes, foi obtida uma cultura monoascospórica. Os códigos utilizados representam que os isolados pertencem à micoteca da UFLA, a letra G indica que os isolados amostrados são da espécie *G. cingulata* f. sp. *Phaseoli* e o primeiro e o segundo número indicam, respectivamente, a lesão e o peritécio que deram origem ao isolamento. Um total de 73 culturas puras, conidiais e ascospóricas, foram isoladas e armazenadas a 22 °C, no escuro, em meio de cultura M3 (Tabela 3).

### 3.2 Testes de patogenicidade

Para a determinação das raças, realizou-se a inoculação de cada isolado monospórico de *C. lindemuthianum* e de cada isolado conidial de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* no conjunto de doze cultivares diferenciadoras propostas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1990). Para cada cultivar diferenciadora mais a cultivar suscetível Pérola foram utilizadas oito sementes. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor com substrato Plantimax. Para a obtenção da suspensão de conídios, vagens de feijoeiro estéreis foram inoculadas com cada isolado de *C. lindemuthianum* e incubadas, a 22 °C, por 10 dias no escuro. Entretanto, os isolados conidiais de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* não apresentaram boa esporulação quando inoculados em vagens de feijoeiro, formando somente um micélio aéreo de coloração branca, sem nenhuma produção de esporos nestas condições, com exceção dos isolados UFLAG85-1,

UFLAG86-1, UFLAG89-1, UFLAG92-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1, que apresentaram boa esporulação, quando submetidos a esta mesma metodologia. Alternativamente, para estes isolados que não apresentaram esporulação em vagem, cerca de seis placas contendo meio de cultura M3 foram inoculadas e incubadas, a 22 °C, por 10 dias, no escuro.

A suspensão de conídios ( $1,2 \times 10^6$  conídios/mL) foi pulverizada em plântulas com dez dias até o ponto de escorrimento. As plântulas de feijoeiro foram incubadas em câmara de nevoeiro, a 22 °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 95%, por 48 horas. Posteriormente, as bandejas foram transferidas para casa de vegetação e as plântulas de feijoeiro avaliadas quanto à severidade da antracnose, dez dias após a inoculação, utilizando a escala descrita por Rava et al. (1993). Foram consideradas resistentes as plântulas que receberam notas de 1 a 3 e aquelas com notas iguais ou maiores que 4 foram consideradas suscetíveis. A identificação da raça foi realizada seguindo o sistema de nomenclatura proposto por Habgood (1970).

Tabela 2 Código dos isolados, hospedeiro e local de coleta dos 74 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* analisados

Isolado	Hospedeiro	Local	Isolado	Hospedeiro	Local	Isolado	Hospedeiro	Local
UFLAC121	Carioca MG	Lambari	UFLAC156	BRScampeão	Lambari	UFLAC181	Majestoso	Lavras
UFLAC122	Carioca MG	Lambari	UFLAC157	Valente	Lambari	UFLAC182	Valente	Lambari
UFLAC130	Valente	Lambari	UFLAC158	CFNP 10773	Lambari	UFLAC183	Supremo	Lambari
UFLAC131	Magnífico	Lambari	UFLAC159	Ouro negro	Lambari	UFLAC184	Majestoso	Lavras
UFLAC132	CFNP 9506	Lambari	UFLAC160	VCU vp23	Lambari	UFLAC185	Supremo	Lambari
UFLAC134	Magnífico	Lambari	UFLAC161	Elite carioca	Lambari	UFLAC186	Pérola	Lambari
UFLAC135	CFNP 9434	Lambari	UFLAC162	Supremo	Lambari	UFLAC187	Majestoso	Lavras
UFLAC136	Magnífico	Lambari	UFLAC163	Majestoso	Lavras	UFLAC188	CFNP 10773	Lambari
UFLAC137	Talisma	Lambari	UFLAC164	Majestoso	Lavras	UFLAC189	VCU BRS 9461	Lambari
UFLAC138	CFNP 9434	Lambari	UFLAC165	Valente	Lambari	UFLAC190	Majestoso	Lavras
UFLAC139	CFNP 9506	Lambari	UFLAC166	Majestoso	Lavras	UFLAC191	Majestoso	Lavras
UFLAC140	CFNP 9506	Lambari	UFLAC167	Majestoso	Lavras	UFLAC192	Majestoso	Lavras
UFLAC141	Pérola	Lambari	UFLAC168	Pérola	Lambari	UFLAC193	Majestoso	Lavras
UFLAC142	CFNP 9506	Lambari	UFLAC169	Pérola	Lambari	UFLAC194	Majestoso	Lavras
UFLAC143	CFNP 9434	Lambari	UFLAC170	Majestoso	Lavras	UFLAC195	Majestoso	Lavras
UFLAC144	Valente	Lambari	UFLAC171	Pérola	Lambari	UFLAC196	Majestoso	Lavras
UFLAC145	Pérola	Lambari	UFLAC172	Majestoso	Lavras	UFLAC197	Majestoso	Lavras
UFLAC146	Valente	Lambari	UFLAC173	Majestoso	Lavras	UFLAC198	Majestoso	Lavras
UFLAC147	Pérola	Lambari	UFLAC174	Majestoso	Lavras	UFLAC199	Pérola	Lambari
UFLAC148	Pérola	Lambari	UFLAC175	Majestoso	Lavras	UFLAC200	CFNP 9506	Lambari
UFLAC149	Pérola	Lambari	UFLAC176	Majestoso	Lavras	UFLAC201	Valente	Lambari
UFLAC152	Rp1	Lambari	UFLAC177	Majestoso	Lavras	UFLAC202	Supremo	Lambari
UFLAC153	Rp1	Lambari	UFLAC178	Majestoso	Lavras	UFLAC203	CFNP 10792	Lambari
UFLAC154	Majestoso	Lavras	UFLAC179	Majestoso	Lavras	UFLAC204	CVIII 1194	Lambari
UFLAC155	Majestoso	Lavras	UFLAC180	Majestoso	Lavras			

Tabela 3 Código dos isolados, hospedeiro e local de origem dos 73 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* analisados

Isolado	Hospedeiro	Origem	Isolado	Hospedeiro	Origem	Isolado	Hospedeiro	Origem
UFLAG05-1	Majestoso	Lavras	UFLAG45-1	Majestoso	Lambari	UFLAG91-1	Majestoso	Lavras
UFLAG07-1	Majestoso	Lavras	UFLAG46-1	Majestoso	Lambari	UFLAG92-1	Majestoso	Lavras
UFLAG07-2	Majestoso	Lavras	UFLAG47-1	Majestoso	Lambari	UFLAG93-1	Majestoso	Lavras
UFLAG08-1	Majestoso	Lavras	UFLAG47-2	Majestoso	Lambari	UFLAG97-1	Majestoso	Lavras
UFLAG10-1	11 x-7	Lambari	UFLAG48-1	Majestoso	Lambari	UFLAG98-1	Majestoso	Lavras
UFLAG13-1	Majestoso	Lambari	UFLAG49-1	Majestoso	Lambari	UFLAG99-1	Majestoso	Lavras
UFLAG15-1	Majestoso	Lambari	UFLAG54-1	10 x - 1	Lambari	UFLAG101-1	Majestoso	Lavras
UFLAG15-2	Majestoso	Lambari	UFLAG54-2	10 x - 1	Lambari	UFLAG104-1	Majestoso	Lavras
UFLAG20-1	Magnífico	Lambari	UFLAG55-1	Magnífico	Lambari	UFLAG104-2	Majestoso	Lavras
UFLAG21-1	Pérola	Lambari	UFLAG60-1	MA II 2x - 3	Lambari	UFLAG106-1	Majestoso	Lavras
UFLAG21-2	Pérola	Lambari	UFLAG61-1	MA II 2x - 3	Lambari	UFLAG106-2	Majestoso	Lavras
UFLAG23-1	Pérola	Lambari	UFLAG64-1	Magnífico	Lambari	UFLAG107-1	Majestoso	Lavras
UFLAG25-1	Magnífico	Lambari	UFLAG68-1	Pérola	Lavras	UFLAG108-1	Majestoso	Lavras
UFLAG26-1	Magnífico	Lambari	UFLAG73-1	10 x - 1	Lambari	UFLAG109-1	Majestoso	Lavras
UFLAG29-1	Magno12R26	Lambari	UFLAG73-2	10 x - 1	Lambari	UFLAG110-1	Majestoso	Lavras
UFLAG30-1	Magnífico	Lambari	UFLAG74-1	10 x - 1	Lambari	UFLAG111-1	Majestoso	Lavras
UFLAG30-2	Magnífico	Lambari	UFLAG75-1	10 x - 1	Lambari	UFLAG112-1	Majestoso	Lavras
UFLAG34-1	Magnífico	Lambari	UFLAG79-1	6x - 19	Lambari	UFLAG113-1	Majestoso	Lavras
UFLAG35-1	Pérola	Lambari	UFLAG82-1	Majestoso	Lavras	UFLAG114-1	Majestoso	Lavras
UFLAG36-1	Pérola	Lambari	UFLAG83-1	Majestoso	Lavras	UFLAG116-1	Majestoso	Lavras
UFLAG37-1	Pérola	Lambari	UFLAG84-1	Majestoso	Lavras	UFLAG117-1	Majestoso	Lavras
UFLAG39-1	MA II 2x - 3	Lambari	UFLAG85-1	Majestoso	Lavras	UFLAG118-1	Majestoso	Lavras
UFLAG41-1	MA II 2x - 3	Lambari	UFLAG86-1	Majestoso	Lavras	UFLAG119-1	Majestoso	Lavras
UFLAG43-1	Pérola	Lambari	UFLAG88-1	Majestoso	Lavras			
UFLAG43-2	Pérola	Lambari	UFLAG89-1	Majestoso	Lavras			

### 3.3 Caracterização morfológica das colônias sexuais

Para a caracterização morfológica das colônias sexuais, os 73 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* foram analisados em meio de cultura M3, avaliando-se a coloração e a produção de esporos (ascósporos e/ou conídios), seguindo uma adaptação da classificação proposta por Chilton e Wheeler (1949).

No agrupamento proposto pelos autores, os isolados foram agrupados em quatro classes distintas: 1) conidial A: são aqueles isolados não periteciais que apresentam produção de conídios em massas de esporos; 2) conidial B: são os isolados não periteciais que produzem conídios esparsos; 3) plus: são os isolados periteciais com produção de peritécios em grumos e 4) minus: os isolados periteciais com produção de peritécios espalhados. Na Figura 2, mostram-se os quatro grupos nos quais os isolados foram distribuídos, segundo Chilton e Wheeler (1949).

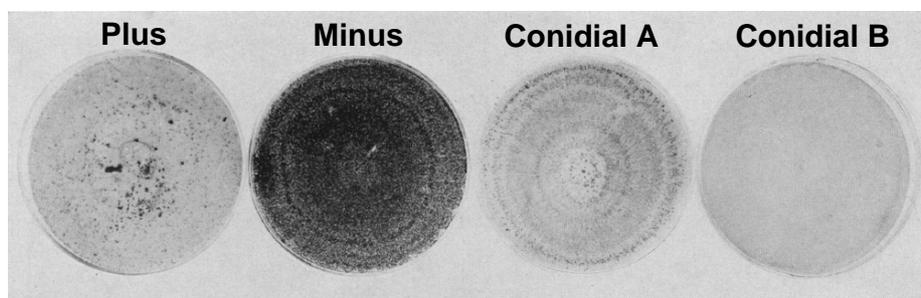


Figura 2 Classificação morfológica proposta por Chilton e Wheeler (1949). Os autores distinguem colônias com produção de peritécios ou de conídios e, adicionalmente, se eles são produzidos em grumos ou de maneira esparsa

### **3.4 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial**

Para avaliação do IVCM e do diâmetro colonial foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. A parcela foi constituída por uma placa de Petri de 80 mm de diâmetro. Discos de micélio de 6 mm de diâmetro provenientes de segunda repicagem foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio M3 e incubadas, no escuro, a 22 °C .

O IVCM foi avaliado por meio da leitura das médias, em milímetros, entre os dois diâmetros ortogonais da colônia, em intervalos de 24 horas, durante 15 dias e estimado de acordo com a expressão  $IVCM = \sum(Dc - Dp) / N$ , em que Dc é a média atual do diâmetro colonial, Dp é a média do anterior do diâmetro colonial e N é o número de dias após a inoculação (OLIVEIRA, 1991). O diâmetro colonial foi determinado medindo-se os diâmetros ortogonais das colônias em milímetros, após 15 dias de incubação. Análises de regressão de quatro isolados com valores extremos de diâmetro colonial foram realizadas para cada população.

### **3.5 Avaliação da porcentagem de germinação**

Para a avaliação da porcentagem de germinação de conídios e ascósporos, um experimento em DIC foi conduzido em esquema de parcela subdividida no tempo, com duas repetições. Foram utilizadas suspensões de esporos ajustadas para  $1,2 \times 10^6$  esporos/mL para cada isolado, após 15 dias da inoculação em vagens de feijoeiro ou em placas contendo meio de cultura M3, respectivamente para isolados assexuais e sexuais.

Uma alíquota de 500 µL foi espalhada em placas de Petri contendo meio água-ágar 0,5%. Após 24 e 48 horas, a 22 °C, no escuro, avaliaram-se 50 esporos

por repetição, por meio de microscopia de luz. Os esporos, conídios ou ascósporos que apresentaram tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que o menor diâmetro do esporo foram considerados germinados.

### **3.6 Caracterização citológica dos esporos**

Foram avaliados os seguintes caracteres: dimensão de esporos (comprimento e largura), formação de septo após a germinação e formação de tubos de anastomoses entre conídios e entre ascósporos.

Para tanto, suspensões de conídios ou ascósporos, na concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/mL, foram obtidas como descrito anteriormente, a partir de vagens ou placas contendo M3, após 18 dias de incubação. Foram gotejados 200  $\mu$ L das suspensões de esporos em uma célula em lâmina de cultivo de oito células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubadas, a 22 °C, no escuro, por 24 horas. Amostras foram examinadas após ser adicionado o corante Calcofluor White, na concentração de 0,12 M, por 3 a 4 minutos, em temperatura ambiente, usando um microscópio de epifluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1). A fluorescência foi detectada a 420/70 nm, utilizando-se a objetiva de 40x. Imagens do microscópio de epifluorescência foram capturadas por meio do software Axiovision Zeiss e processadas pelo software Image J.

Para as medições citológicas, foram analisados 30 esporos não germinados de cada isolado em DIC. A largura e o comprimento dos esporos ( $\mu$ m) foram obtidos utilizando-se o software Image Tool 3.0. Os esporos germinados de cada isolado foram classificados de acordo com a presença ou a ausência de septo e a formação de CATs foi quantificada como a porcentagem de esporos envolvidos em fusões (ISHIKAWA et al., 2010b). Para esta análise foram realizadas duas repetições, sendo avaliados 200 esporos por repetição.

### **3.7 Compatibilidade sexual**

Para avaliação da compatibilidade sexual, os isolados foram confrontados considerando-se todas as combinações possíveis entre os isolados da população assexuada (2775) e entre os isolados da população sexual (2701), incluindo o pareamento de cada isolado com ele mesmo. Para tanto, discos miceliais de 6 mm de diâmetro foram pareados, a uma distância de 2 cm um do outro, em placas contendo meio de cultura M3, utilizando-se duas repetições por tratamento. A avaliação foi realizada após 15 dias de incubação, a 22 °C, no escuro.

A formação de uma linha de contato negra com presença de peritécios entre os isolados confrontados indicou a ocorrência de compatibilidade sexual. Para a confirmação da fertilidade dos cruzamentos foram utilizadas membranas de diálise, as quais não permitem o contato entre os isolados, mas conservam a troca de moléculas indutoras da produção de peritécios por um dos isolados na linha de contato, caso esse fenômeno esteja ocorrendo. Os isolados foram classificados como homotáticos, quando autofértis, ou seja, quando apresentaram produção de peritécios férteis na ausência de um parceiro sexual e/ou heterotáticos, quando apresentaram compatibilidade sexual com produção de peritécios férteis e viáveis em qualquer combinação, desde que não os produzissem mais na ausência de contato entre os isolados.

### **3.8 Extração de DNA total**

Para a obtenção da massa micelial, pequenos discos de meio de cultura contendo micélio do fungo foram transferidos para erlenmeyers contendo aproximadamente 125 mL de meio de cultura líquido M3. Os frascos foram mantidos, a 22 °C, em incubadora com agitação constante de 110 rpm/min, por cerca de 10 dias, no escuro. O micélio teve sua umidade reduzida com o uso de bomba a vácuo e, posteriormente, foi liofilizado por 48 horas.

O DNA foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada com a metodologia de Kaufman, Richards e Dierig (1999). O micélio liofilizado foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. O tecido macerado foi resuspenso em 10 mL de STE (0,25 M sacarose, 0,03 M TRIS e 0,05 M EDTA) e centrifugado a 1000xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 10 mL do tampão de extração (2% CTAB, 100 mM TRIS pH8,0, 1,4 M NaCl e 1% de polivinilpirrolidona) foram acrescentados ao *pellet* formado. O material foi homogeneizado e incubado em banho-maria, a 65 °C, por 30 minutos. Após o resfriamento, acrescentaram-se 10 mL da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e o DNA foi precipitado com a adição de 30 mL de álcool 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e incubação, a -20 °C, *overnight*. Posteriormente, o DNA foi centrifugado, seco e resuspenso em TE (1mM TRIS e 0,1M EDTA).

A segunda extração foi realizada utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1) e o sobrenadante precipitado em etanol 95%:acetato de sódio 3M (1:20), a -20 °C, *overnight*. Posteriormente, o DNA foi centrifugado, seco e resuspenso em tampão TE e, por fim, tratado com RNase A. As alíquotas de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1% e diluídas para a concentração de 10 ng/μL, para serem utilizadas como solução de trabalho.

### 3.9 Análises de PCR

Nas reações de PCR foi utilizado um par de *primers* específico para *C. lindemuthianum*, descrito na literatura por García-Serrano et al. (2008), que amplifica a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*, sendo eles HMGCLF (5'-CATGCCGCAGTAAAGCAAAT-3') e HMGCLR (5'-ATCATCAGACGTTCTTTGTG-3'). As amplificações foram realizadas utilizando-se o kit de Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies), em um total de 50 µL de reação contendo 5 µL de 10× PCR buffer, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de Taq DNA polymerase (5 U/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM) e 2,5 µL de cada *primer* (100 µM) e 2 µL de DNA (10 ng/µL). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ96+/MJ96G (BioCycler Technology Co.), utilizando-se uma desnaturação inicial de 20 minutos, a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 60 segundos, a 94 °C; 30 segundos, a 55 °C e 30 segundos, a 72 °C, além de uma extensão final de 10 minutos, a 72 °C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE (0,45 M Tris-borato, 0,01 M EDTA), por 3h30min, a 80 V, utilizando-se um marcador de DNA de 100 pb como marcador molecular. Após tratamento com brometo de etídio, os produtos da amplificação foram visualizados em luz ultravioleta (Fotodyne Ultraviolet Trans-illuminator) e fotografados com câmera digital Kodak EDA-290.

Em razão de os isolados pertencentes à população da fase sexual não amplificarem bandas quando testados com os *primers* específicos para *C. lindemuthianum* citados anteriormente, um par de *primers* específicos para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, HMGGLOF e HMGGLOR, desenvolvido por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), também foi utilizado na caracterização dessa população. Assim como os *primers* descritos por García-Serrano et al. (2008), os *primers* específicos para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* amplificam a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*. As reações de PCR foram realizadas como descrito anteriormente.

### 3.10 Sequenciamento e análise filogenética

Linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (UFLAG46-1, UFLAG85-1, UFLAG93-1, UFLAG99-1, UFLAG104-1, UFLAG112 e UFLAG118-1) foram selecionadas juntamente com uma linhagem controle de *C. lindemuthianum* (LV115 – raça 65) e uma linhagem controle de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (UFLAG01), ambas utilizadas na árvore filogenética gerada por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011). Estes isolados foram utilizados na análise filogenética visando o entendimento do relacionamento entre os isolados da fase sexual e assexual. A análise filogenética foi baseada nas regiões ITS do DNA ribossômico, utilizando-se os *primers* universais ITS1/ITS4 descritos por White et al. (1990).

Os produtos de PCR foram obtidos como descrito no tópico anterior e uma parte da reação (1  $\mu$ L) foi utilizada na visualização em gel de agarose 1% em luz ultravioleta. Outra parte da reação (10  $\mu$ L) foi submetida a uma purificação utilizando o kit *QIAquick PCR Purification*. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing*, em um total de 10  $\mu$ L de reação contendo 1  $\mu$ L de reação de PCR após a purificação, 2,0  $\mu$ L de um dos *primers* (2 pM), 0,5  $\mu$ L do mix de sequenciamento *Big Dye* e 2,0  $\mu$ L de tampão *Big Dye*. As reações de sequenciamento foram realizadas em um termociclador MJ96+/MJ96G (BioCycler Technology Co.), com as seguintes condições de amplificação: 94 °C, por 2 segundos; 30 ciclos de 94 °C, por 10 segundos; 50 °C, por 10 segundos e 60 °C, por 4 minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado a partir do protocolo de precipitação por Etanol/EDTA, proposto pela Applied Biosystems (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*) e a corrida eletroforética das amostras foi realizada em um sequenciador automático ABI 310 (Applied

Biosystems). Todas as amostras foram sequenciadas em duplicata, nas cadeias senso e antissenso e comparadas entre si e com a amostra de referência.

Sequências de DNA de outras espécies de *Colletotrichum* do Genbank foram incluídas nas análises filogenéticas, as quais foram realizadas utilizando-se a plataforma Phylogeny.fr (DEREEPER et al., 2008), seguindo os seguintes passos: alinhamento das sequências com MUSCLE (v3.7); remoção das regiões ambíguas com Gblocks (v0.91b) e construção de uma árvore filogenética, utilizando-se o método de máxima verossimilhança com PhyML (v3.0 aLRT). As árvores filogenéticas foram desenhadas e editadas por meio do programa TreeDyn (v198.3).

### **3.11 Compatibilidade vegetativa**

Para a indicação da variabilidade existente na população sexual analisada, foram obtidos mutantes NIT, seguindo a metodologia descrita por Vaillancourt e Hanau (1994). Para a obtenção dos mutantes NIT foram selecionados cinco isolados (UFLAG21-1, UFLAG46-1, UFLAG47-2, UFLAG93-1 e UFLAG112-1). Discos miceliais foram retirados das margens das colônias e transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo + clorato de potássio (nas concentrações de 2,5% e 3,0%). Para cada isolado foram transferidos 18 discos miceliais e as placas foram incubadas, a 22 °C, no escuro. As placas foram examinadas diariamente, a fim de verificar a formação de setores, os quais foram repicados para placas contendo meio mínimo (Figura 3). Os isolados que apresentaram desenvolvimento esparso e com pouco crescimento micelial foram selecionados como mutantes NIT. Para a classificação dos mutantes NIT, os mesmos foram testados em meio basal com a adição de suplementos, seguindo a metodologia descrita por Coddington (1976).

Os testes empregaram meio basal com diferentes fontes de nitrogênio: meio MA com tartarato de amônia (1g/L), MX com hipoxantina (0,25g/L), MM com nitrato de sódio (5g/L) e MN com nitrito de sódio (0,01g/L). Foram utilizadas duas repetições por tratamento e os tratamentos em meio MA e MM foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os isolados que apresentaram crescimento robusto em MN e em MX foram denominados nit1; os mutantes com crescimento robusto em MX foram classificados como nit3 e aqueles com crescimento robusto, somente em MN como nitM (CORREL; KLITTICH; LESLIE, 1987).

Para os testes de autocompatibilidade vegetativa foram utilizados os isolados que apresentaram mutantes de diferentes fenótipos. O pareamento entre os mutantes NIT provenientes do mesmo parental foi realizado colocando-se discos miceliais de 6 mm de diâmetro a uma distância de 2 cm um do outro, em placas contendo meio mínimo. Foram realizadas duas repetições por tratamento e a avaliação foi realizada após 15 dias de incubação, a 22 °C no escuro, observando-se a formação de um micélio aéreo (tipo selvagem), na zona de contato entre as duas colônias.

Os testes de compatibilidade vegetativa foram realizados de acordo com a metodologia de Leslie e Summerell (2006). Os pareamentos foram feitos em placas de Petri meio mínimo, em um arranjo contendo mutantes nit3 nas margens da placa e um mutante nit1 ou nitM em contato com os demais. Foram realizadas duas repetições por tratamento e a avaliação foi realizada após 15 dias de incubação, a 22 °C, no escuro, observando-se a formação do heterocário (tipo selvagem) na zona de contato entre as duas colônias. De acordo com Leslie e Summerell (2006), isolados pertencentes ao mesmo VCG apresentam crescimento denso do micélio aéreo na linha de intersecção entre mutantes nit3 de um isolado e mutantes nit1 ou nitM de outro isolado. Por outro lado, isolados

de VCGs diferentes apresentam crescimento ralo na linha de intersecção entre mutantes *nit3* de um isolado e mutantes *nit1* ou *nitM* de outro isolado.

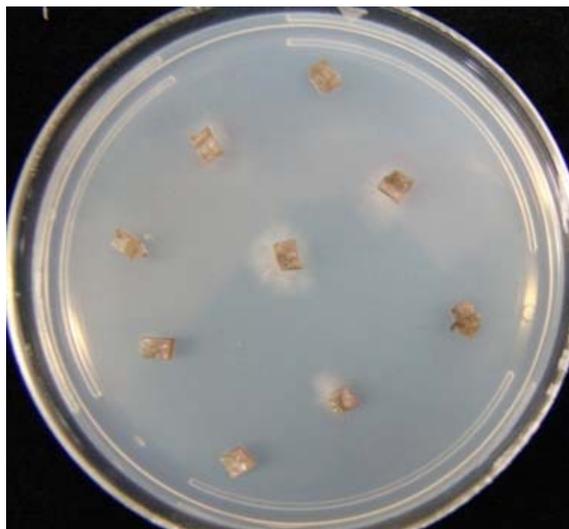


Figura 3 Setores resistentes ao clorato de potássio do isolado UFLAG46-1, na concentração de 3,0%

### 3.12 Análises de RAPD

Adicionalmente, foram selecionados 53 isolados da população da fase sexual e três isolados da população da fase assexuada para serem analisados utilizando marcadores de RAPD. A amplificação foi feita em um volume total de 25  $\mu$ l contendo 2,5  $\mu$ l de 10xPCR buffer, 1,0  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM), 2,0  $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 3,0  $\mu$ l de *primer* (100  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ l) e 3,0  $\mu$ l de DNA (10 ng/ $\mu$ l). Foram testados quatro *primers*: OPA05 (5'AGGGGTCTTG3'), OPA07 (5'GAAACGGGTG3'), OPA12 (5'TGCGCGATAG3') e OPA17 (5'GACCGCTTGT3'). Cada ciclo de amplificação correspondeu à desnaturação, a 94 °C, por 2 minutos; anelamento, a 37 °C, por 30 segundos e alongação, a 72 °C, por 15 segundos. Após os 45

ciclos, procedeu-se à extensão final, a 72 °C, por 2 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com 1x TBE buffer (0,45 M Tris-borate, 0,01 M EDTA, pH 8,0), por 3h30min a 80 V, tratados com brometo de etídio e visualizados em luz UV.

A matriz gerada foi utilizada para a obtenção das estimativas de similaridade genética usando o programa NTSYS – pc 2.1 (ROHLF, 2000). Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas. As estimativas de similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre os isolados foram efetuadas pelo coeficiente de Sorensen-Dice, por meio da expressão  $sg_{ij} = 2a/(2a + b + c)$ , sendo a presença de bandas nos dois genótipos  $i$  e  $j$ ,  $b$  presença de bandas apenas no indivíduo  $i$  e  $c$  presença de bandas apenas no indivíduo  $j$ . A matriz de similaridade foi empregada para construir o dendograma e a análise de agrupamento foi realizada pelo método da média das similaridades (UPGMA) (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000). Os erros associados a cada similaridade foram estimados utilizando-se a expressão  $s_{sg} = [sg_{ij}(1 - sg_{ij})/(n-1)]^{0,5}$ , em que  $n$  é a soma de  $a$ ,  $b$  e  $c$  para cada par de isolados. Os isolados pertencentes a diferentes grupos foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade ( $sgm$ ). O  $sgm$  foi estimado por meio do teste de  $t$ , utilizando-se a expressão  $sgm = 1 - (t \times sgs)$ , em que  $t$  é o valor tabelado da distribuição de  $t$  de Student, a 1% de probabilidade, com  $n-2$  graus de liberdade e o  $sgs$  é o erro médio das comparações consideradas.

### **3.13 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANAVA) e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), utilizando-se o pacote estatístico MSTAT-C (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 1991).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Testes de patogenicidade

Os isolados de *C. lindemuthianum* analisados neste estudo apresentaram diferentes padrões de virulência, quando inoculados nas 12 cultivares diferenciadoras (Tabela 4). Seis raças distintas foram encontradas para os 74 isolados estudados. As raças 65 e 81 foram as mais frequentes, com 58,11% e 18,92%, respectivamente. Em Lavras, houve ampla predominância da raça 65 (82,15%) e somente outras duas raças foram identificadas (raça 1 e raça 81), enquanto, em Lambari, embora ocorra predominância da raça 65 (42,2%), outras cinco raças foram encontradas, caracterizando uma maior variabilidade patogênica.

Dos 53 isolados conidiais de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, 47 isolados não apresentaram sintoma quando inoculados nas cultivares diferenciadoras e na testemunha suscetível. Entretanto, seis isolados apresentaram sintomas nos caule e nas folhas, quando inoculados na cultivar suscetível (UFLAG85-1, UFLAG86-1, UFLAG89-1, UFLAG92-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1). Os isolados UFLAG86-1, UFLAG89-1 e UFLAG92-1 foram classificados como raça 1, pois apenas na cultivar diferenciadora Michelite foram detectadas lesões características de antracnose do feijoeiro, porém, não muito severas. Os demais isolados, UFLAG85-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1, foram classificados como isolados pertencentes à raça 65, pois, além das plantas da cultivar Michelite, as plantas da cultivar Mexico 222 também foram afetadas, com lesões mais brandas que as detectadas quando da inoculação dos isolados da população assexual de *C. lindemuthianum* (Figura 4).

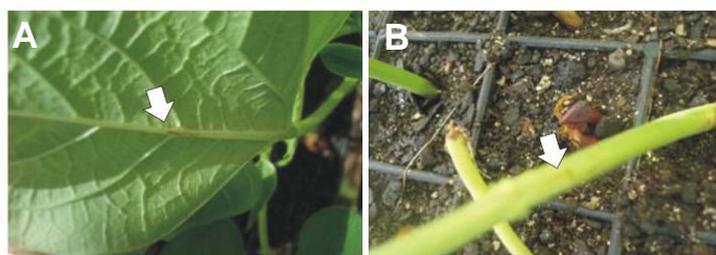


Figura 4 Lesões de antracnose do feijoeiro indicadas pelas setas brancas (A) na folha e (B) no caule da cultivar Michelite, quando inoculada com o isolado de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* UFLAG92-1

Tabela 4 Identificação das raças fisiológicas de acordo com a reação das cultivares diferenciadoras para os 74 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

Isolado	Raça	Isolado	Raça	Isolado	Raça	Isolado	Raça
UFLAC121	64	UFLAC148	65	UFLAC169	65	UFLAC188	65
UFLAC122	64	UFLAC149	81	UFLAC170	81	UFLAC189	65
UFLAC130	81	UFLAC152	64	UFLAC171	66	UFLAC190	65
UFLAC131	65	UFLAC153	81	UFLAC172	65	UFLAC191	65
UFLAC132	81	UFLAC154	1	UFLAC173	65	UFLAC192	65
UFLAC134	65	UFLAC155	81	UFLAC174	65	UFLAC193	65
UFLAC135	81	UFLAC156	73	UFLAC175	65	UFLAC194	65
UFLAC136	65	UFLAC157	73	UFLAC176	65	UFLAC195	65
UFLAC137	81	UFLAC158	73	UFLAC177	65	UFLAC196	81
UFLAC138	64	UFLAC159	73	UFLAC178	65	UFLAC197	65
UFLAC139	65	UFLAC160	65	UFLAC179	65	UFLAC198	65
UFLAC140	65	UFLAC161	65	UFLAC180	65	UFLAC199	65
UFLAC141	66	UFLAC162	65	UFLAC181	65	UFLAC200	65
UFLAC142	81	UFLAC163	65	UFLAC182	81	UFLAC201	81
UFLAC143	64	UFLAC164	65	UFLAC183	73	UFLAC202	73
UFLAC144	1	UFLAC165	81	UFLAC184	65	UFLAC203	65
UFLAC145	65	UFLAC166	65	UFLAC185	65	UFLAC204	73
UFLAC146	64	UFLAC167	65	UFLAC186	65		
UFLAC147	65	UFLAC168	65	UFLAC187	81		

#### 4.2 Caracterização morfológica das colônias sexuais

A classificação considerando a morfologia dos 73 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* é apresentada na Tabela 5. No agrupamento de acordo com a classificação proposta por Chilton e Wheeler (1949), os isolados

formaram quatro grupos distintos: 24 foram classificados como conidial A; 29 como conidial B; 11 como plus e 9 como minus. Os isolados plus e minus, esporadicamente, apresentaram também produção de conídios.

Na Figura 5 estão representados os isolados pertencentes às classes indicadas.

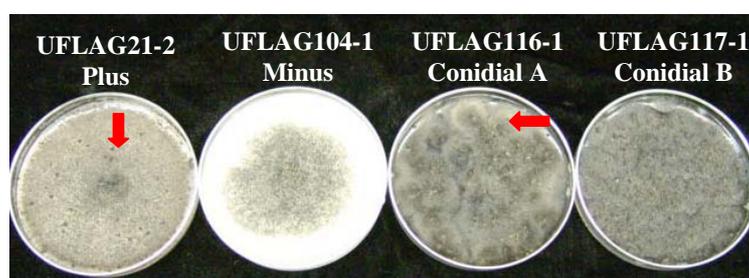


Figura 5 Isolados pertencentes às quatro classes descritas na classificação proposta por Chilton e Wheeler (1949). As setas em vermelho indicam as massas de esporos nos isolados plus e conidial A

#### 4.3 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial

Os 74 isolados analisados de *C. lindemuthianum* formaram quatro grupos distintos para o IVCM e para o diâmetro colonial (Tabela 6). Os isolados com menor velocidade média de crescimento apresentaram crescimento radial menor, exceto o isolado LV 157, classificado em grupos distintos, considerando as duas análises. Para ambos os testes, a variabilidade foi alta, tendo o crescimento médio variado de 1,76 mm/dia (UFLAC187) a 4,50 mm/dia (UFLAC186) e o diâmetro colonial, de 31,50 mm (UFLAC187) a 73,00 mm (UFLAC186).

Na avaliação dos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* houve necessidade de realizar algumas adaptações na metodologia utilizada para que estes testes fossem realizados. Após oito dias do início das medições, mais de

80% dos isolados atingiram o crescimento máximo na placa de Petri, ou seja, 80 mm de diâmetro. Sendo assim, se as medições continuassem nos sete dias restantes, até atingir o 15º dia de avaliação, os isolados não se diferenciariam em relação ao diâmetro colonial. Portanto, as medições para os 73 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* foram realizadas apenas durante sete dias consecutivos. As análises não apresentaram o mesmo ranqueamento para ambos os caracteres (Tabela 7). Enquanto o IVCM apresentou apenas dois grupos distintos, o diâmetro colonial formou três grupamentos de isolados (Tabela 7). O crescimento médio dos isolados variou de 8,79 mm/dia (UFLAG41-1) a 10,50 mm/dia (UFLAG104-1), tendo o grupo de isolados com IVCM maior ou igual a 9,57 mm/dia sido o mais representativo (68,5%). O diâmetro colonial dos 73 isolados apresentou variação de 67,80 mm (UFLAG41-1) a 80,0 mm (UFLAG89-1), tendo o grupo com diâmetro colonial maior ou igual a 76,30 mm (UFLAG106-1) sido o que teve maior número de representantes (65,75%).

Os isolados de ambas as populações apresentaram relação linear entre o crescimento da colônia e o tempo nos 15 dias de avaliação para os isolados de *C. lindemuthianum* e nos 7 dias de avaliação para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (Gráfico 1). Os valores de  $b_0$  das equações de regressão obtidas variaram entre e dentro de cada espécie. No entanto, ficou evidente o crescimento inicial mais rápido dos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Além disso, a velocidade de crescimento foi de magnitude superior para esta espécie, o que pode ser comprovado pelas estimativas de  $b_1$ . Portanto, os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* apresentaram colônias maiores em um menor intervalo de tempo, quando comparados com os isolados de *C. lindemuthianum*.

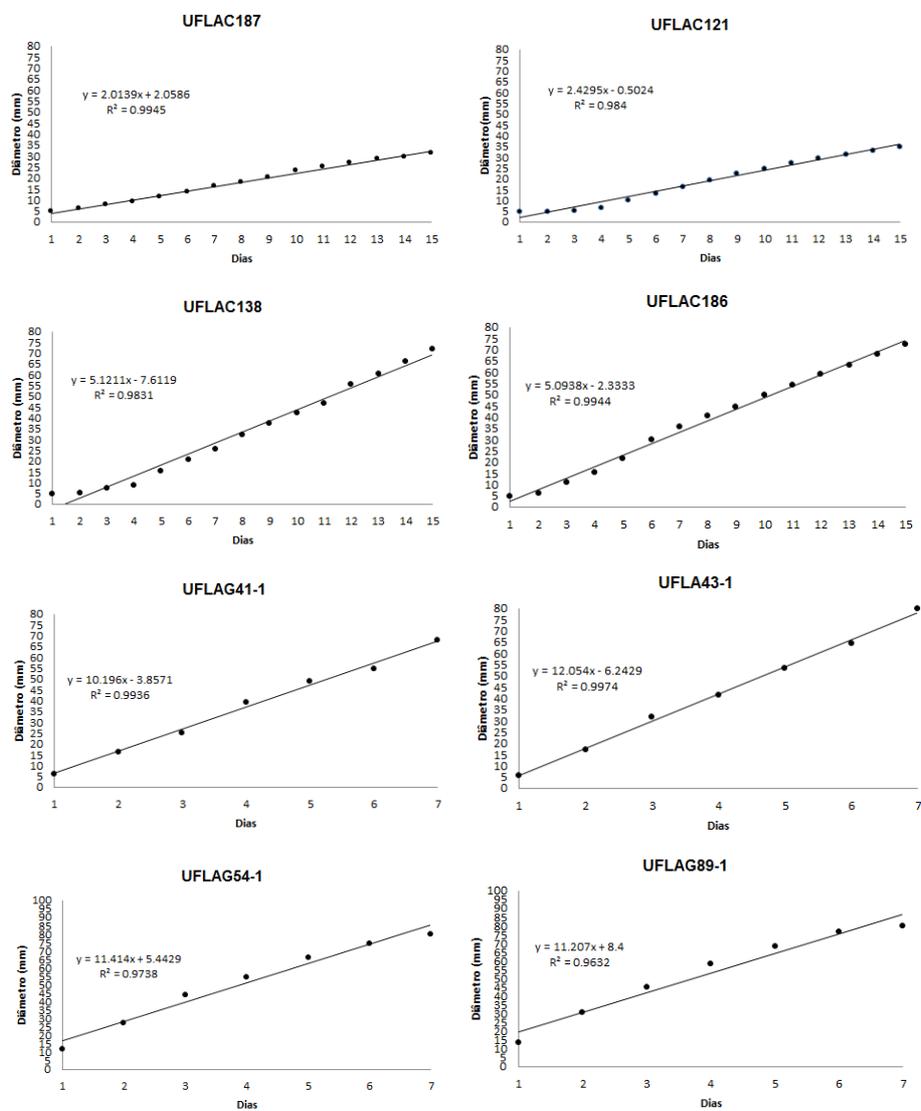


Gráfico 1 Equação de regressão para o crescimento micelial de quatro isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e quatro isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*

#### 4.4 Avaliação da porcentagem de germinação

Na avaliação da porcentagem de germinação de esporos, para ambas as populações, a interação isolados x tempos foi significativa ( $P < 0,05$ ), indicando que a porcentagem de germinação dos isolados não foi coincidente nos dois tempos analisados. Por exemplo, para a população de *C. lindemuthianum*, o isolado UFLAC121, classificado no grupo com menor porcentagem de germinação na avaliação com 24 horas, apresentou porcentagem de germinação intermediária na análise com 48 horas. Assim, os testes de média foram realizados de forma independente para cada tempo utilizado na avaliação (Tabela 6). O isolado UFLAC190 apresentou as maiores porcentagens de germinação, sendo superior a 80% na avaliação após 24 horas de incubação e mantendo-se com alta taxa de germinação na avaliação com 48 horas de incubação (Tabela 6).

Na população de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, pode-se exemplificar a interação significativa das fontes de variação considerando o isolado UFLAG46-1, que apresentou taxa de germinação baixa (28,5%), em comparação com a média geral (~52%), na avaliação de 24 horas e, na avaliação após 48 horas, exibiu uma das maiores porcentagens de germinação entre os isolados da mesma população (92,0%), conforme apresentado na Tabela 7. Em ambas as análises, 24 e 48 horas, foram formados nove grupos distintos estatisticamente. Um total de 39 isolados apresentou porcentagem de germinação superior a 80% na avaliação após 48 horas de incubação e, destes isolados, 15 são colônias ascospóricas (Tabela 7).

#### **4.5 Caracterização dos esporos e anastomose entre conídios e entre ascósporos**

Variações significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas para largura e comprimento dos esporos, para ambas as populações. Na população de *C. lindemuthianum*, a largura dos conídios variou de 4,09  $\mu\text{m}$  (UFLAC158) a 6,19  $\mu\text{m}$  (UFLAC159), formando três grupos de isolados distintos estatisticamente. Na análise do comprimento dos conídios houve a formação de quatro grupos de isolados e o caráter apresentou variação de 14,46  $\mu\text{m}$  (UFLAC136) a 18,98  $\mu\text{m}$  (UFLAC143), conforme apresentado na Tabela 6. Na população de isolados de *G. cingulata* f. sp. *Phaseoli*, a medição de conídios e ascósporos gerou a formação de dois grupamentos distintos dentro da análise, pois estes possuem uma morfologia totalmente distinta (Figura 6).

Para o caráter largura de esporos, foram detectados dez grupos distintos. Nesta análise, os sete primeiros grupos representam os isolados conidiais, cujos conídios apresentaram largura variando de 2,88  $\mu\text{m}$  (UFLAG5-1) a 5,62  $\mu\text{m}$  (UFLAG26-1) e os três outros grupos formados pelos isolados ascospóricos apresentaram variação de 6,32  $\mu\text{m}$  (UFLAG113-1) a 8,7  $\mu\text{m}$  (UFLAG21-2), conforme indicado na Tabela 7. Para o caráter comprimento de esporos foram gerados 16 grupos distintos. Os oito primeiros grupos representam os isolados conidiais, tendo o comprimento dos conídios variado de 8,46  $\mu\text{m}$  (UFLAG30-2) a 15,85  $\mu\text{m}$  (UFLAG98-1). Os isolados ascospóricos estão representados nos outros oito grupos, variando de 20,5  $\mu\text{m}$  (UFLAG113-1) a 32,78  $\mu\text{m}$  (UFLAG104-1), conforme apresentado na Tabela 7.



Figura 6 Micografia de epifluorescência de ascósporos e conídios dos isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* corados com Calcofluor White, na concentração de 0,12 M. (A) Ascósporo do isolado UFLAG15-1 e (B) conídio do isolado UFLAG15-2. Barra: 10  $\mu$ m

A avaliação dos esporos germinados indicou que onze isolados de *C. lindemuthianum* não apresentaram a formação de septo (UFLAC122, UFLAC143, UFLAC155, UFLAC171, UFLAC172, UFLAC182, UFLAC187, UFLAC195, UFLAC199, UFLAC200, UFLAC203), conforme indicado no Gráfico 2. Por outro lado, para a análise da população sexual, apenas um isolado conidial de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* não apresentou septo após a germinação do conídio (UFLAG21-1). Os isolados ascospóricos apresentaram 100% de formação de septo após a germinação dos ascósporos (Gráfico 3; Figura 7). Alguns conídios e ascósporos se apresentaram septados antes mesmo da germinação (Figura 7).

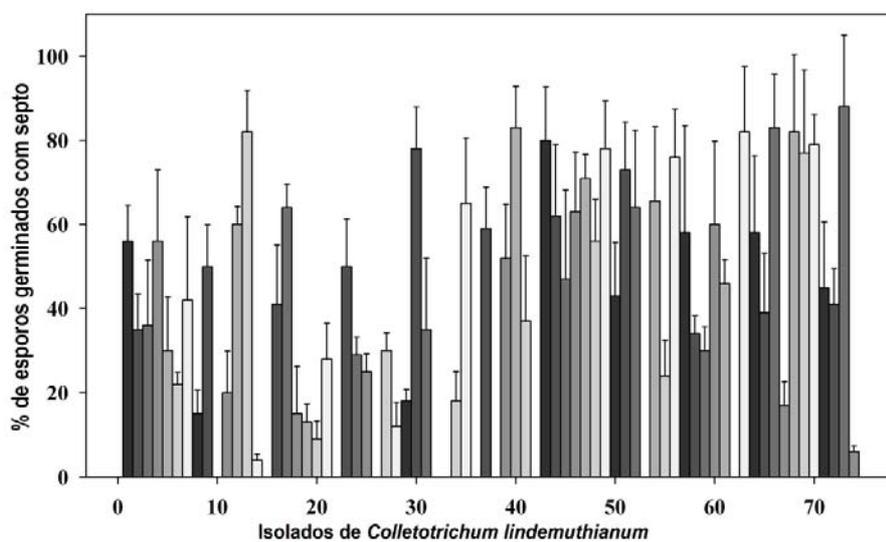


Gráfico 2 Porcentagem de conídios que apresentaram septo após a germinação para os 74 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* avaliados após 24 horas de incubação em água, corados com Calcofluor White na concentração de 0,12 M. As barras representam o desvio padrão para os valores médios, considerando as duas repetições

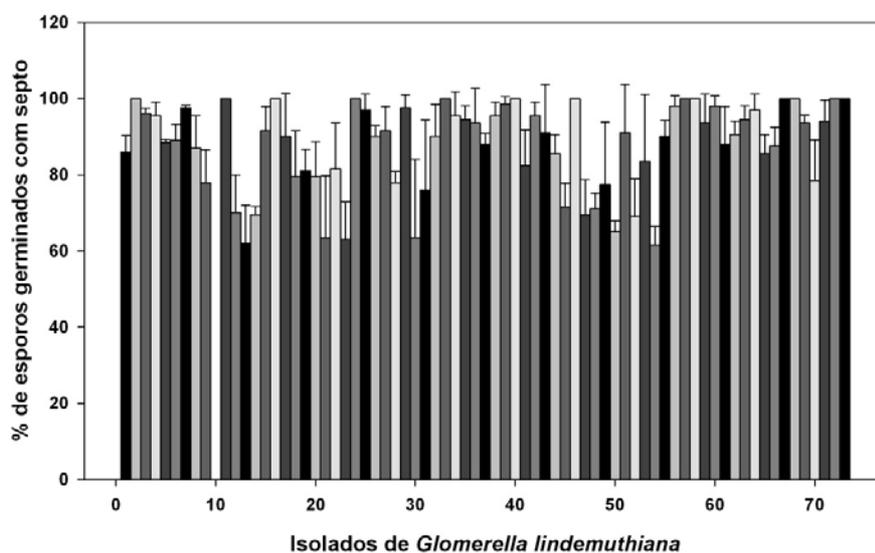


Gráfico 3 Porcentagem de conídios e ascósporos que apresentaram septo após a germinação, para os 73 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* avaliados após 24 horas de incubação em água, corados com Calcofluor White, na concentração de 0,12 M. As barras representam o desvio padrão para os valores médios, considerando as duas repetições

Na avaliação da formação de anastomose entre conídios e entre ascósporos, para a população assexual apenas quatro isolados não apresentaram formação de CATs e não foram incluídos nas análises de variância. A análise dos 70 isolados foi significativa e indicou a formação de cinco grupos distintos, tendo o isolado UFLAC121 apresentado porcentagem de fusão de CATs de aproximadamente 60%, no período avaliado (Tabela 6). Longas cadeias envolvendo vários conídios podem ser visualizadas na Figura 8. Com relação à população sexual, formação de CATs não foi observada para 22 isolados, que não foram, por esse motivo, incluídos nas análises de variância. Nenhum dos isolados ascospóricos apresentou formação de CATs. Os demais 51 isolados conidiais foram agrupados em três grupos distintos, com destaque para o isolado

UFLAG7-2, que apresentou um porcentagem de formação de CATs de, aproximadamente, 78% nesta avaliação (Tabela 7).

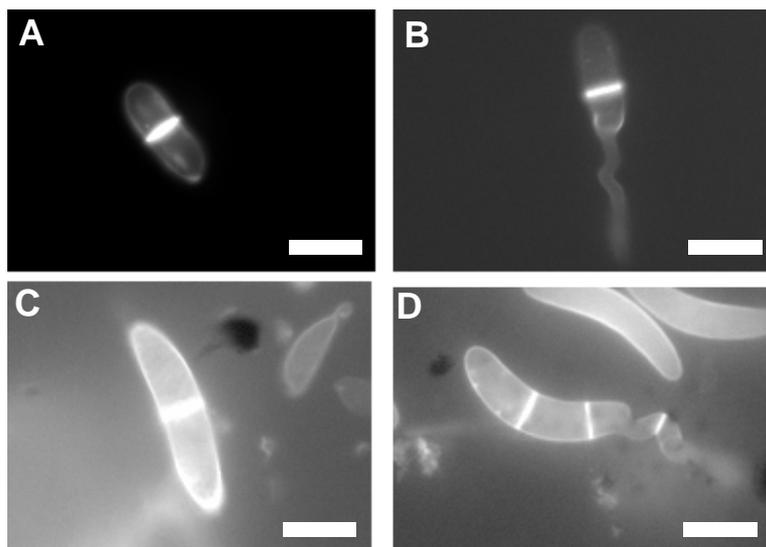


Figura 7 Micografia de epifluorescência de conídios e ascósporos septados de isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, corados com Calcofluor White, na concentração de 0,12 M. (A) Conídio septado não germinado do isolado UFLAG47-1; (B) conídio septado germinado com produção de apressório do isolado UFLAG47-1; (C) ascósporo septado não germinado do isolado UFLAG47-2 e (D) ascósporo septado germinado do isolado UFLAG47-2. Barra: 10  $\mu$ m

#### 4.6 Compatibilidade sexual

Para a população de isolados assexuais, os resultados dos pareamentos de isolados dois a dois permitiram observar que 48 combinações (1,73%) apresentaram compatibilidade sexual, com presença de uma linha de contato escura entre os pares de isolados. No entanto, nenhuma das 48 combinações apresentou peritécios férteis e viáveis na linha de contato, após 15 dias de incubação. Na análise microscópica, apenas a formação de protoperitécios foi

observada, não havendo produção de ascos e ascósporos. Os isolados UFLAC195 e UFLAC141 apresentaram-se compatíveis em um maior número de combinações, respectivamente 12,33% e 10,96% (Tabela 8). Um grupo de 30 isolados apresentou-se incompatível em quaisquer combinações.

Tabela 5 Coloração observada em meio M3 e agrupamento dos 73 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, segundo o critério de classificação estabelecido por Chilton e Wheeler (1949)

Isolado	Coloração	Classificação	Isolado	Coloração	Classificação	Isolado	Coloração	Classificação
UFLAG05-1	preta	conidial A	UFLAG45-1	preta	conidial B	UFLAG91-3	preta	conidial A
UFLAG07-1	branca	plus	UFLAG46-1	marrom	conidial A	UFLAG92-1	preta	conidial B
UFLAG07-2	preta	conidial A	UFLAG47-1	preta	conidial B	UFLAG93-1	marrom	conidial A
UFLAG08-1	branca	minus	UFLAG47-2	branca	minus	UFLAG97-1	marrom	conidial A
UFLAG10-1	marrom	conidial B	UFLAG48-1	preta	conidial B	UFLAG98-1	marrom	conidial A
UFLAG13-1	preta	conidial B	UFLAG49-1	preta	conidial B	UFLAG99-1	marrom	conidial A
UFLAG15-1	branca	plus	UFLAG54-1	preta	conidial A	UFLAG101-1	branca	plus
UFLAG15-2	preta	conidial A	UFLAG54-2	branca	plus	UFLAG104-1	branca	minus
UFLAG20-1	preta	conidial B	UFLAG55-1	preta	conidial B	UFLAG104-2	preta	conidial A
UFLAG21-1	preta	conidial A	UFLAG60-1	preta	conidial B	UFLAG106-1	branca	plus
UFLAG21-2	branca	plus	UFLAG61-1	preta	conidial B	UFLAG106-3	preta	conidial B
UFLAG23-1	preta	conidial B	UFLAG64-1	preta	conidial A	UFLAG107-2	marrom	conidial A
UFLAG25-1	marrom	conidial B	UFLAG68-1	marrom	conidial A	UFLAG108-1	preta	conidial A
UFLAG26-1	marrom	conidial A	UFLAG73-1	branca	plus	UFLAG109-1	preta	conidial B
UFLAG29-1	preta	conidial B	UFLAG73-2	branca	minus	UFLAG110-1	preta	conidial B
UFLAG30-1	branca	plus	UFLAG74-1	preta	conidial A	UFLAG111-1	preta	conidial B
UFLAG30-2	marrom	conidial B	UFLAG75-1	preta	conidial A	UFLAG112-1	branca	minus
UFLAG34-2	preta	conidial B	UFLAG79-1	preta	conidial B	UFLAG113-1	branca	minus
UFLAG35-1	marrom	conidial B	UFLAG82-1	preta	conidial B	UFLAG114-1	preta	conidial B
UFLAG36-1	marrom	conidial B	UFLAG83-1	preta	conidial B	UFLAG116-1	marrom	conidial A
UFLAG37-1	marrom	conidial B	UFLAG84-1	branca	plus	UFLAG117-1	preta	conidial B
UFLAG39-1	branca	minus	UFLAG85-1	amarela	conidial A	UFLAG118-1	branca	plus
UFLAG41-1	preta	conidial B	UFLAG86-1	marrom	conidial A	UFLAG119-1	branca	minus
UFLAG43-1	branca	minus	UFLAG88-1	marrom	conidial A			
UFLAG43-2	branca	plus	UFLAG89-1	marrom	conidial A			

Tabela 6 Estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para o IVC (mm/dia), diâmetro colonial (mm), germinação de conídios (%), anastomose entre conídios (%) e dimensão dos conídios ( $\mu$ m) dos 74 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

Isolado	IVC*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAC121	2,00 ± 0,62 a	35,00 ± 9,42 a	14,0 ± 4,24 a	50,5 ± 10,61 d	59,75 ± 15,20 e	5,32 ± 0,58 c	17,12 ± 1,39 c
UFLAC122	3,55 ± 0,53 c	58,25 ± 7,93 c	1,5 ± 0,71 a	14,5 ± 3,54 a	1,30 ± 1,06 a	5,09 ± 0,61 b	18,04 ± 1,68 d
UFLAC130	4,33 ± 0,24 d	70,00 ± 3,56 d	4,0 ± 1,41 a	30,5 ± 4,95 b	3,00 ± 1,41 a	5,49 ± 0,64 c	17,73 ± 1,71 d
UFLAC131	4,03 ± 0,61 d	66,50 ± 9,15 d	48,5 ± 4,95 d	79,0 ± 4,24 f	45,75 ± 13,08 d	5,06 ± 0,68 b	16,78 ± 2,54 b
UFLAC132	3,38 ± 0,62 c	55,75 ± 9,32 c	64,0 ± 1,41 e	88,5 ± 7,78 g	6,75 ± 5,30 a	4,98 ± 0,80 b	16,94 ± 1,82 b
UFLAC134	3,27 ± 0,27 b	54,00 ± 4,08 b	34,5 ± 4,95 c	75,0 ± 2,83 f	16,75 ± 13,08 a	4,78 ± 0,81 b	15,24 ± 2,87 a
UFLAC135	3,45 ± 0,29 c	56,75 ± 4,43 c	37,5 ± 9,19 c	76,0 ± 2,83 f	14,25 ± 8,13 a	5,45 ± 0,74 c	17,87 ± 1,82 d
UFLAC136	4,43 ± 0,43 d	71,50 ± 6,45 d	37,0 ± 19,7 c	66,5 ± 20,5 e	7,75 ± 0,35 a	5,04 ± 0,67 b	14,46 ± 2,88 a
UFLAC137	2,65 ± 0,29 b	44,75 ± 4,27 b	6,0 ± 1,41 a	22,0 ± 4,24 a	2,75 ± 2,47 a	5,24 ± 0,71 c	18,26 ± 1,91 d
UFLAC138	4,63 ± 0,35 d	72,00 ± 9,09 d	22,5 ± 2,12 b	81,0 ± 2,83 f	10,25 ± 7,42 a	5,27 ± 0,58 c	16,20 ± 2,52 b
UFLAC139	3,07 ± 0,66 b	51,50 ± 9,29 b	4,5 ± 0,71 a	54,0 ± 7,07 d	9,25 ± 7,42 a	5,39 ± 0,76 c	17,11 ± 1,71 c
UFLAC140	2,75 ± 0,27 b	46,25 ± 4,03 b	13,5 ± 6,36 a	42,0 ± 5,66 c	1,50 ± 0,71 a	5,21 ± 0,60 c	18,40 ± 1,73 d
UFLAC141	3,90 ± 0,23 d	63,50 ± 3,42 d	2,5 ± 0,71 a	26,0 ± 8,49 b	5,50 ± 5,66 a	5,20 ± 0,61 c	18,53 ± 2,01 d
UFLAC142	3,43 ± 0,65 c	56,50 ± 9,75 c	5,5 ± 0,71 a	15,0 ± 4,24 a	3,50 ± 2,12 a	5,07 ± 0,76 b	18,05 ± 2,31 d
UFLAC143	3,90 ± 0,18d	63,50 ± 2,65 d	1,0 ± 1,41 a	29,5 ± 2,12 b	2,25 ± 1,77 a	4,59 ± 0,40 a	18,78 ± 1,99 d
UFLAC144	2,22 ± 0,24 a	38,25 ± 3,59 a	55,5 ± 9,19 e	76,0 ± 4,24 f	6,50 ± 1,41 a	5,44 ± 0,48 c	16,44 ± 2,64 b
UFLAC145	3,37 ± 0,74 c	55,50 ± 11,12 c	2,0 ± 1,41 a	37,5 ± 2,12 c	5,75 ± 6,72 a	4,94 ± 0,50 b	17,43 ± 2,15 c
UFLAC146	4,41 ± 0,31 d	71,25 ± 4,65 d	29,5 ± 13,33 b	78,0 ± 16,97 f	24,25 ± 10,25 b	5,14 ± 0,54 b	16,51 ± 1,89 b
UFLAC147	3,50 ± 0,20 c	57,50 ± 3,00 c	58,0 ± 5,66 e	86,0 ± 4,24 g	7,50 ± 1,41 a	5,47 ± 0,71 c	17,73 ± 2,32 d
UFLAC148	3,45 ± 0,73 c	56,75 ± 10,97 c	25,5 ± 7,78 b	94,5 ± 2,92 g	9,50 ± 4,96 a	4,88 ± 0,70 b	16,48 ± 1,70 b
UFLAC149	3,48 ± 0,39 c	53,50 ± 1,73 b	50,0 ± 2,83 d	81,5 ± 0,71 f	8,00 ± 4,96 a	4,50 ± 0,59 a	16,31 ± 1,74 b
UFLAC152	2,83 ± 0,31 b	47,50 ± 4,65 b	64,0 ± 11,31 e	89,5 ± 9,19 g	9,00 ± 0,94 a	5,84 ± 0,85 c	17,25 ± 1,64 c
UFLAC153	3,03 ± 0,25 b	50,75 ± 3,77 b	44,0 ± 5,66 d	75,5 ± 3,54 f	2,50 ± 2,12 a	5,13 ± 0,59 b	16,51 ± 1,70 b
UFLAC154	3,18 ± 0,48 b	52,75 ± 7,18 b	58,5 ± 10,61 e	86,5 ± 4,95 g	11,00 ± 0,71 a	5,71 ± 1,05 c	17,04 ± 1,99 c
UFLAC155	2,41 ± 0,27 a	41,25 ± 4,03 a	25,5 ± 6,36 b	40,5 ± 2,32 c	0,75 ± 0,35 a	5,41 ± 0,47 c	17,39 ± 1,52 c
UFLAC156	2,95 ± 0,55 b	49,25 ± 8,22 b	47,5 ± 4,95 d	77,0 ± 1,44 f	2,00 ± 0,00 a	5,09 ± 0,42 b	17,78 ± 1,56 d
UFLAC157	3,06 ± 0,32 b	51,00 ± 4,76 b	47,5 ± 2,12 d	83,0 ± 5,66 g	nf	5,01 ± 0,46 b	18,41 ± 1,89 d
UFLAC158	3,53 ± 0,40 c	58,00 ± 5,94 c	67,0 ± 4,24 e	89,5 ± 4,95 g	4,50 ± 2,12 a	4,09 ± 0,58 a	17,34 ± 1,57 c

Tabela 6, continuação

Isolado	IVCM*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAC159	3,73 ± 0,16 c	61,00 ± 2,45 c	43,5 ± 3,54 d	85,0 ± 5,66 g	1,50 ± 0,71 a	6,19 ± 2,17 c	16,34 ± 2,21 b
UFLAC160	2,90 ± 0,34 b	48,50 ± 5,07 b	61,5 ± 2,12 e	90,5 ± 6,12 g	2,30 ± 1,77 a	5,56 ± 0,78 c	16,63 ± 1,68 b
UFLAC161	3,10 ± 0,42 b	51,50 ± 6,24 b	69,0 ± 8,49 e	86,5 ± 12,02 g	6,00 ± 4,24 a	4,64 ± 0,55 a	15,56 ± 1,62 a
UFLAC162	3,23 ± 0,24 b	53,50 ± 3,70 b	77,5 ± 0,71 f	94,5 ± 5,00 g	3,75 ± 1,77 a	5,25 ± 0,81 c	17,72 ± 2,27 d
UFLAC163	2,03 ± 0,28 a	35,50 ± 4,20 a	59,0 ± 5,66 e	85,5 ± 6,36 g	2,00 ± 1,41 a	5,40 ± 0,68 c	18,31 ± 2,54 d
UFLAC164	3,37 ± 0,52 c	55,50 ± 7,85 c	72,0 ± 11,31 f	92,0 ± 5,96 g	4,75 ± 3,89 a	5,32 ± 0,92 c	17,00 ± 2,52 c
UFLAC165	3,52 ± 0,23 c	57,75 ± 3,50 c	61,5 ± 7,36 e	86,5 ± 4,95 g	5,75 ± 3,89 a	5,12 ± 0,41 b	18,02 ± 1,69 d
UFLAC166	3,37 ± 0,27 c	55,50 ± 4,04 c	11,0 ± 1,41 a	47,0 ± 19,80 d	8,50 ± 7,78 a	5,48 ± 0,59 c	17,12 ± 2,05 c
UFLAC167	2,68 ± 0,36 b	45,25 ± 5,38 b	4,0 ± 0,00 a	82,5 ± 2,03 g	1,50 ± 0,71 a	5,38 ± 0,61 c	16,14 ± 1,99 b
UFLAC168	3,35 ± 0,46 c	55,25 ± 6,95 c	30,0 ± 11,31 b	46,5 ± 9,19 d	2,75 ± 2,47 a	5,27 ± 0,72 c	17,23 ± 2,18 c
UFLAC169	4,40 ± 0,25 d	71,25 ± 4,11 d	8,0 ± 7,07 a	66,5 ± 6,36 e	8,50 ± 3,53 a	5,12 ± 0,69 b	17,64 ± 2,17 c
UFLAC170	4,40 ± 0,30 d	71,00 ± 4,55 d	66,5 ± 14,85 e	88,0 ± 9,90 g	6,00 ± 1,41 a	5,49 ± 0,51 c	17,08 ± 1,92 c
UFLAC171	3,78 ± 0,23 c	62,00 ± 3,83 c	25,5 ± 3,36 b	53,0 ± 8,49 d	1,50 ± 1,89 a	5,30 ± 0,57 c	16,80 ± 2,59 b
UFLAC172	3,18 ± 0,41 b	52,75 ± 6,13 b	4,00 ± 1,41 a	94,5 ± 0,71 g	2,00 ± 0,71 a	4,99 ± 0,87 b	15,84 ± 1,95 a
UFLAC173	4,30 ± 0,30 d	69,50 ± 4,51 d	47,5 ± 11,92 d	85,5 ± 12,02 g	6,50 ± 5,66 a	5,20 ± 0,64 c	16,85 ± 2,03 b
UFLAC174	2,95 ± 0,87 b	49,25 ± 13,1 b	41,0 ± 1,41 c	94,0 ± 1,36 g	22,00 ± 13,43 b	5,23 ± 0,70 c	17,63 ± 2,25 c
UFLAC175	2,87 ± 0,53 b	48,00 ± 8,04 b	28,5 ± 3,54 b	53,5 ± 7,78 d	2,00 ± 1,41 a	5,31 ± 0,91 c	17,09 ± 2,24 c
UFLAC176	2,97 ± 0,47 b	49,50 ± 7,05 b	25,5 ± 2,12 b	80,0 ± 4,24 f	1,50 ± 1,82 a	5,25 ± 0,57 c	16,56 ± 1,72 b
UFLAC177	4,12 ± 0,55 d	66,75 ± 8,26 d	44,0 ± 8,49 d	90,5 ± 4,97 g	8,25 ± 5,30 a	5,21 ± 0,68 c	17,44 ± 2,18 c
UFLAC178	3,35 ± 0,50 c	55,25 ± 7,50 c	40,0 ± 4,24 c	84,0 ± 5,68 g	nf	5,24 ± 0,59 c	16,79 ± 2,06 b
UFLAC179	2,85 ± 0,31 b	47,75 ± 4,57 b	61,0 ± 18,38 e	83,0 ± 11,31 g	3,00 ± 1,82 a	5,13 ± 0,84 b	17,99 ± 2,34 d
UFLAC180	4,07 ± 0,66 d	66,00 ± 9,83 d	45,0 ± 4,24 d	77,5 ± 4,95 f	1,50 ± 0,71 a	5,11 ± 0,74 b	17,40 ± 1,38 c
UFLAC181	2,17 ± 0,29 a	37,50 ± 4,36 a	37,0 ± 1,41 c	85,0 ± 2,83 g	1,75 ± 1,14 a	4,94 ± 0,78 b	16,22 ± 2,05 b
UFLAC182	4,17 ± 0,24 d	67,50 ± 3,70 d	35,0 ± 8,49 c	58,5 ± 10,61 d	1,50 ± 1,41 a	4,96 ± 0,63 b	17,77 ± 1,13 d
UFLAC183	2,38 ± 0,38 a	40,75 ± 5,68 a	43,0 ± 9,90 d	80,0 ± 4,24 f	2,25 ± 1,77 a	5,45 ± 0,81 c	16,74 ± 2,14 b
UFLAC184	3,07 ± 0,47 b	51,00 ± 6,98 b	42,5 ± 17,48 d	77,0 ± 16,87 f	nf	5,04 ± 0,51 b	16,28 ± 2,42 b
UFLAC185	3,77 ± 0,53 c	61,50 ± 7,94 c	53,0 ± 8,49 d	89,0 ± 6,18 g	12,80 ± 8,13 a	5,39 ± 0,90 c	15,19 ± 2,15 a
UFLAC186	4,50 ± 0,27 d	73,00 ± 4,04 d	6,0 ± 4,24 a	59,0 ± 5,36 d	3,00 ± 2,83 a	5,31 ± 1,05 c	17,11 ± 1,83 c
UFLAC187	1,76 ± 0,37 a	31,50 ± 5,51 a	4,0 ± 2,83 a	26,0 ± 9,90 a	2,25 ± 1,06 a	4,91 ± 0,39 b	16,78 ± 1,93 b
UFLAC188	4,08 ± 0,37 d	66,25 ± 5,56 d	7,0 ± 2,83 a	42,0 ± 5,65 c	1,75 ± 1,06 a	5,08 ± 0,50 b	15,64 ± 2,45 a
UFLAC189	2,77 ± 0,42 b	46,50 ± 6,35 b	22,5 ± 10,6 b	47,5 ± 19,09 d	4,50 ± 3,53 a	4,95 ± 0,34 b	16,68 ± 1,14 b

Tabela 6, continuação

Isolado	IVCM*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAC190	2,83 ± 0,45 b	47,50 ± 11,21 b	88,5 ± 12,02 g	94,5 ± 4,76 g	27,20 ± 5,30 b	5,06 ± 0,62 b	18,25 ± 1,84 d
UFLAC191	4,32 ± 0,39 d	69,75 ± 5,91 d	16,0 ± 8,49 a	42,0 ± 2,97 c	4,00 ± 3,53 a	5,10 ± 0,55 b	16,17 ± 1,75 b
UFLAC192	3,35 ± 0,75 c	55,25 ± 11,24 c	8,0 ± 4,24 a	30,5 ± 2,27 b	11,75 ± 3,18 a	5,19 ± 0,65 c	17,01 ± 2,51 c
UFLAC193	2,59 ± 0,85 b	43,75 ± 12,71 b	63,0 ± 16,97 e	90,0 ± 9,85 g	1,55 ± 6,36 a	5,05 ± 0,57 b	15,59 ± 1,78 a
UFLAC194	3,03 ± 0,39 b	50,50 ± 5,80 b	25,5 ± 3,54 b	54,5 ± 9,19 d	5,75 ± 2,47 a	5,05 ± 0,96 b	17,08 ± 2,79 c
UFLAC195	3,53 ± 0,63 c	58,00 ± 9,49 c	26,5 ± 3,54 b	50,5 ± 2,49 d	51,50 ± 0,94 d	4,44 ± 0,52 a	15,93 ± 2,11 a
UFLAC196	2,95 ± 0,25 b	49,25 ± 3,77 b	72,5 ± 3,54 f	94,0 ± 2,83 g	3,50 ± 0,71 a	5,17 ± 0,55 b	16,66 ± 2,05 b
UFLAC197	2,60 ± 0,36 b	44,00 ± 5,35 b	8,5 ± 6,36 a	38,5 ± 12,02 c	1,75 ± 1,06 a	4,76 ± 0,53 b	17,84 ± 1,59 d
UFLAC198	3,77 ± 0,25 c	61,50 ± 3,70 c	71,5 ± 4,95 e	91,5 ± 6,36 g	36,25 ± 13,08 c	5,16 ± 0,52 b	15,56 ± 2,07 a
UFLAC199	4,15 ± 0,26 d	67,50 ± 4,12 d	1,5 ± 2,12 a	26,0 ± 4,24 b	2,00 ± 0,71 a	5,76 ± 0,94 c	18,08 ± 1,35 d
UFLAC200	3,12 ± 0,43 b	51,75 ± 6,40 b	4,0 ± 1,41 a	33,0 ± 2,98 b	4,00 ± 4,24 a	4,86 ± 0,59 b	16,81 ± 2,40 b
UFLAC201	3,37 ± 0,40 c	55,50 ± 5,92 c	4,0 ± 1,41 a	28,5 ± 3,54 b	nf	5,01 ± 0,58 b	16,87 ± 2,28 b
UFLAC202	3,12 ± 0,31 b	51,75 ± 4,72 c	27,5 ± 3,54 b	65,5 ± 6,78 e	3,25 ± 1,77 a	5,06 ± 0,76 b	16,86 ± 2,10 b
UFLAC203	3,60 ± 0,52 c	59,00 ± 7,79 c	10,5 ± 3,56 a	35,5 ± 10,6 b	3,58 ± 0,94 a	5,39 ± 0,61 c	17,43 ± 1,66 c
UFLAC204	3,82 ± 0,69 c	62,25 ± 10,34 c	37,0 ± 5,66 c	73,0 ± 8,49 f	24,00 ± 5,66 b	5,37 ± 0,52 c	16,76 ± 1,71 b

\*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.  
nf = fusão de CATs não foi observada para este isolado

Tabela 7 Estimativas de médias e seus respectivos erros padrões para o IVC (mm/dia), diâmetro colonial (mm), germinação de conídios (%), anastomose entre conídios (%) e dimensão dos conídios ( $\mu\text{m}$ ), dos 73 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*

Isolado	IVC*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAG05-1	9,14 ± 0,58 a	73,75 ± 3,59 b	32,0 ± 9,90 c	67,5 ± 4,95 e	11,75 ± 2,47 a	2,88 ± 0,65 a	10,44 ± 0,83 c
UFLAG07-1	10,11 ± 0,24 b	78,00 ± 1,63 c	30,0 ± 2,83 c	51,5 ± 7,78 c	nf	7,67 ± 0,81 i	25,38 ± 1,61 m
UFLAG07-2	9,75 ± 0,47 b	77,00 ± 2,08 c	30,0 ± 4,24 c	86,5 ± 4,95 h	78,75 ± 6,01c	4,78 ± 0,71 f	15,43 ± 2,12 h
UFLAG08-1	9,89 ± 0,14 b	79,75 ± 0,50 c	34,5 ± 4,95 c	75,0 ± 9,90 f	nf	8,20 ± 0,73 j	31,59 ± 1,56 p
UFLAG10-1	9,39 ± 0,54 a	76,50 ± 3,70 c	38,5 ± 13,44 d	58,0 ± 15,56 d	39,00 ± 3,54 b	3,27 ± 0,64 b	9,88 ± 0,99 b
UFLAG13-1	9,57 ± 0,51 b	76,75 ± 2,50 c	20,5 ± 3,54 b	51,5 ± 9,19 c	33,50 ± 10,61 b	4,26 ± 0,54 e	13,43 ± 1,34 f
UFLAG15-1	9,89 ± 0,24 b	79,25 ± 1,50 c	80,0 ± 5,66 h	96,5 ± 3,54 i	nf	7,72 ± 0,78 i	28,71 ± 2,09 o
UFLAG15-2	10,07 ± 0,38 b	79,25 ± 0,96 c	21,5 ± 4,95 b	47,5 ± 6,36 c	13,75 ± 7,42 a	2,93 ± 0,58 a	9,05 ± 1,25 a
UFLAG20-1	9,86 ± 0,12 b	79,25 ± 1,50 c	10,0 ± 1,41 a	68,0 ± 2,83 e	6,00 ± 4,95 a	4,62 ± 0,67 e	12,27 ± 0,97 e
UFLAG21-1	9,68 ± 0,47 b	75,25 ± 3,40 b	7,0 ± 4,24 a	31,5 ± 4,95 a	2,50 ± 2,12 a	3,01 ± 0,65 a	10,89 ± 0,84 d
UFLAG21-2	9,79 ± 0,58 b	77,75 ± 4,50 c	74,0 ± 9,90 g	95,5 ± 6,36 i	nf	8,70 ± 0,81 j	27,01 ± 2,64 n
UFLAG23-1	9,50 ± 0,62 a	75,00 ± 5,29 b	14,5 ± 3,54 a	49,5 ± 9,19 c	10,75 ± 4,60 a	3,69 ± 0,76 c	10,91 ± 1,00 d
UFLAG25-1	9,78 ± 0,44 b	78,50 ± 3,00 c	32,0 ± 5,66 c	82,0 ± 9,90 g	52,75 ± 8,13 b	3,31 ± 0,73 b	10,54 ± 1,02 c
UFLAG26-1	9,53 ± 0,49 a	74,75 ± 4,27 b	11,5 ± 4,95 a	28,0 ± 5,66 a	nf	5,62 ± 0,63 g	15,33 ± 0,97 h
UFLAG29-1	9,04 ± 0,39 a	73,25 ± 2,22 b	80,5 ± 2,12 h	95,0 ± 2,83 i	9,25 ± 5,30 a	3,30 ± 0,66 b	11,29 ± 1,09 d
UFLAG30-1	9,85 ± 0,17 b	79,25 ± 0,96 c	50,0 ± 8,49 e	79,5 ± 2,12 g	nf	7,78 ± 0,97 i	22,92 ± 1,39 j
UFLAG30-2	9,61 ± 0,49 b	76,50 ± 4,73 c	33,0 ± 2,83 c	79,0 ± 5,66 g	3,25 ± 1,06 a	3,51 ± 0,85 c	8,46 ± 1,19 a
UFLAG34-1	9,79 ± 0,25 b	79,00 ± 1,15 c	11,5 ± 3,54 a	41,5 ± 6,36 b	1,75 ± 1,06 a	3,82 ± 0,56 d	11,42 ± 0,88 d
UFLAG35-1	9,25 ± 0,24 a	73,75 ± 2,22 b	54,0 ± 5,66 f	86,0 ± 4,24 h	6,75 ± 1,77 a	5,02 ± 0,70 f	10,65 ± 1,08 c
UFLAG36-1	9,68 ± 0,18 b	75,75 ± 0,96 b	71,0 ± 9,90 g	89,5 ± 9,19 h	32,25 ± 4,60 b	5,22 ± 0,64 g	13,63 ± 1,10 f
UFLAG37-1	9,32 ± 0,41 a	73,50 ± 3,11 b	27,0 ± 1,41 c	63,0 ± 1,41 d	6,00 ± 4,24 a	3,26 ± 0,56 b	12,59 ± 2,61 e
UFLAG39-1	10,07 ± 0,65 b	76,00 ± 4,24 b	27,5 ± 6,36 c	73,5 ± 9,19 f	nf	6,82 ± 0,87 h	22,80 ± 2,96 j
UFLAG41-1	8,79 ± 0,59 a	67,75 ± 3,95 a	57,5 ± 12,02 f	89,5 ± 6,36 h	57,75 ± 7,42 c	5,38 ± 0,76 g	10,03 ± 3,45 b
UFLAG43-1	8,89 ± 0,99 a	68,00 ± 8,37 a	47,5 ± 4,95 e	80,0 ± 8,49 g	nf	8,29 ± 0,99 j	26,26 ± 1,27 m
UFLAG43-2	9,75 ± 0,39 b	77,75 ± 3,30 c	50,5 ± 4,95 e	87,5 ± 6,36 h	nf	7,69 ± 0,87 i	25,45 ± 2,40 m
UFLAG45-1	9,99 ± 0,20 b	78,25 ± 2,22 c	87,0 ± 2,83 i	96,0 ± 1,41 i	22,25 ± 5,30 a	3,92 ± 0,59 d	15,25 ± 1,16 h
UFLAG46-1	9,85 ± 0,26 b	79,75 ± 0,50 c	28,5 ± 12,02 c	92,0 ± 1,41 i	16,25 ± 6,01 a	4,48 ± 0,75 e	10,62 ± 1,22 c

Tabela 7, continuação

Isolado	IVCM*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAG47-1	10,03 ± 0,46 b	79,00 ± 2,00 c	39,5 ± 10,61 d	71,0 ± 8,49 e	2,25 ± 1,77 a	3,95 ± 0,55 d	12,76 ± 3,44 e
UFLAG47-2	9,68 ± 0,29 b	78,25 ± 2,87 c	85,5 ± 7,78 i	96,0 ± 5,66 i	nf	7,86 ± 0,76 i	27,64 ± 2,83 n
UFLAG48-1	9,82 ± 0,29 b	78,50 ± 1,29 c	17,0 ± 5,66 b	42,5 ± 9,19 b	nf	3,29 ± 0,69 b	13,66 ± 1,16 f
UFLAG49-1	10,39 ± 0,18 b	78,50 ± 1,29 c	66,5 ± 10,61 g	87,0 ± 12,73 h	2,75 ± 1,77 a	4,36 ± 0,61 e	14,16 ± 1,20 g
UFLAG54-1	9,85 ± 0,20 b	79,75 ± 0,50 c	29,0 ± 8,49 c	57,0 ± 9,90 d	8,50 ± 2,83 a	4,56 ± 0,59 e	14,43 ± 2,26 g
UFLAG54-2	9,71 ± 0,31 b	79,00 ± 2,00 c	88,0 ± 8,49 i	96,5 ± 2,12 i	nf	6,66 ± 0,84 h	22,27 ± 2,21 j
UFLAG55-1	9,78 ± 0,53 b	75,50 ± 3,42 b	81,0 ± 5,66 h	93,5 ± 3,54 i	58,50 ± 14,85 c	3,30 ± 0,63 b	13,48 ± 1,04 f
UFLAG60-1	10,10 ± 0,47 b	77,75 ± 2,63 c	91,5 ± 2,12 i	97,5 ± 0,71 i	35,00 ± 12,02 b	3,60 ± 0,70 c	11,99 ± 1,39 d
UFLAG61-1	10,03 ± 0,07 b	79,25 ± 0,96 c	57,5 ± 4,95 f	88,0 ± 5,66 h	23,00 ± 2,83 a	4,38 ± 0,66 e	13,87 ± 1,41 f
UFLAG64-1	10,00 ± 0,31 b	76,75 ± 3,40 c	29,0 ± 5,66 c	59,5 ± 10,61 d	40,00 ± 6,36 b	3,61 ± 0,63 c	11,18 ± 1,52 d
UFLAG68-1	9,43 ± 0,35 a	76,50 ± 2,38 c	6,0 ± 4,24 a	39,0 ± 8,49 b	10,50 ± 2,12 a	4,04 ± 0,60 d	11,41 ± 1,20 d
UFLAG73-1	10,03 ± 0,32 b	79,25 ± 0,96 c	42,5 ± 6,36 d	91,0 ± 4,24 h	nf	7,65 ± 0,76 i	23,60 ± 2,35 l
UFLAG73-2	9,86 ± 0,31 b	79,75 ± 0,50 c	38,5 ± 9,19 d	72,0 ± 4,24 f	nf	8,31 ± 0,79 j	25,44 ± 1,53 m
UFLAG74-1	9,46 ± 0,47 a	73,25 ± 4,35 b	48,5 ± 6,36 e	68,0 ± 9,90 e	15,00 ± 6,36 a	4,21 ± 0,62 e	9,59 ± 1,08 b
UFLAG75-1	9,64 ± 0,14 b	76,75 ± 2,22 c	26,5 ± 6,36 b	62,0 ± 8,49 d	49,50 ± 12,02 b	4,34 ± 0,78 e	12,34 ± 1,25 e
UFLAG79-1	9,99 ± 0,20 b	78,75 ± 1,89 c	17,0 ± 2,83 b	42,0 ± 8,49 b	2,50 ± 0,71 a	4,90 ± 0,76 f	13,37 ± 1,33 f
UFLAG82-1	9,54 ± 0,43 a	77,75 ± 2,22 c	61,0 ± 4,24 f	70,5 ± 2,12 e	4,25 ± 4,60 a	3,22 ± 0,67 b	12,52 ± 1,21 e
UFLAG83-1	9,18 ± 0,58 a	75,75 ± 2,99 b	41,5 ± 10,61 d	69,0 ± 1,41 e	62,00 ± 12,73 c	4,30 ± 0,63 e	13,91 ± 3,37 f
UFLAG84-1	9,93 ± 0,30 b	79,25 ± 1,50 c	88,5 ± 4,95 i	96,0 ± 2,83 i	nf	8,36 ± 0,78 j	29,22 ± 4,39 o
UFLAG85-1	8,89 ± 0,32 a	70,50 ± 1,29 a	82,5 ± 10,61 h	92,0 ± 5,66 i	67,25 ± 9,55 c	5,13 ± 0,69 f	15,06 ± 1,10 h
UFLAG86-1	9,68 ± 0,14 b	79,25 ± 0,96 c	79,5 ± 12,02 h	93,0 ± 4,24 i	4,75 ± 1,77 a	4,84 ± 0,65 f	15,39 ± 1,27 h
UFLAG88-1	9,64 ± 0,27 b	79,75 ± 0,50 c	18,0 ± 4,24 b	47,0 ± 5,66 c	1,75 ± 1,06 a	3,96 ± 0,50 d	8,64 ± 1,05 a
UFLAG89-1	9,64 ± 0,18 b	80,00 ± 0,00 c	67,0 ± 4,24 g	86,0 ± 1,41 h	10,00 ± 5,66 a	4,14 ± 0,59 e	15,21 ± 0,90 h
UFLAG91-1	9,85 ± 0,17 b	78,50 ± 1,29 c	72,5 ± 7,78 g	81,0 ± 4,24 g	4,25 ± 1,77 a	3,46 ± 0,76 b	11,07 ± 0,96 d
UFLAG92-1	9,89 ± 0,24 b	78,50 ± 1,73 c	21,0 ± 4,24 b	65,5 ± 2,12 e	20,00 ± 4,95 a	4,20 ± 0,72 e	12,22 ± 0,94 e
UFLAG93-1	9,93 ± 0,34 b	79,50 ± 1,00 c	44,5 ± 4,95 d	68,0 ± 1,41 e	8,25 ± 1,06 a	4,16 ± 0,57 e	10,94 ± 1,20 d
UFLAG97-1	9,07 ± 0,18 a	73,25 ± 1,26 b	60,5 ± 9,19 f	87,0 ± 5,66 h	67,75 ± 5,30 c	5,07 ± 0,85 f	9,57 ± 1,03 b
UFLAG98-1	9,96 ± 0,32 b	78,50 ± 1,91 c	15,0 ± 1,41 b	44,0 ± 4,24 b	3,00 ± 2,12 a	4,11 ± 0,57 e	15,85 ± 1,26 h
UFLAG99-1	9,79 ± 0,27 b	78,25 ± 1,26 c	47,0 ± 8,49 e	88,0 ± 5,66 h	46,50 ± 11,31 b	4,87 ± 0,73 f	15,80 ± 1,16 h
UFLAG101-1	9,71 ± 0,26 b	79,25 ± 0,96 c	88,0 ± 8,49 i	94,5 ± 0,71 i	nf	7,42 ± 0,93 i	25,54 ± 1,36 m

Tabela 7, continuação

Isolado	IVCM*	Diâmetro colonial*	% germinação*		% de CATs*	Dimensão dos conídios*	
			24h	48h		Largura	Comprimento
UFLAG104-1	10,50 ± 0,18 b	78,50 ± 1,29 c	83,0 ± 5,66 h	95,5 ± 0,71 i	nf	8,49 ± 0,84 j	32,78 ± 1,34 q
UFLAG104-2	10,03 ± 0,13 b	79,25 ± 1,50 c	59,0 ± 11,31 f	75,0 ± 5,66 f	0,75 ± 1,06 a	3,41 ± 0,62 b	10,47 ± 1,13 c
UFLAG106-1	9,68 ± 0,14 b	76,25 ± 1,89 c	88,5 ± 6,36 i	98,5 ± 2,12 i	nf	7,68 ± 0,69 i	25,66 ± 1,52 m
UFLAG106-2	9,18 ± 0,79 a	73,75 ± 4,57 b	51,5 ± 4,95 e	65,5 ± 2,12 e	41,50 ± 9,90 b	4,53 ± 0,78 e	10,31 ± 1,37 c
UFLAG107-1	9,18 ± 0,22 a	75,00 ± 0,82 b	70,5 ± 12,02 g	84,5 ± 4,95 g	40,50 ± 4,95 b	3,78 ± 0,65 d	10,56 ± 1,29 c
UFLAG108-1	9,22 ± 0,19 a	73,25 ± 1,50 b	30,0 ± 9,90 c	79,0 ± 4,24 g	34,50 ± 8,49	4,94 ± 0,88 f	14,79 ± 1,26 g
UFLAG109-1	9,32 ± 0,18 a	75,75 ± 1,50 b	81,0 ± 4,24 h	93,5 ± 3,54 i	41,50 ± 7,78 b	3,64 ± 0,68 c	9,60 ± 1,28 b
UFLAG110-1	9,50 ± 0,18 a	74,00 ± 1,63 b	40,0 ± 8,49 d	79,0 ± 1,41 g	50,75 ± 11,67 b	3,61 ± 0,66 c	10,45 ± 1,01 c
UFLAG111-1	9,39 ± 0,31 a	73,50 ± 2,38 b	89,5 ± 4,95 i	95,5 ± 2,12 i	66,50 ± 9,19 c	4,35 ± 0,65 e	9,72 ± 1,09 b
UFLAG112-1	9,78 ± 0,38 b	79,50 ± 1,00 c	79,5 ± 6,36 h	92,0 ± 4,24 i	nf	6,73 ± 0,60 h	22,90 ± 1,37 j
UFLAG113-1	9,93 ± 0,08 b	77,50 ± 1,91 c	70,5 ± 3,54 g	82,5 ± 0,71 g	nf	6,32 ± 0,41 h	20,50 ± 2,45 i
UFLAG114-1	9,57 ± 0,11 b	75,25 ± 1,26 b	86,0 ± 1,41 i	93,0 ± 1,41 i	45,25 ± 1,77 b	3,55 ± 0,78 c	9,26 ± 1,11 b
UFLAG116-1	9,60 ± 0,21 b	75,50 ± 1,73 b	39,5 ± 2,12 d	55,5 ± 3,54 d	11,50 ± 1,06 a	3,28 ± 0,73 b	10,23 ± 1,33 c
UFLAG117-1	9,22 ± 0,25 a	74,50 ± 1,29 b	86,0 ± 2,83 i	97,5 ± 0,71 i	44,85 ± 12,81 b	3,94 ± 0,86 d	10,60 ± 2,79 c
UFLAG118-1	9,89 ± 0,14 b	79,50 ± 1,00 c	85,5 ± 6,36 i	96,5 ± 2,12 i	nf	6,75 ± 0,54 h	24,43 ± 2,34 l
UFLAG119-1	9,50 ± 0,34 a	76,75 ± 2,50 c	85,0 ± 4,24 i	97,0 ± 4,24 i	nf	7,52 ± 0,55 i	26,21 ± 1,37 m

\*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott. nf = fusão de CATs não foi observada para este isolado

Tabela 8 Porcentagem de cruzamentos sexuais compatíveis para os 74 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

Isolado	% cruzamentos compatíveis	Isolado	% cruzamentos compatíveis	Isolado	% cruzamentos compatíveis
UFLAC121	nc	UFLAC156	nc	UFLAC181	nc
UFLAC122	nc	UFLAC157	1,35	UFLAC182	1,35
UFLAC130	nc	UFLAC158	1,35	UFLAC183	1,35
UFLAC131	nc	UFLAC159	nc	UFLAC184	1,35
UFLAC132	nc	UFLAC160	nc	UFLAC185	2,70
UFLAC134	1,35	UFLAC161	5,41	UFLAC186	2,70
UFLAC135	1,35	UFLAC162	2,70	UFLAC187	nc
UFLAC136	1,35	UFLAC163	nc	UFLAC188	nc
UFLAC137	1,35	UFLAC164	nc	UFLAC189	nc
UFLAC138	6,75	UFLAC165	2,70	UFLAC190	nc
UFLAC139	5,41	UFLAC166	nc	UFLAC191	nc
UFLAC140	nc	UFLAC167	nc	UFLAC192	5,41
UFLAC141	10,81	UFLAC168	1,35	UFLAC193	2,70
UFLAC142	nc	UFLAC169	2,70	UFLAC194	4,11
UFLAC143	nc	UFLAC170	nc	UFLAC195	12,16
UFLAC144	2,70	UFLAC171	1,35	UFLAC196	2,70
UFLAC145	4,11	UFLAC172	nc	UFLAC197	nc
UFLAC146	2,70	UFLAC173	nc	UFLAC198	6,75
UFLAC147	1,35	UFLAC174	nc	UFLAC199	6,75
UFLAC148	1,35	UFLAC175	5,41	UFLAC200	nc
UFLAC149	1,35	UFLAC176	1,35	UFLAC201	5,41
UFLAC152	1,35	UFLAC177	1,35	UFLAC202	nc
UFLAC153	1,35	UFLAC178	1,35	UFLAC203	1,35
UFLAC154	1,35	UFLAC179	1,35	UFLAC204	1,35
UFLAC155	nc	UFLAC180	nc		

Tabela 9 Classificação dos 73 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* como homotáticos e/ou heterotáticos e porcentagem de cruzamentos sexuais compatíveis nas modalidades: 1 - para os cruzamentos que produziram apenas protopetitécios, 2 - para os cruzamentos que produziram peritécios férteis em ambas as situações, com e sem o uso da membrana de diálise e 3 - para os cruzamentos que produziram peritécios férteis apenas quando não foi utilizada a membrana de diálise entre os isolados

Isolado	Classificação sexual	% cruzamentos compatíveis (1)	% cruzamentos compatíveis (2)	% cruzamentos compatíveis (3)
UFLAG05-1	nc	nc	1,37	nc
UFLAG07-1	homotático	nc	nc	nc
UFLAG07-2	heterotático	1,37	nc	1,37
UFLAG08-1	homotático/heterotático	1,37	2,74	1,37
UFLAG10-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG13-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG15-1	homotático/heterotático	2,74	nc	1,37
UFLAG15-2	heterotático	1,37	1,37	1,37
UFLAG20-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG21-1	heterotático	1,37	nc	nc
UFLAG21-2	homotático/heterotático	2,74	1,37	1,37
UFLAG23-1	nc	nc	nc	2,74
UFLAG25-1	nc	nc	nc	2,74
UFLAG26-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG29-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG30-1	homotático/heterotático	1,37	2,74	1,37
UFLAG30-2	nc	nc	nc	2,74
UFLAG34-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG35-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG36-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG37-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG39-1	homotático	nc	nc	2,74
UFLAG41-1	heterotático	nc	nc	1,37
UFLAG43-1	homotático/heterotático	1,37	nc	2,74

Tabela 9, continuação

Isolado	Classificação sexual	% cruzamentos compatíveis (1)	% cruzamentos compatíveis (2)	% cruzamentos compatíveis (3)
UFLAG43-2	homotático/heterotático	1,37	nc	2,74
UFLAG45-2	heterotático	1,37	nc	1,37
UFLAG46-1	heterotático	1,37	nc	1,37
UFLAG47-1	heterotático	2,74	nc	nc
UFLAG47-2	homotático/heterotático	2,74	1,37	nc
UFLAG48-1	heterotático	nc	nc	1,37
UFLAG49-1	heterotático	2,74	1,37	nc
UFLAG54-1	heterotático	1,37	1,37	1,37
UFLAG54-2	homotático/heterotático	1,37	nc	1,37
UFLAG55-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG60-1	nc	nc	1,37	nc
UFLAG61-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG64-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG68-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG73-1	homotático	nc	6,85	1,37
UFLAG73-2	homotático	nc	nc	nc
UFLAG74-1	nc	nc	5,48	1,37
UFLAG75-1	heterotático	4,11	2,74	1,37
UFLAG79-1	nc	nc	nc	4,11
UFLAG82-1	nc	nc	nc	4,11
UFLAG83-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG84-1	homotático	nc	nc	nc
UFLAG85-1	nc	nc	nc	2,74
UFLAG86-1	nc	nc	nc	2,74
UFLAG88-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG89-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG91-1	nc	nc	nc	nc

Tabela 9, continuação

Isolado	Classificação sexual	% cruzamentos compatíveis (1)	% cruzamentos compatíveis (2)	% cruzamentos compatíveis (3)
UFLAG92-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG93-1	nc	nc	nc	1,37
UFLAG97-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG98-1	heterotático	1,37	nc	2,74
UFLAG99-1	nc	nc	nc	nc
UFLAG101-1	homotático/heterotático	8,22	nc	nc
UFLAG104-1	homotático/heterotático	6,85	nc	nc
UFLAG104-2	heterotático	4,11	2,74	nc
UFLAG106-1	homotático/heterotático	1,37	nc	nc
UFLAG106-3	heterotático	1,37	nc	nc
UFLAG107-2	heterotático	1,37	nc	nc
UFLAG108-1	heterotático	2,74	nc	nc
UFLAG109-1	nc	nc	1,37	nc
UFLAG110-1	heterotático	2,74	4,11	nc
UFLAG111-1	heterotático	2,74	1,37	nc
UFLAG112-1	homotático/heterotático	2,74	2,74	1,37
UFLAG113-1	homotático/heterotático	2,74	2,74	nc
UFLAG114-1	nc	nc	1,37	1,37
UFLAG116-1	heterotático	1,37	1,37	nc
UFLAG117-1	heterotático	2,74	1,37	nc
UFLAG118-1	homotático/heterotático	1,37	1,37	nc
UFLAG119-1	homotático	nc	5,48	5,48

nc = não se aplica

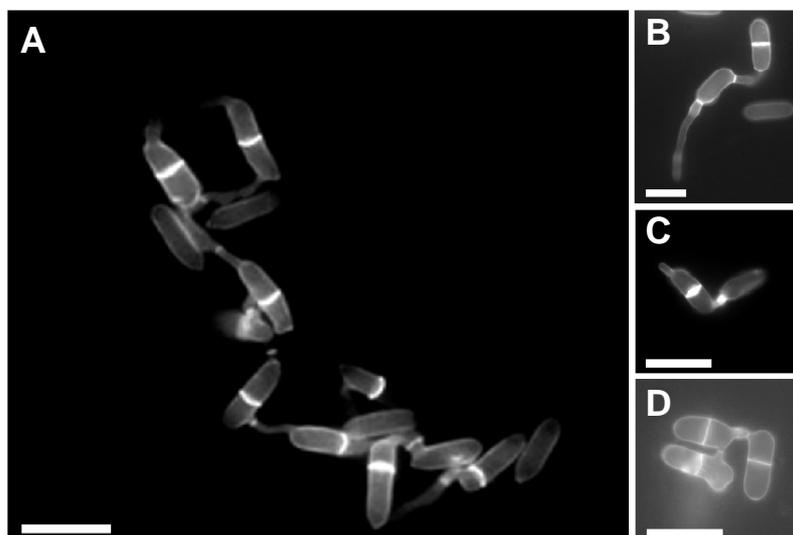


Figura 8 Micografia de epifluorescência mostrando tubos de anastomose de conídios em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, corados com Calcofluor White, na concentração de 0,12 M. (A) Cadeia de conídios fundidos do isolado UFLAC146; (B) fusão de conídios do isolado UFLAC198; (C) fusão de conídios do isolado UFLAG55-1 e (D) fusão de conídios do isolado UFLAG117-1. Barra: 10  $\mu$ m

Na avaliação para a população de isolados sexuais, observou-se que 75 combinações (2,78%) apresentaram a formação da linha de contato entre os isolados pareados. Entretanto, para 26 destas combinações não foram detectados peritécios férteis e viáveis na linha de contato, com formação apenas de protoperitécios. Outras 49 combinações testadas apresentaram a formação da linha de contato, sendo observados peritécios férteis com alta produção de ascos e ascósporos. Estas combinações foram testadas novamente utilizando-se uma membrana de diálise separando os dois isolados, o que impede o contato direto entre eles. Das 49 combinações testadas, 28 passaram a não formar mais a linha de contato após o uso da membrana entre os isolados (Figura 9). As outras 21 combinações continuaram a produzir a linha de peritécios férteis, mesmo após a

ausência do contato físico entre elas, indicando que um dos isolados estava induzindo o parceiro a produzir peritécios férteis. Nestes casos, a linha de peritécios foi sempre formada no lado do isolado conidial (Figura 9). Apenas 16 isolados não foram compatíveis em nenhuma das combinações testadas (Tabela 9).

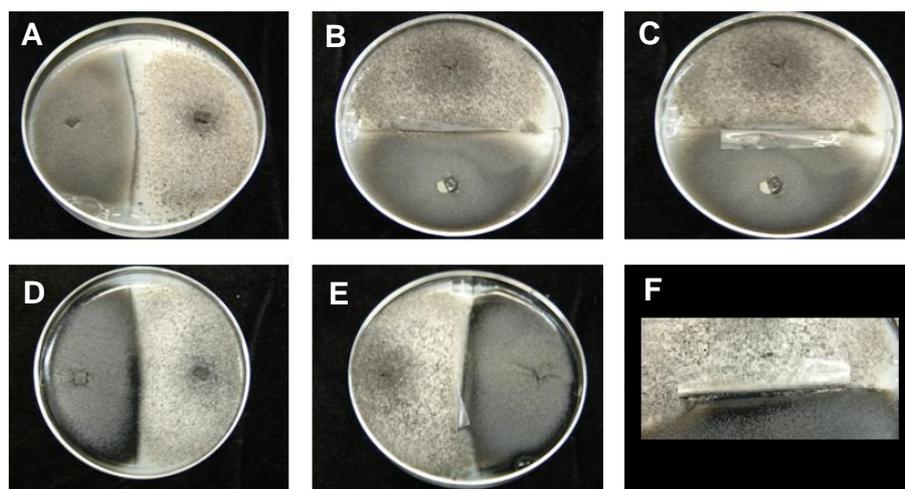


Figura 9 Pareamentos dos isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* em meio de cultura sem e com o uso de membranas de diálise. (A) Isolados UFLAG47-1 e UFLAG47-2 com formação de peritécios férteis e viáveis na linha de contato; (B e C) isolados UFLAG47-1 e UFLAG47-2 pareados com a membrana de diálise, sendo que a linha de peritécios não é mais observada; (D) isolados UFLAG21-2 e UFLAG104-2 com formação de peritécios férteis e viáveis na linha de contato; (E) isolados UFLAG21-2 e UFLAG104-2 pareados com a membrana de diálise, sendo a linha de peritécios ainda observada e (F) linha de peritécios férteis, formada do lado do isolado conidial (UFLAG104-2)

Considerando apenas os isolados que produziram peritécios férteis apenas quando a membrana de diálise não impediu o contato entre eles, os isolados UFLAG101-1 e UFLAG104-1 apresentaram-se compatíveis em maior número de combinações, 8,22% e 6,85%, respectivamente. Dos 73 isolados analisados, seis foram classificados apenas como homotáticos, 14 como

homotáticos/heterotáticos e outros 20 foram classificados apenas como heterotáticos (Tabela 9).

#### 4.7 Análises de PCR

Todos os isolados assexuais avaliados amplificaram a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* (GARCÍA-SERRANO et al., 2008), confirmando que os isolados são da espécie *C. lindemuthianum* (Figura 10). Os isolados sexuais, quando testados com este mesmo par de *primers* (HMGCLF e HMGCLR), não geraram produtos de amplificação. Entretanto, quando testados com o par de *primers* específico para a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* desenvolvido por Barcelos, Souza e Silva (2011), todos os isolados amplificaram a banda correspondente, com exceção dos isolados UFLAG85-1, UFLAG86-1, UFLAG89-1, UFLAG92-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1 (Figura 10).

#### 4.8 Sequenciamento e análise filogenética

A árvore filogenética gerada pelos dados de sequenciamento e por sequências extraídas do GenBank permitiu o agrupamento dos isolados similares para a região analisada (região ITS do DNA ribossômico). Foram formados três grupos, considerando os isolados analisados da população sexual (Figura 11). Os isolados UFLAG85-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1 agruparam-se em um bloco único, o qual está relacionado com o grupo formado pelos isolados UFLAG46-1 e UFLAG104-1. O outro grupo gerado, formado pelos isolados UFLAG112-1 e UFLAG118-1, relacionou-se mais intimamente com os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, cujas sequências foram extraídas do GenBank. O isolado controle de *C. lindemuthianum* agrupou-se com a sequência da mesma espécie retirada do GenBank e o isolado controle de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* agrupou-se com a sequência de *C. gloeosporioides* extraída do GenBank.

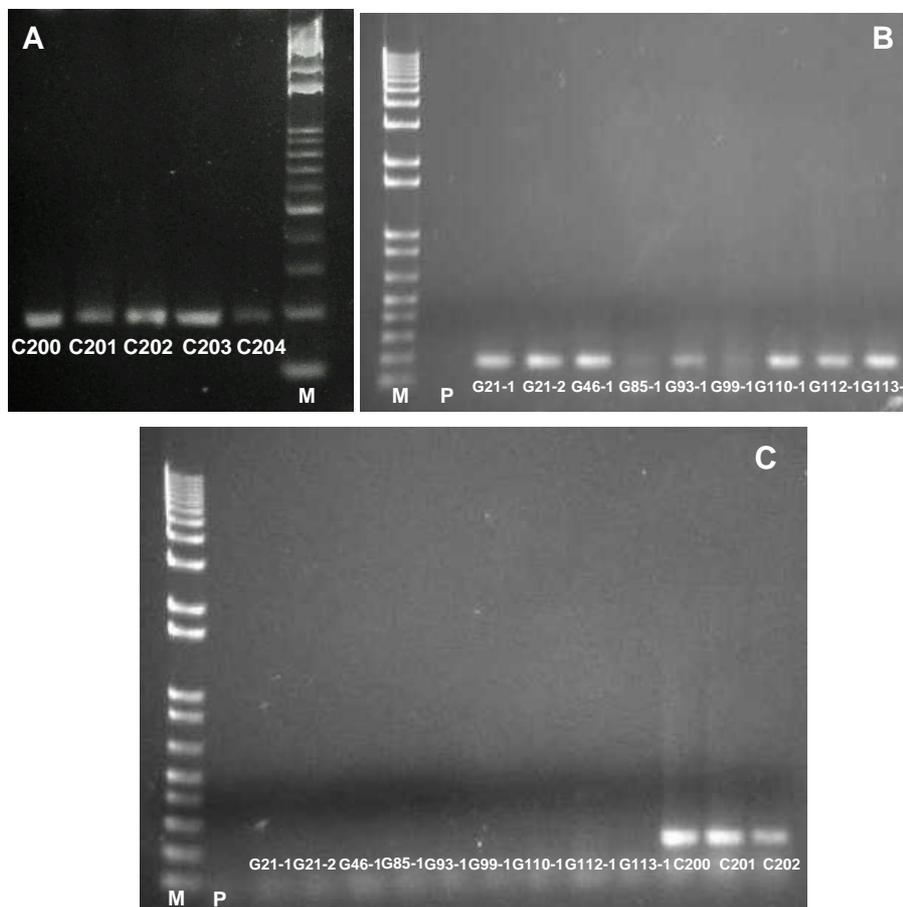


Figura 10 Produtos da amplificação de reação de polimerase em cadeia (PCR) para isolados representativos de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, o controle da reação (P) e o marcador molecular de 100-pb (M), utilizando os *primers* específicos para a população assexual e para a população sexual. (A) Produtos da amplificação obtidos usando os *primers* HMGCLF e HMGCLR para os isolados de *C. lindemuthianum* indicados; (B) produtos da amplificação obtidos usando os *primers* HMGGLOF e HMGGLOR para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* indicados e (C) produtos da amplificação obtidos usando os *primers* HMGCLF e HMGCLR, para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e *C. lindemuthianum* indicados

#### 4.9 Compatibilidade vegetativa

Nos testes de seleção de mutantes *nit*, foi observada a formação de setores para todos os isolados analisados em meio mínimo + clorato de potássio, na concentração de 3,0%. Nos testes com concentração de clorato de potássio menor (2,5%), não houve inibição do crescimento das colônias, sendo esta concentração considerada insuficiente para a obtenção dos setores resistentes ao clorato de potássio. Após a seleção dos setores que apresentaram hifas aéreas e crescimento esparsos em meio mínimo, obteve-se um total de cinco colônias para o isolado UFLAG21-1 (M1-M5), quatro para o isolado UFLAG46-1 (M6-M9), duas para o isolado UFLAG47-2 (M10-M11), três para o isolado UFLAG93-1 (M12-M14) e três para o isolado UFLAG112-1 (M15-M17). Os setores selecionados dos isolados periteciais, UFLAG47-2 e UFLAG112-1, não produziram mais peritécios após crescimento no meio seletivo com clorato de potássio. Os setores provenientes do isolado UFLAG112-1 passaram a produzir conídios e os setores provenientes do isolado UFLAG47-2 não produziram nenhum tipo de esporo. Culturas monospóricas foram obtidas, com exceção dos setores do isolado UFLAG47-2, que não apresentou produção de esporos, sendo estes mutantes descartados pela impossibilidade de se obter, a partir destes, culturas puras geneticamente.

O fenótipo dos mutantes *nit* foi identificado por meio do teste em diferentes meios de cultura, assim como apresentado na Figura 12. Dos 15 mutantes recuperados, 10 foram classificados como *nit3* (M2, M3, M4, M5, M7, M8, M9, M12, M13, M14, M15), 3 como *nit1* (M1, M6 e M16) e 1 como *nitM* (M17).

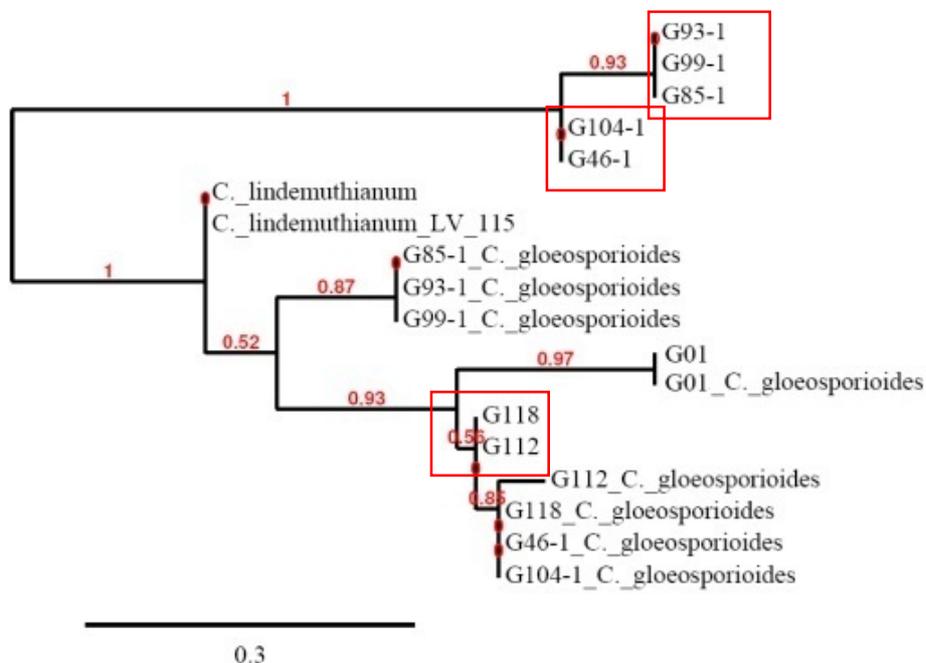


Figura 11 Árvore filogenética baseada na sequência ITS do DNA ribossômico para isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* indicados pelos quadrados vermelhos, para um isolado controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (LV115) e para um isolado controle de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (G01). As demais sequências foram extraídas do Genbank, para fins comparativos

Para três dos quatro isolados avaliados (UFLAG21-1, UFLAG46-1 e UFLAG112-1) foram obtidos tanto mutantes *nit1* quanto mutantes *nit3*. Portanto, para estes três isolados, a autocompatibilidade foi testada. Dois isolados (UFLAG46-1 e UFLAG112-1) se mostraram autoincompatíveis, não ocorrendo a formação de heterocáριο e crescimento de micélio aéreo na linha de interseção entre mutantes *nit1* e *nit3* do mesmo isolado. Entretanto, quando os mutantes *nit1* e *nit3* obtidos a partir do isolado UFLAG21-1 foram pareados em meio mínimo, pode-se notar a formação de um micélio aéreo na zona de contato entre as colônias (Figura 13).

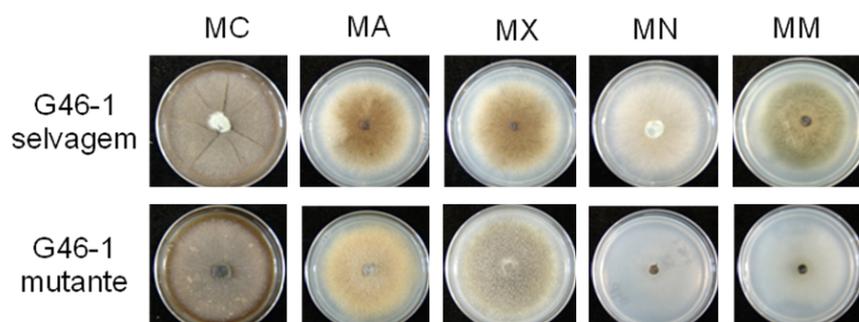


Figura 12 Crescimento do tipo selvagem e do mutante (M8) do isolado UFLAG46-1 em meio completo (MC), meio basal + tartarato de amônia (MA), hipoxantina (MX), nitrito de sódio (MN) e nitrato de sódio (MM). O crescimento robusto em MC, MA e MX indica que o mutante é classificado como *nit3*

Os resultados dos testes de compatibilidade vegetativa permitiram classificar os quatro isolados analisados em três VCGs distintos. Os isolados UFLAG93-1 e UFLAG112-1 foram incompatíveis em todas as combinações testadas, sendo classificados em diferentes VCGs. No entanto, os isolados UFLAG21-1 e UFLA46-1 demonstraram forte complementação, sendo classificados dentro de um mesmo VCG. O heterocário, ou seja, uma densa linha de crescimento foi formada na área de contato entre o mutante *nit1* (M1) proveniente do isolado UFLAG21-1 e os mutantes *nit3* (M7, M8 e M9), conforme demonstrado na Figura 13. Não foi observada nenhuma complementação entre os mutantes *nit3* e *nitM*. O micélio do heterocário foi transferido para uma placa de Petri contendo meio mínimo + clorato de potássio (3,0%). A colônia apresentou crescimento no meio seletivo contendo o clorato de potássio, indicando que o fenótipo (resistência a esse composto químico) é mantido pelo heterocário.

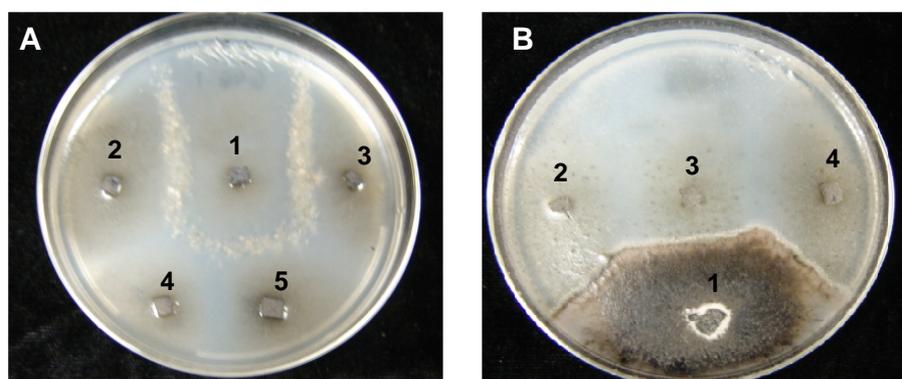


Figura 13 Heterocário formado entre mutantes *nit* complementares. (A) Autocompatibilidade: formação de heterocário entre o mutante *nit1* (1) e os mutantes *nit3* (2, 3, 4 e 5), obtidos a partir do isolado UFLAG21-1 e (B) compatibilidade vegetativa: formação de heterocário entre o mutante *nit1* (1), obtido a partir do isolado UFLAG21-1 e os mutantes *nit3* (2, 3 e 4), obtidos a partir do isolado UFLAG46-1

#### 4.10 Análises de RAPD

Dos quatro *primers* testados, três exibiram polimorfismo, amplificando um total de 32 bandas polimórficas, gerando, em média, 10,6 bandas polimórficas por *primer*. Com base nas 32 bandas polimórficas, foi construída uma matriz de similaridade genética e, utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice, foram obtidas as estimativas das similaridades genéticas, que variaram de 0,17 a 1,0. Para melhor visualização foi construído um dendograma (Figura 14). A linha de corte dada pela estimativa de *sgm*, a 1% de probabilidade pelo teste de *t*, foi de 0,72. Pela análise do dendograma foi possível observar a formação de 16 grupos de similaridade. Os isolados de *C. lindemuthianum* foram agrupados, formando o grupo denominado XII e os isolados de *G. cingulata* f. *sp. phaseoli* formaram 15 grupos distintos.

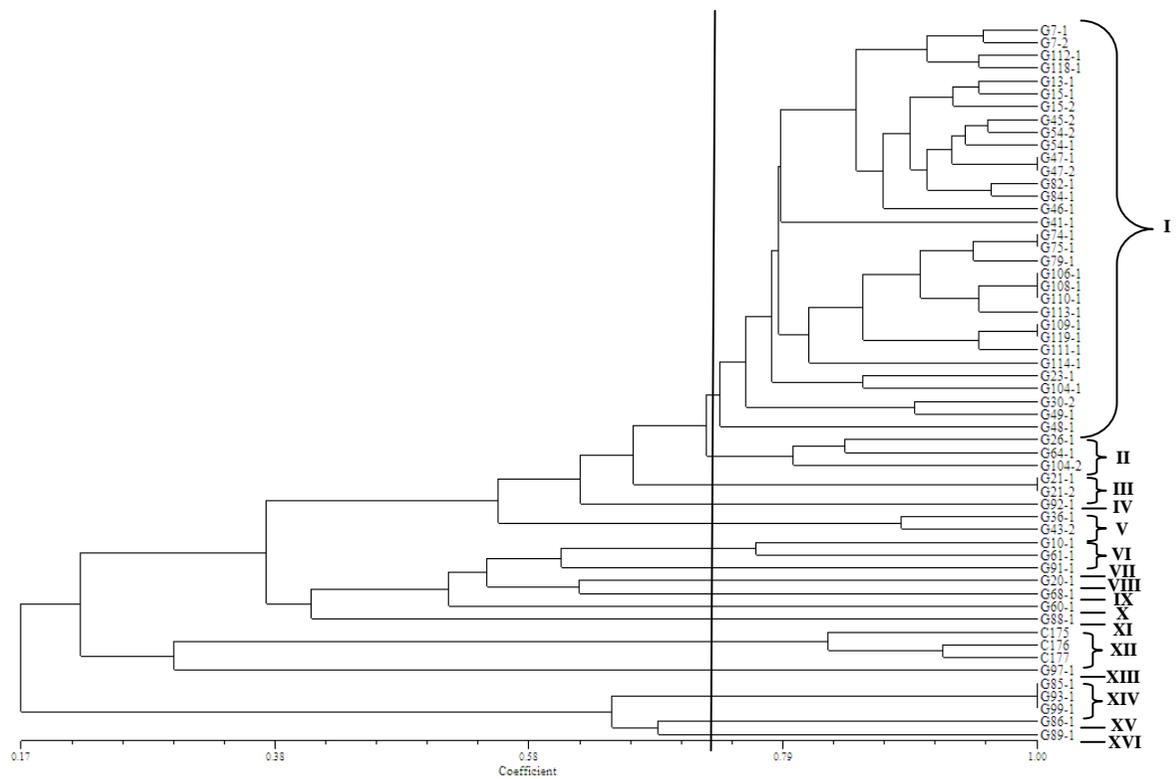


Figura 14 Dendrograma de similaridade genética de 52 isolados de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaeoli* e 3 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

## 5 DISCUSSÃO

Ambos os tipos de colônia, com características típicas de *C. lindemuthianum* (fase assexual) e com características da fase sexual do patógeno, têm sido isolados a partir de lesões de antracnose do feijoeiro provenientes do campo sem nenhum tipo de indução, tais como meio ou nutriente específico. Após estudos utilizando isolados pertencentes à fase sexual do patógeno, notou-se claramente que estas colônias apresentam algumas características que as diferem das colônias da fase assexual (ISHIKAWA et al., 2010a; BARCELOS, 2010; BARCELOS; SOUZA; VAILLANCOURT, 2011). Neste estudo, analisando a população proveniente de colônias típicas de *C. lindemuthianum* separadamente da população de isolados provenientes de colônias típicas de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, todos os caracteres avaliados demonstraram grande variabilidade dentro de cada população. Ademais, estes caracteres demonstraram variabilidade também entre as populações analisadas.

A avaliação da patogenicidade dos fitopatógenos é uma análise essencial para monitorar a variabilidade de uma espécie e determinar a importância da mesma para a cultura afetada pela doença. Os testes de patogenicidade para a população assexual de *C. lindemuthianum* são importantes e bem estabelecidos na literatura (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Os 74 isolados da população assexual foram patogênicos à cultivar suscetível Pérola e revelaram seis padrões distintos de virulência, quando inoculados nas cultivares diferenciadoras (Tabela 4). Estes resultados demonstram que o patógeno apresenta alta variabilidade, considerando que a amostragem foi feita em somente dois locais (Lavras e Lambari, MG), no ano de 2009. A raça 65 foi a mais frequente (62,16%), correspondendo a 82,14% dos isolados coletados em Lavras. Embora esta alta frequência da raça 65 no Brasil seja confirmada em trabalhos prévios (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007; TALAMINI et al.,

2004), a coleta de material na região de Lavras em um único hospedeiro (cultivar BRS Majestoso) pode ter contribuído para a alta porcentagem desta raça neste local (Tabela 2).

Por outro lado, apesar de terem sido isolados a partir de lesões típicas de antracnose do feijoeiro, apenas 6 dos 53 isolados conidiais de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* inoculados na cultivar suscetível Pérola apresentaram sintomas típicos de antracnose, muito embora estes sintomas tenham sido mais brandos que os apresentados pela cultivar, quando inoculada com os isolados da fase assexual. Ishikawa et al. (2010a) concluíram que essa diferença de sintomas apresentada pelas fases sexual e assexual do patógeno não é caracterizada por eventos de pré-penetração, pois ambos os tipos de isolados germinam e formam apressórios na superfície de plantas de feijoeiro, apresentando apenas diferenças temporais no desenvolvimento de tais estruturas.

Barcelos (2010) verificou que as estruturas pós-penetração, como vesícula de infecção e hifas primárias, não foram encontradas para o isolado da fase sexual após inoculação na cultivar suscetível Pérola. Em contrapartida, o isolado da fase assexual, quando inoculado na mesma cultivar, apresentou a formação destas estruturas 72 horas após a infecção. Quando esta mesma autora realizou experimentos de coinoculação do isolado sexual transformante expressando a proteína verde fluorescente, foi detectada a formação de hifas do isolado transformante sobre as lesões de antracnose causadas pelo isolado selvagem. Estes resultados sugerem que ambos os isolados podem colonizar as mesmas lesões de antracnose e, portanto, podem explicar por que as linhagens sexuais têm sido isoladas com frequência do campo a partir de lesões de antracnose. Os isolados patogênicos (UFLAG85-1, UFLAG86-1, UFLAG89-1, UFLAG92-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1) revelaram dois padrões de virulência (raça 1 e 65) e apresentaram esporulação semelhante à dos isolados da fase assexual em

vagens de feijoeiro, fato que não ocorreu para os demais isolados conidiais da população sexual.

Como mencionado anteriormente, os testes de patogenicidade para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* foram realizados utilizando-se as cultivares diferenciadoras padronizadas para a determinação de raça de isolados da espécie *C. lindemuthianum*. Além disso, as doze cultivares diferenciadoras não são utilizadas comercialmente e não são bem adaptadas às condições ambientais do Brasil. Visto que o isolamento da fase sexual tem sido constante em coletas realizadas no Brasil, seria coerente que estes isolados sexuais, que possivelmente coevolúram com cultivares desenvolvidas no Brasil, fossem inoculados e testados nestas cultivares, tais como a cultivar Majestoso, da qual originaram-se aproximadamente 60% dos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* utilizados neste estudo. A proposta de utilização de cultivares diferenciadoras bem adaptadas às nossas condições já foi sugerida por Ishikawa, Ramalho e Souza (2011), para a detecção da variabilidade existente nas raça 65. Estes autores comprovaram que existe variabilidade dentro desta raça de *C. lindemuthianum* e que essa variabilidade não pode ser detectada por meio da inoculação no conjunto de diferenciadoras proposta pelo CIAT.

Com relação às características fisiológicas, diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) nas médias do IVCm e do diâmetro colonial entre os isolados dentro cada população foram caracterizadas. Para a população de *C. lindemuthianum*, essa variabilidade já havia sido relatada por Souza, Souza e Mendes-Costa (2007). No entanto, não há relatos, na literatura, de comparação destes caracteres entre isolados assexuais e sexuais.

Analisando-se os resultados apresentados neste estudo, pode-se notar que a diferença entre o IVCm médio das populações assexual (2,92 mm/dia) e sexual (9,67 mm/dia) foi muito discrepante. Essa diferença foi observada mesmo quando os isolados das diferentes populações foram coletados em um mesmo

local e em uma mesma cultivar. Por exemplo, as linhagens UFLAC187 e UFLAG104-1 foram coletadas em Lavras e isoladas da cultivar Majestoso. Entretanto, o isolado da população assexual (UFLAC187) apresentou crescimento médio de 2,03 mm/dia e o isolado de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (UFLAG104-1) exibiu crescimento médio de 10,50 mm/dia, valor cinco vezes maior que o apresentado pelo isolado de *C. lindemuthianum*. Além disso, enquanto na população assexual a avaliação do diâmetro colonial foi realizada após 15 dias do início do experimento, na população sexual, após oito dias de crescimento mais de 80% dos isolados já haviam atingido o diâmetro máximo da placa de Petri. Foi constatado, portanto, que o crescimento micelial dos isolados da população sexual ocorre em uma velocidade superior ao crescimento micelial dos isolados da população assexual (Gráfico 1). Diferenças significativas entre o IVCm e o diâmetro colonial, comparando-se os isolados conidiais e os isolados periteciais da população sexual, não foram detectadas (Tabela 7).

Caracteres fisiológicos podem também auxiliar diretamente na classificação dos isolados que possuem maior facilidade no estabelecimento na superfície do seu hospedeiro. No desenvolvimento inicial dos fitopatógenos no hospedeiro é necessária a formação de hifas germinativas e, posteriormente, as estruturas infectivas (WOOD; JELLIS, 1984). Estas etapas têm papel importante na interação entre os patógenos e as células do hospedeiro, atuando em vários processos, tais como adesão, sinalização celular, manutenção da viabilidade do fungo e mecanismos de reconhecimento (PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001). Neste estudo, altos níveis de diversidade foram detectados na análise da germinação de conídios e ascósporos da população sexual e conídios da população assexual, inclusive entre os dois tempos avaliados (24 horas e 48 horas), para ambas as populações. Na avaliação após 48 horas de incubação, os isolados de *C. lindemuthianum* apresentaram porcentagem de germinação média (66,2%) inferior à porcentagem de germinação média encontrada para os

isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (76,3%). As porcentagens de germinação apresentadas por 75% dos isolados periteciais foi superior a 80%, na avaliação após 48 horas de incubação (Tabela 8). Essa porcentagem de germinação superior para os isolados teleomórficos, em relação aos isolados anamórficos, já havia sido relatada por Barcelos (2010), com um menor número de isolados sendo comparados em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

A análise de caracteres morfológicos é útil para auxiliar na confirmação da variabilidade da espécie, em análises genéticas (identificação de isolados contrastantes) e na diferenciação de espécies do gênero *Colletotrichum* (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). As análises citológicas, neste estudo, envolveram o comprimento e a largura de conídios e ascósporos não germinados e a presença de septo em conídios e ascósporos germinados. A amplitude de variação encontrada para os isolados assexuais nas análises de comprimento (14,46-18,98  $\mu\text{m}$ ) e largura (4,09-6,19  $\mu\text{m}$ ) de conídios está em concordância com outros dados descritos na literatura para a espécie (O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; ROCA et al., 2003). Nas análises da população sexual, dois grupos distintos foram formados, tanto para o comprimento quanto para a largura, separando os isolados conidiais dos isolados periteciais, devido à morfologia distinta destes esporos (Figura 6). Nessa população, os conídios apresentaram comprimento variando de 8,46  $\mu\text{m}$  a 15,85  $\mu\text{m}$  e largura de 2,88  $\mu\text{m}$  a 5,62  $\mu\text{m}$ , demonstrando que, de maneira geral, os conídios da população sexual são menores que os conídios da população assexual. A amplitude de variação para ambos os caracteres, largura e comprimento de ascósporos, também está de acordo com os descritos anteriormente na literatura (CASTRO; MENDES-COSTA; SOUZA, 2006; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007).

Entretanto, essa concordância com a literatura não foi observada quando a presença de septos em esporos germinados foi avaliada. O'Connell, Nash e

Bailey (1992) afirmam que os conídios de *C. lindemuthianum* permanecem não septados, após a germinação. Com base nos resultados deste estudo, pode-se inferir que os conídios e os ascósporos germinados nesta espécie podem apresentar septo em porcentagens variáveis, tanto para a fase assexual como a sexual (Figura 7). Essa contradição pode ser atribuída ao fato de os autores avaliarem apenas dois isolados, não abrangendo toda a variabilidade do caráter analisado. Portanto, os dados deste trabalho suportam a afirmação de que a característica ausência de septos em conídios germinados não pode ser utilizada para a classificação de um isolado como *C. lindemuthianum*, nem para diferenciar os conídios da população assexual e sexual. Nestas avaliações *in vitro* por meio de microscopia de fluorescência, 100% dos ascósporos apresentaram septo após a germinação, não havendo variação para essa característica considerando apenas os isolados periteciais (Gráfico 3).

Alguns dos mecanismos estudados que poderiam auxiliar na geração da variabilidade observada neste estudo são a recombinação sexual (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010), o ciclo parassexual (CASTRO-PRADO et al., 2007) e a recombinação assexual via fusão de CATs (ISHIKAWA et al., 2012; ROCA et al., 1994). Na avaliação da recombinação sexual dos isolados da população assexual, apenas 1,73% das combinações apresentou compatibilidade sexual. No entanto, essas combinações não apresentaram produção de ascos e ascósporos. A produção de protoperitécios entre os isolados compatíveis indica que a informação genética para a ocorrência do ciclo sexual completo não ocorre nestes indivíduos, embora a fase inicial da reprodução tenha sido demonstrada. Outra hipótese que justificaria estes resultados seria a ausência de algum estímulo ambiental, como nutrientes, temperatura ou iluminação, que induziria o ciclo sexual completo no patógeno. Ainda de acordo com Reynolds (1993), muitos fungos perdem a habilidade de se reproduzir sexualmente e não produzem esporos.

Estudos com a fase sexual do gênero *Colletotrichum* indicam que o controle genético da reprodução neste patógeno não corresponde a um sistema de acasalamento simples e, provavelmente, mais de um loco no genoma está envolvido nesse controle (BAILEY; JEGER, 1992; VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000). Analisando-se os isolados da população sexual, constatou-se que a formação da linha de peritécios foi observada para 2,78% das combinações avaliadas. Entretanto, 34,7% destas combinações apresentaram apenas produção de protoperitécios, assim como relatado para os isolados da população assexuado. Para as demais combinações, ainda que ocorra produção de peritécios férteis na linha de contato, não se pode afirmar que esteja ocorrendo cruzamento entre estes isolados. Existe a possibilidade que esses peritécios estejam sendo produzidos por um dos isolados, devido à indução por meio de moléculas produzidas pelo outro isolado usado no pareamento, havendo a ativação de alguma rota metabólica anteriormente bloqueada (WEBER; WEBSTER, 1998). Assim, após a inserção da membrana de diálise entre os isolados, a fim de evitar o contato entre eles, porém, permitindo a passagem de possíveis moléculas indutoras, apenas 28 combinações passaram a não produzir a linha de peritécios férteis (Tabela 9). Esse evento reforça a afirmação de que estes isolados são compatíveis sexualmente, sendo caracterizados como heterotálicos. No entanto, as outras 21 combinações que continuaram a produzir a linha de peritécios férteis, mesmo após a ausência do contato físico entre elas, indicam que estes peritécios são provenientes de indução e não de cruzamento. A linha de peritécios não foi formada no lado do isolado homotálico em nenhuma destas combinações, indicando que o isolado conidial é induzido pelo isolado homotálico a produzir a linha de peritécios (Figura 9).

A variabilidade morfológica dentro da população pertencente à fase sexual do patógeno é evidente. Chilton e Wheeler (1949) propuseram uma classificação que permite o agrupamento dos isolados em quatro classes

distintas. Na população sexual analisada, foram encontrados representantes das quatro classes propostas. No entanto, além desta classificação pela morfologia das colônias, os autores verificaram, para estas classes, determinados padrões de compatibilidade sexual que não foram observados para a população de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Neste estudo, os padrões observados, considerando as 2.701 combinações testadas, foram: i) isolados periteciais não são compatíveis entre si em nenhuma das combinações analisadas, fato que foi evidenciado no trabalho realizado por Chilton e Wheeler (1949); ii) peritécios férteis na linha de contato ocorrem somente entre um isolado peritecial e um isolado conidial; iii) isolados minus e plus formam linha de contato com peritécios férteis com ambos os tipos de colônias conidiais (A e/ou B), não seguindo os padrões descritos por Chilton e Wheeler (1949); iv) a formação da linha de contato entre os isolados não tem relação com a origem dos isolados e v) os isolados que foram obtidos a partir da mesma lesão e de peritécios diferentes foram sempre compatíveis, com exceção dos isolados UFLAG07-1 e UFLAG07-2.

O conhecimento de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) entre diferentes linhagens demonstra que grupos de isolados podem trocar informação genética via heterocariose (BROOKER; VESLIE; DICKMAN, 1991). A formação de heterocários entre essas diferentes linhagens pode servir como primeiro passo para o ciclo parassexual (LESLIE, 1993). A ocorrência de um elevado número de VCGs em *C. lindemuthianum* é descrita na literatura. Barcelos, Souza e Silva (2011), analisando uma população de 47 isolados assexuais, observaram a formação de 45 grupos de compatibilidade vegetativa, tendo 44 isolados sido incompatíveis e em apenas uma combinação foi observada a formação do heterocário, evidenciando a grande variabilidade existente nessa espécie para este caráter.

Neste estudo, os quatro isolados da população sexual analisados formaram três diferentes grupos de compatibilidade vegetativa. Os isolados

UFLAG21-1 e UFLAG46-1 foram compatíveis e, portanto, pertencem a um mesmo VCG, o que indica que estas linhagens possuem os mesmos genótipos para os genes que controlam a compatibilidade vegetativa. Entretanto, os resultados da análise por meio de marcadores RAPD não evidenciaram nenhuma associação com a compatibilidade vegetativa, indicando que o genótipo semelhante para esse caráter não tem reflexo significativo na similaridade genética entre os isolados. Ainda assim, os mutantes Nit provenientes dos isolados UFLAG21-1, UFLAG46-1 e UFLAG112-1 poderão ser muito úteis em análises genéticas, se mantiverem a compatibilidade sexual, exibida neste estudo, por seus parentais selvagens.

Uma via alternativa de recombinação assexual na geração de variabilidade da espécie, a fusão de CATs, foi sugerida por Ishikawa et al. (2012), em cujo estudo foi observado que a fusão de CATs é comum para a maioria dos isolados conidiais assexuais (94,6%) e sexuais (96,2%). Uma vez que os CATs têm papel importante na dinâmica populacional deste fitopatógeno, a alta frequência pode estar influenciando significativamente a variabilidade do patógeno nas populações analisadas (Figura 8).

Trabalho prévio demonstrou que a fusão de CATs em isolados anamórficos ocorre apenas em água e é dependente da idade da cultura (frequência maior em colônias mais velhas) e do isolado utilizado (maior porcentagem de fusão de conídios encontrada pelos autores foi 25,8%) (ISHIKAWA et al., 2010b). Uma das vantagens de se utilizar populações numerosas em estudos de caracterização é a possibilidade de se encontrar fenótipos extremos. Neste estudo, os isolados UFLAC121, UFLAG7-2, UFLAG25-1, UFLAG41-1, UFLAG55-1, UFLAG83-1, UFLAG85-1, UFLAG97-1, UFLAG110-1 e UFLAG111-1 apresentaram porcentagens de formação de CATs superior a 50%, semelhante aos valores encontrados na literatura para *Neurospora crassa* (ROCA et al., 2010). Estes isolados podem

ser utilizados em estudos futuros, visando elucidar a função dos CATs. Por outro lado, nenhuma fusão entre ascósporos foi observada para os isolados homotáticos analisados. Uma hipótese para esta ausência de recombinação assexual pode ser o fato de esses isolados gerarem variabilidade, utilizando-se outro eficiente mecanismo já discutido anteriormente, a recombinação sexual.

Essa variabilidade entre as populações assexual e sexual encontrada neste estudo fomenta discussões a respeito da hipótese de mais de uma espécie estar envolvida nesse sistema. Dados moleculares foram obtidos para tentar esclarecer essa relação. García-Serrano et al. (2008) desenvolveram um par de *primers* específico para *C. lindemuthianum*, que amplifica a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* do patógeno. Assim como era esperado, os 74 isolados da população assexual, que causaram sintomas típicos de antracnose do feijoeiro, amplificaram quando testados com este par de *primers*, confirmando que são realmente da espécie *C. lindemuthianum*. No entanto, os isolados da população sexual, incluindo os seis que causaram sintomas de antracnose, não amplificaram, quando testados com os mesmos *primers*.

Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), após trabalhar com isolados teleomórficos da espécie que também não amplificaram para o par de *primers* descrito por García-Serrano et al. (2008), desenvolveram um segundo par de *primers* que amplificou para a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* dos isolados periteciais analisados pelos autores. Os isolados da população sexual, com exceção dos que causaram sintomas na cultivar suscetível Pérola, amplificaram a banda correspondente, quando testados com os *primers* desenhados por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), corroborando a hipótese de que estes isolados da população sexual não são relacionados com os isolados da população assexual, quando se consideram estas análises da região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*.

Isolados patogênicos da população sexual que não amplificaram quando testados com ambos os pares de *primers* se mostraram flutuantes entre as duas populações, considerando as avaliações de patogenicidade e dos caracteres morfológicos e fisiológicos. Embora estes isolados causem sintomas quando inoculados na cultivar suscetível de feijoeiro e apresentem esporulação semelhante aos isolados da fase assexual, nas avaliações da taxa de crescimento micelial e do tamanho dos conídios, eles foram agrupados juntamente com a população sexual. Além disso, não apresentaram compatibilidade sexual em nenhuma das combinações testadas e apenas a formação de protoperitécios ocorreu em algumas combinações na presença dos isolados UFLAG85-1 e UFLAG86-1. Na árvore filogenética, baseada nas regiões ITS do DNA ribossômico, os isolados patogênicos (UFLAG85-1, UFLAG93-1 e UFLAG99-1) agruparam-se em um bloco único. Os outros isolados da população sexual analisados formaram dois grupos distintos. O grupo formado pelos isolados UFLA G46-1 e UFLAG104-1 se relacionou mais proximamente com o bloco dos isolados patogênicos e o segundo grupo, formado pelos isolados UFLAG112-1 e UFLAG118-1, se relacionou com as sequências retiradas do GenBank para fins comparativos. O isolado de *C. lindemuthianum* não se agrupou com os isolados da população sexual analisados.

Os isolados de *C. lindemuthianum* também foram agrupados separadamente dos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, no dendrograma gerado pelas análises de RAPD. Além do grupo constituído pelos três isolados de *C. lindemuthianum*, outros 15 grupos de similaridade foram formados para os 53 isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* analisados. A análise de RAPD não detectou grande variabilidade para os isolados testados, pois um grupo contendo 32 isolados (60%) foi gerado no dendrograma. Entretanto, deve-se considerar que, nessas análises, somente três *primers* foram utilizados para a geração das

bandas polimórficas, número insuficiente para detectar a variabilidade genética da população. Para tanto, análises de AFLP posteriores são sugeridas.

## 6 CONCLUSÕES

- a) Variação fenotípica ocorre dentro e entre as populações para todos os caracteres avaliados.
- b) Isolados da população sexual não causam sintomas ou causam sintomas mais brandos que os isolados da fase assexual, quando inoculados na cultivar de feijoeiro suscetível Pérola.
- c) O índice de crescimento micelial dos isolados da população sexual é superior ao dos isolados da fase assexual.
- d) A porcentagem de germinação dos isolados sexuais é, em média, superior à porcentagem de germinação dos isolados assexuais.
- e) Conídios dos isolados assexuais são maiores do que os conídios dos isolados sexuais.
- f) Tubos de anastomose ocorrem somente entre conídios nas populações de isolados assexuais e sexuais, em diferentes porcentagens, dependendo do isolado.
- g) Conídios germinados de isolados da fase assexual e sexual formam septo em porcentagens que variam de acordo com o isolado.
- h) Ascósporos de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* necessariamente apresentam septo depois de germinados.
- i) Compatibilidade sexual ocorre somente entre isolados sexuais, sendo sempre um parceiro peritecial e um conidial.
- j) Isolados sexuais não amplificam para o par de *primers* específico para *C. lindemuthianum* que amplificam a região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*.
- k) Isolados sexuais não são filogeneticamente semelhantes ao isolado de *C. lindemuthianum* testado, considerando a região ITS do DNA ribossômico.

- 1) Os isolados das populações analisadas não pertencem à mesma espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. 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: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: UEL, 1993. p. 45.
- AUGUSTIN, E.; COSTA, J. G. C. 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.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismo**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BARCELOS, Q. L. **Análise dos eventos de pré e pós penetração de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro**. 2010. 62 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; SILVA, K. J. D. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 230-242, Jan./Feb. 2011.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of bean in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 1, n. 1, p. 190-195, 1911.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cultura do feijão**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 6 jan. 2011.

BROOKER, N. L.; VESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 672-676, Dec. 1991.

BRYGOO, Y. et al. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 133-148.

BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. 272 f. Thesis (Ph.D. in Genetics of the Plants) - University of Birmingham, Birmingham, 1990.

BURNETT, J. H. **Fundamentals of mycology**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: E. Arnold, 1976. 546 p.

CAMARGO JÚNIOR, O. A. et al. Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 607-615, May/June 2007.

CASTRO, R. A.; MENDES-COSTA, M. C.; SOUZA, E. A. Dimorfismo de ascósporos de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 598-600, nov./dez. 2006.

CASTRO-PRADO, M. A. A. et al. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 634-642, May/June 2007.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Programa de frijol**: informe anual de 1988. Cali, 1990. 129 p. (CIAT. Documento de Trabajo, 72).

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

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

CISAR, C. R.; TEBEEST, D. O. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. **Current Genetics**, Berlin, v. 35, n. 2, p. 127-133, Apr. 1999.

CODDINGTON, A. Biochemical studies on the Nit mutants of *Neurospora crassa*. **Molecular Genetics and Genomics**, San Diego, v. 145, n. 2, p. 195-206, 1976.

CORREL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, Dec. 1987.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, out./dez. 2003.

DAVIDE, L. M. C.; SOUZA, E. A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2009.

DEREEPER, A. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. W465-W469, 2008.

EDGERTON, C. W. Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 1, n. 5, p. 244-254, 1914.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 8 dez. 2010.

GARCÍA-SERRANO, M. et al. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 312-317, Sept. 2008.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 165-186, 2000.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Genetic control on the performance of common bean differential cultivars to *Colletotrichum lindemuthianum* races. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 4, p. 579-586, 2007.

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

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Confronto das Safras de 2010 e 2011, Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>>. Acesso em: 6 jan. 2011.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 31175, Feb. 2012.

\_\_\_\_\_. Levantamento de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* de regiões produtoras de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: UFG, 2005. p. 501-504.

\_\_\_\_\_. Livecell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2-9, Jan. 2010a.

\_\_\_\_\_. Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 270-257, Aug. 2010b.

ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 461-464, Feb. 2011.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista de Biologia**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 156-161, mar./abr. 2008.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas de seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 31, n. 177, p. 322-331, 1984.

KAUFMAN, B.; RICHARDS, S.; DIERIG, D. A. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 111-114, Apr. 1999.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 690 p.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. Et v. Scherenk. *f.sp. Phaseoli* n.f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 27, p. 411-437, 1970.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, n. 1, p. 131-152, 1992.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, n. 1, p. 2336-2342, 1993.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. Vegetative Compatibility Groups (VCGs). In: \_\_\_\_\_. **The Fusarium laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006. p. 31-43.

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**, Cambridge, v. 110, n. 3, p. 253-263, June 2004.

MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata f.sp. Phaseoli* I. sexual compatibility. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 350-355, jul./set. 1996.

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

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

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. **MSTAT-C**: a software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. East Lansing, 1991. 400 p.

O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). ***Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 57-77.

O'CONNELL, R. J.; NASH, C.; BAILEY, J. A. Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 67-87.

OLIVEIRA, E. A.; ANTUNES, I. F.; COSTA, J. G. C. **Variação em patogenicidade do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) no Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sorocaba: IPEAS, 1973. 5 p.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

O'SULLIVAN, D. et al. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 33, n. 4, p. 291-298, Aug. 1998.

PASTOR-CORRALES, M. A. et al. Inheritance of anthracnose in common bean accession G2333. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 10, p. 959-962, Oct. 1994.

PEREIRA, R. et al. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 224-225, 2010.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R.; O'CONNELL, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 8, p. 813-819, Aug. 2001.

PINTO, J. M. A. et al. Pathogenicity and virulence structure of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 228-229, 2010.

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 8, p. 838-842, Aug. 2010.

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

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

RAVA, C. A. et al. Determinacion de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* em Nicarágua. **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, 1994.

REYNOLDS, D. R. The fungal holomorph: an overview. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Ed.). **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 15-25.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, Nov. 2004.

\_\_\_\_\_. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 138-145, June 2003.

ROCA, M. G. et al. Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 9, n. 8, p. 1171-1183, Aug. 2010.

RODRIGUEZ-GUERRA, R. et al. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 4, p. 793-803, Aug. 2005.

\_\_\_\_\_. Variation in genotype, pathotype and anatomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 228-235, Feb. 2003.

ROHLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter, 2000. Software.

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 457-477.

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

SAUPE, S. J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, June 2000.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis. Version 2.0. Geneva: University of Geneva, 2000. Software.

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

SCHWARTZ, H. F. Antracnose. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean disease**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1994. p. 16-17.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 4, p. 241-247, Apr. 2007.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 2007.

SOUZA, E. A.; CAMARGO JÚNIOR, O. A.; PINTO, J. M. A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, May/June 2010.

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, 1992. p. 1-26.

TALAMINI, V. et al. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 3, p. 371-375, 2004.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella (Colloetotrichum)* isolates from maize and from sorghum. **Experimental Mycology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 219-229, 1992.

\_\_\_\_\_. Method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* from maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 5, p. 530-534, 1991.

\_\_\_\_\_. Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola (Colletotrichum graminicola)*. **Experimental Mycology**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 311-319, 1994.

VAILLANCOURT, L. J.; WANG, J.; HANAU, R. Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola*. In: PRUSKY, D.; REEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 29-44.

WEBER, R. W. S.; WEBSTER, J. Stimulation of growth and reproduction of *Sphaeronaemella fimicola* by other coprophilous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 9, p. 1055-1061, Sept. 1998.

WHEELER, H. E. Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, p. 342-345, 1954.

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

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

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

WOOD, R. K. S.; JELLIS, G. J. **Plant diseases: infection, damage and loss**. Oxford: Blackwell Scientific, 1984. 327 p.

WORDELL FILHO, J. A. Manejo ecológico de doenças de plantas em Santa Catarina. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, 2004. p. 31-46.

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