



**MARIANA JUNQUEIRA DE ABREU**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO  
AGENTE CAUSAL DO MOFO BRANCO DO  
FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**MARIANA JUNQUEIRA DE ABREU**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO AGENTE CAUSAL DO MOFO  
BRANCO DO FEIJOEIRO**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora

Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS – MG**

**2011**

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

Abreu, Mariana Junqueira de.

Caracterização de isolados do agente casual do mofo branco do feijoeiro / Mariana Junqueira de Abreu. – Lavras: UFLA, 2011.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Germinação carpogênica. 3. Microsatélite. 4. Grupo de compatibilidade micelial. 5. Caracterização morfológica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.65294

**MARIANA JUNQUEIRA DE ABREU**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO AGENTE CAUSAL DO MOFO  
BRANCO DO FEIJOEIRO**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 27 de julho de 2011.

Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

Dr. Hudson Teixeira

EPAMIG

Dra. Elaine Aparecida de Souza

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2011**

*Aos meus pais, Adriana e Carlos, pelo amor, por me apoiarem sempre, qualquer que tenha sido a situação e por não pouparem esforços para que todos os meus sonhos se realizassem. Aos meus bebês, Polyana e Fernanda, por acreditarem que eu seria capaz e por tornarem minha vida mais feliz. Ao meu namorado, André, pelo amor, companheirismo, apoio e compreensão por minhas ausências.*

**DEDICO**

*À tia Aniela e ao padrinho Alex, pelo incentivo, apoio, carinho e por cuidarem  
de mim como uma filha.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por guiar meus passos sempre para o melhor caminho.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

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

À professora Elaine Aparecida de Souza, pela oportunidade, orientação, amizade, ensinamentos transmitidos e confiança em meu trabalho, desde o início.

Aos membros da banca examinadora, professor João Bosco dos Santos e Dr. Hudson Teixeira, pelas contribuições a este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos, apoio e amizade. Em especial ao professor João Bosco dos Santos, por ter aberto as portas para que eu pudesse chegar até aqui e por toda a contribuição para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pela convivência e carinho demonstrado sempre, em especial a Heloísa, D. Iron e Du.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Quél, Rafael, Suellen, Larissa, Jerônimo, Tânia, Lucas, Joyce, Fran, Samira e Thayssa, por toda amizade, ajuda, conselhos, ótima convivência e momentos de descontração inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos e ao Igor, por toda a ajuda para que este trabalho fosse concluído.

Aos colegas do GEN, pela excelente convivência e por, direta ou indiretamente, terem contribuído para a realização deste trabalho, em especial a Fernando Guedes e a Carlão.

A minha turma de mestrado de coração, Lud, Cleitinho, Geovana, Davi, Marcela, Carol, Renato, Rafael e Fabíola, por terem me acolhido tão bem e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos.

A Quélen, por todo apoio, confiança e por ter se tornado uma amiga mais do que especial. Sua amizade, conselhos e inúmeras ajudas foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Às belezinhas da minha vida, Lud, Jeanne (Mamis) e Thatá, pela amizade mais do que sincera. As conversas, estudos, confidências, risos, lágrimas, brincadeiras nos tornaram realmente uma família. Amo vocês!!!

A Kátia e Cleitinho, pela amizade sincera e pelo apoio de sempre.

Às irmãzinhas de república, Angel, Iara, Susan e Kedma, pelos momentos incríveis que vivemos juntas e pela amizade que a cada dia cresce mais.

Aos meus amigos da Bio, em especial Angel, Fabiane, Kamila, Carlinha e Amanda, pelo carinho e apoio de sempre.

À turma de Paraguaçu, pelo incentivo, carinho e por compreenderem minhas ausências.

Ao meu namorado, André, por todo amor e incentivo, sem os quais seria difícil chegar até aqui.

Aos meus pais, Adriana e Carlos, pelo amor, apoio e por não pouparem esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos.

Às minhas irmãs, Polyana e Fernanda, por serem meus bebês e por sempre acreditarem em mim.

A todos da minha família, por fazerem dos meus sonhos e das minhas conquistas seus sonhos e suas conquistas.

**MUITO OBRIGADA!!!**



*“Tudo pode ser, se quiser será  
O sonho sempre vem pra quem sonhar  
Tudo pode ser, só basta acreditar  
Tudo que tiver que ser, será...”*

(Michael Sullivan)

## RESUMO

Mofobranco é a doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e interfere na produção do feijão no Brasil. A falta de conhecimento da estrutura populacional do patógeno é uma das causas da dificuldade do controle dessa doença. Além disso, para que se possa obter a fase sexual do fungo, as condições devem ser bem estabelecidas, uma vez que há grande influência ambiental nesse processo. Dessa forma, este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar isolados de *S. sclerotiorum* obtidos em campos experimentais e de produção no estado de Minas Gerais, podendo contribuir com os programas de melhoramento do feijoeiro que visam à resistência ao mofobranco na região. Foram avaliados 50 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em vários locais de Minas Gerais. Cinco metodologias para a obtenção da germinação carpogênica foram avaliadas: Mylchreest e Wheeler (1987), Sun e Yang (2000), Brandão et al. (2008), Método 1 de Paula Júnior (2010) e Método 2 de Paula Júnior (2010). Com a melhor metodologia estabelecida, os isolados foram avaliados quanto à capacidade e ao tempo para a formação de apotécios. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), a coloração da colônia, o tempo necessário para a formação do primeiro escleródio, o número de escleródios por placa, o tamanho médio e a morfologia dos escleródios e a compatibilidade micelial foram utilizados na caracterização dos isolados. A análise molecular dos isolados foi realizada por meio de marcadores microssatélites. A reação de resistência de 15 linhagens de feijão a 5 dos 50 isolados foi avaliada. As metodologias que se mostraram mais eficientes para a obtenção de apotécios dos isolados avaliados foram a metodologia modificada de Sun e Yang (2000) e o método 2, proposto por Paula Júnior (2010, comunicação pessoal) em que os escleródios foram dispostos em areia. A maioria dos isolados tem a capacidade de formar apotécios. Entretanto, poucos isolados apresentaram compatibilidade micelial. A população avaliada mostrou ampla variabilidade genética para as características morfológicas, fisiológicas e moleculares avaliadas. O tamanho médio dos escleródios e a forma dos mesmos apresentaram correlação de 0,617. Já os tempos necessários para a formação do primeiro escleródio e o número médio de escleródios por placa apresentaram correlação de -0,455. A reação de resistência da maioria das linhagens de feijoeiro foi semelhante, no entanto, as linhagens União, Ouro Negro, CNFRJ10564 e Pérola destacaram-se por apresentarem notas mais baixas quanto à severidade do mofobranco causado pelos cinco isolados avaliados. Níveis diferentes de agressividade foram observados entre os isolados avaliados, tendo os isolados UFLA26 e UFLA59 sido os mais agressivos e que melhor discriminaram as linhagens de feijão quanto à resistência ao mofobranco.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Germinação carpogênica. Microssatélite. Grupo de compatibilidade micelial. Caracterização morfológica.

## ABSTRACT

White mold is a common bean disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* resulting in economic losses in Brazil and worldwide. The lack of knowledge about the pathogen population structure makes the disease control difficult. This pathogen is able to develop the sexual phase, however the laboratorial conditions should be well established, since the process is strongly influenced by the environment. The aim of this study was to characterize strains of *S. sclerotiorum* obtained from experimental and production common bean fields in Brazil, providing information to common bean breeding programs that source for resistance to white mold. We analyzed 50 strains of *S. sclerotiorum* collected at several locations in Minas Gerais state. Five methods to obtain the carpogenic germination were evaluated: Mylchreest and Wheeler (1987), Sun and Yang (2000), Brandão et al. (2008), Method 1 Paula Junior (2010), Method 2 Paula Junior (2010). The best methodology was established and the strains were characterized to their ability and time to develop apothecia. Morphological and physiological analysis as mycelial growth index (MGI), colony color, the time required to form the first sclerotia on media, the sclerotia number per plate, the sclerotia average size, and the sclerotia shape were performed. Mycelial compatibility, molecular analysis using microsatellite primers and pathogenicity tests were also conducted. The reaction of 15 bean cultivars to five of the 50 strains was assessed. The best methods to obtain apothecia were: Sun and Yang (2000) modified and the second method proposed by Paula Junior (2010, personal communication) in which the sclerotia were placed on sand. Most of the strains have the ability to form apothecia. A small group of strains showed mycelial compatibility. The population studied in this work showed wide variability based on morphological, physiological and molecular traits analyzed. The average size and shape of sclerotia presented a correlation of 0,617. Already the times required to form sclerotias and the sclerotia number per plate showed correlation of -0,455. The reaction of most cultivars to the five strains inoculated was similar, however, the União, Ouro Negro, Pérola and CNFRJ10564 cultivars had lower scores of severity to white mold disease. Different levels of aggressiveness were observed among isolates, that being isolates UFLA26 and UFLA59 were the most aggressive and what better discriminate the strains of beans for resistance to white mold.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Carpogenic germination. Microsatellite. Mycelial compatibility group. Morphology characterization.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	O mofo-branco .....	14
2.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	15
2.3	Escleródios.....	15
2.4	Apotécio e ascósporos.....	20
2.5	Controle do mofo-branco e resistência de plantas a <i>S. sclerotiorum</i> .....	21
2.6	Dinâmica populacional de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1	Coleta e armazenamento dos escleródios.....	28
3.2	Obtenção da germinação carpogênica .....	28
3.2.1	Método modificado de Mylchreest e Wheeler (1987) .....	32
3.2.2	Método modificado de Sun e Yang (2000) .....	32
3.2.3	Método de Brandão et al. (2008).....	33
3.2.4	Método 1 de Paula Júnior (2010, Comunicação pessoal) .....	33
3.2.5	Método 2 de Paula Júnior (2010, Comunicação pessoal) .....	33
3.3	Caracterização dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> .....	34
3.3.1	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) .....	34
3.3.2	Caracterização morfológica .....	35
3.3.3	Grupos de compatibilidade micelial (GCM).....	35
3.3.4	Extração de DNA.....	36
3.3.5	Análise molecular por meio de microssatélites .....	37
3.4	Reação de linhagens de feijão a isolados de <i>S. sclerotiorum</i> .....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1	Resultados.....	41
4.1.1	Obtenção da germinação carpogênica .....	41
4.1.2	Caracterização dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> .....	42
4.1.2.1	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) .....	42
4.1.2.2	Caracterização morfológica .....	44
4.1.2.3	Grupos de compatibilidade micelial .....	49
4.1.2.4	Análise molecular por meio de microssatélites .....	51
4.1.3	Reação de linhagens de feijão a isolados de <i>S. sclerotiorum</i> .....	52
4.2	Discussão .....	54
5	CONCLUSÕES .....	63
	REFERÊNCIAS .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), 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. O mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, interfere na produção desta cultura no Brasil, especialmente na região de cerrado (FERRAZ et al., 1999) e no plantio de inverno em áreas irrigadas.

Extensivos danos às culturas, ausência de altos níveis de resistência nos hospedeiros e a grande dificuldade de controle das doenças causadas por *S. sclerotiorum* têm impulsionado pesquisas a respeito desse fungo (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Os problemas associados à avaliação e à seleção para resistência ao mofo-branco podem ser devido, em parte, à falta de conhecimento da estrutura populacional do patógeno e da variabilidade da agressividade dos isolados (KULL et al., 2004). Informações relativas à biologia de populações de *S. sclerotiorum* são ainda emergentes e a maioria provém da América do Norte e da Austrália (MERT-TÜRK et al., 2007).

Nesses estudos de populações, alguns marcadores são utilizados a fim de revelar a variabilidade existente. Dentre eles, destacam-se os grupos de compatibilidade micelial (GCM), as impressões digitais de DNA, o microssatélite e AFLP (KOHN et al., 2008), além de características da morfologia da colônia, taxa de crescimento micelial e características dos escleródios formados. Estudos de variabilidade dentro da população em uma determinada região geográfica são importantes, uma vez que podem revelar as mudanças que ocorrem nesta população (AKRAM et al., 2008).

Na ausência de um hospedeiro suscetível, estruturas de resistência, os escleródios, são produzidas pelo fungo. Eles permanecem viáveis por mais de

oito anos (ADAMS; AYERS, 1979) e podem germinar de duas maneiras. Os que germinam de forma miceliogênica produzem hifas que podem atacar diretamente os tecidos das plantas (BARDIN; HUANG, 2001; LE TOURNEAU, 1979). Já na germinação carpogênica, há a produção de apotécios e, posteriormente, de ascósporos que infectam as plantas e ela é altamente afetada pela temperatura e umidade do solo, que influenciam o número de estipes e de apotécios produzidos (HAO; SUBBARAO; DUNIWAY, 2003).

Diante do exposto, torna-se necessária a realização de estudos para a caracterização de isolados de *S. sclerotiorum* obtidos em campos experimentais e de produção no Brasil. Estas informações poderão auxiliar nos programas de melhoramento vegetal visando à resistência ao mofo-branco na região. Além disso, as condições para a obtenção da germinação carpogênica devem ser bem estabelecidas, uma vez que é muito influenciada pelas condições ambientais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O mofo-branco

O mofo-branco é uma doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, um fitopatógeno de ampla distribuição geográfica e que infecta vários hospedeiros, incluindo importantes culturas agrícolas e várias ervas daninhas (KULL et al., 2004). Este fungo representa uma ameaça para culturas dicotiledôneas, como girassol, soja e feijão, entre outras, mas também para espécies monocotiledôneas, como a cebola (BOLLAND; HALL, 1994). Contribui para a ocorrência de perdas em colheitas em vários países (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009). No Brasil, por exemplo, cerca de 15% da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem produção limitada pela ação desse patógeno (FERRAZ et al., 1999).

De acordo com Nasser e Sutton (1995), as perdas mais significativas da produção de feijão, desde a década de 1980, no Brasil, têm sido causadas por *S. sclerotiorum*, especialmente na região do Cerrado, onde o feijão irrigado tem sido cada vez mais cultivado.

As plantas infectadas, normalmente, possuem lesões encharcadas nas folhas que se expandem rapidamente para o pecíolo e caule. Geralmente, os caules primeiramente desenvolvem lesões escuras, que normalmente se desenvolvem em tecidos necróticos e, posteriormente, manchas de micélio branco com aspecto cotonoso aparecem, sendo este o sinal mais evidente de que as plantas estão doentes. Em caso de lesões em início de desenvolvimento, as plantas podem não parecer infectadas pela doença. No entanto, a doença progride nos caules principais, fazendo com que, normalmente, as plantas murchem. Com o avanço da doença, os tecidos infectados tornam-se esbranquiçados e são frequentemente degradados deixando apenas os tecidos

vasculares. A partir do momento que a doença se instala no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para as plantas adjacentes por meio do contato planta a planta (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). As sementes atacadas perdem o brilho, tornando-se opacas e seu peso é reduzido. O período crítico da doença vai do florescimento até a formação e o enchimento das vagens (MICHEREFF, 2010).

## **2.2 *Sclerotinia sclerotiorum***

*S. sclerotiorum* é um fungo conhecido primariamente como patógeno de culturas vegetais, oleaginosas e ornamentais (PRATT; ROWE, 1995). Pertence à subdivisão Ascomycotina, classe Discomycetes, família Sclerotiniaceae, ordem Helotiales e filo Ascomycota.

É um patógeno necrotrófico homotálico. Por possuir uma grande variedade de hospedeiros, não há um único sintoma que seja comum a todas as plantas infectadas por esse fungo (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

## **2.3 Escleródios**

Na ausência de um hospedeiro suscetível, o fungo pode persistir por um longo período no solo, por meio de estruturas de resistência, de coloração escura, conhecidas como escleródios. A princípio, apresentam cor branca e, posteriormente, tornam-se negros e enrijecidos, sendo altamente resistentes a substâncias químicas, calor seco até 600°C e congelamento. Os escleródios formam-se, normalmente, no interior dos tecidos infectados, mas podem formar-se sobre a superfície dos tecidos em condições de alta umidade; formam-se também sobre ou dentro das flores ou das sementes, por isso são frequentemente encontrados em amostras de colheita (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).



O escleródio é um agregado de hifas com uma crosta escura exterior que contém várias células espessas e melanina, composto que se acredita ter papel importante na proteção contra condições adversas e contra a degradação microbiana (BELL; WHEELER, 1986; HENSON, BUTLER; DAY, 1999). A porção interna, a medula, é incorporada em uma matriz fibrilar e composta por carboidratos e proteínas (LE TOURNEAU, 1979).

Os escleródios de *S. sclerotiorum* variam muito de tamanho, dependendo do hospedeiro (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006) e desempenham papel importante no ciclo da doença, uma vez que produzem inóculo e são as principais estruturas de sobrevivência (WILLETTS; WONG, 1980), permanecendo viáveis por mais de oito anos no solo (ADAMS; AYERS, 1979). Em geral, são produzidos depois que o crescimento micelial se depara com um ambiente com limitações de nutrientes (CHRITIAS; LOCKWOOD, 1973).

Três fases do desenvolvimento dos escleródios foram caracterizadas (TOWNSED; WILLETTS, 1954). São elas: (i) início (agregação de hifas, formando uma massa branca), (ii) desenvolvimento (crescimento e maior agregação das hifas, para que haja aumento de tamanho) e (iii) maturação (delimitação da superfície, deposição de melanina nas células da crosta e consolidação interna).

Uma característica comum no desenvolvimento dos escleródios é a exsudação de gotas de líquido, mas pouco se sabe sobre a natureza desse exsudado. Um estudo em nível de proteoma foi realizado com o exsudado dos escleródios e 56 proteínas foram identificadas e classificadas em várias categorias funcionais, incluindo metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, lipídeos e metabolismo secundário, além de algumas com funções desconhecidas. Há uma discussão sobre o papel dessas proteínas no

desenvolvimento dos escleródios, bem como na patogenicidade do fungo (LIANG; STRELKOV; KAV, 2010).

Uma série de fatores afeta a sobrevivência e a germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum*, tais como umidade e temperatura, sua posição e longevidade no solo, sua forma, presença de gases ou elementos químicos no solo, atividades de microrganismos e nutrição, entre outros. A redução do potencial de água no solo aumenta a sobrevivência dos escleródios e estes sobrevivem por pouco tempo em solos saturados, porém, a umidade do solo elevada tende a promover a sua germinação. Temperaturas acima de 30°C reduzem sua sobrevivência. Eles podem germinar bem entre 6° e 30°C, embora a temperatura ótima seja 10°C. A proporção de escleródios que germina eleva-se de acordo com o aumento de seus tamanhos (HAO; SUBBARAO; DUNIWAY, 2003).

Em meio de cultura, o nível do pH tem influência significativa no desenvolvimento dos escleródios e, em substrato com pH alcalino ou neutro, sua formação é inibida (ROLLINS; DICKMAN, 2001). Além disso, mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de produzir ácido oxálico não produzem escleródios *in vitro* e não são patogênicos às plantas (DICKMAN; MITRA, 1992; GODOY et al., 1990). O envolvimento do ácido oxálico na patogenicidade de alguns fungos necrotróficos é bem conhecido, no entanto, apesar de sua estrutura química simples, desempenha papéis diversos e complexos no processo de infecção (DUTTON; EVANS, 1996).

Rollins e Dickman (1998) constataram que adenosina monofosfato cíclico (cAMP) desempenha um papel no início da transição entre o crescimento micelial e o desenvolvimento de escleródios. Um aumento de cAMP, tanto endógeno quanto exógeno, inibe o desenvolvimento de escleródios (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O grande potencial reprodutivo, juntamente com a capacidade de sobrevivência em longo prazo, torna os escleródios os componentes centrais na epidemiologia das doenças causadas por *S. sclerotiorum*. Como já foi mencionado, eles podem germinar de forma carpogênica ou miceliogênica (Figura 1), dependendo das condições ambientais, resultando em duas categorias distintas de doenças.

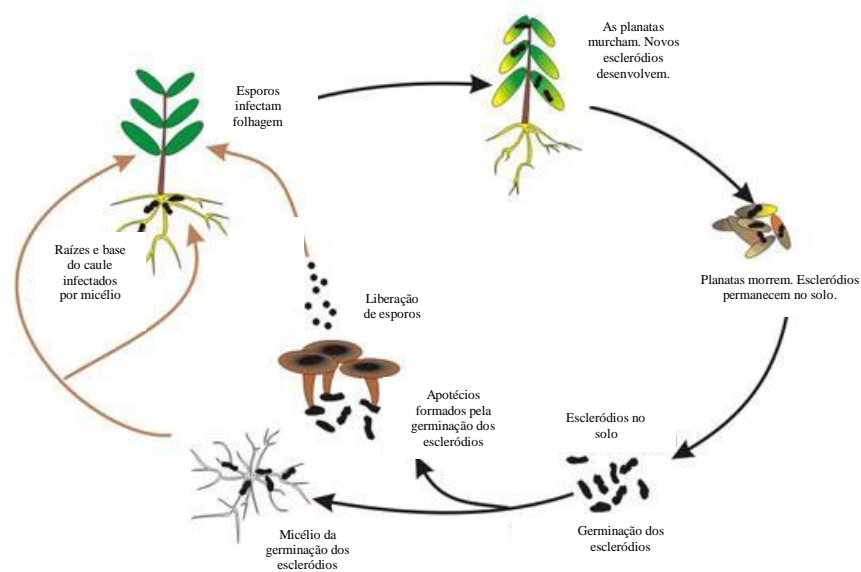


Figura 1 Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* mostrando as duas formas de germinação dos escleródios (COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DA HORTICULTURA, 2011)

As doenças iniciadas pela germinação miceliogênica dos escleródios ocorrem em poucas culturas, como nos girassóis e em algumas leguminosas, nas quais o micélio pode infectar diretamente tecidos da raiz (LE TOURNEAU, 1979). Entretanto, doenças podem ser resultantes da colonização da matéria orgânica morta no solo e da subsequente infecção das plantas vivas adjacentes

(RIMMER; MENZIES, 1983). A infecção de tecido saudável se dá por meio da penetração do micélio na cutícula da planta hospedeira utilizando enzimas ou mecanismos de força via apressórios, a menos que ocorra penetração através dos estômatos (LUMSDEN; DOW, 1973; LUMSDEN, 1979). Os apressórios podem apresentar uma estrutura simples ou complexa. Desenvolvem-se a partir da ramificação dicotômica terminal das hifas e consistem de um bloco de hifas multisseptadas e curtas que são orientadas perpendicularmente à superfície do hospedeiro e à qual são ligadas por mucilagem. A digestão enzimática da cutícula também desempenha papel importante no processo de penetração (TARIQ; JEFFRIES, 1984). Pouco se sabe sobre as cutinases de *S. sclerotiorum*, no entanto, o genoma codifica pelo menos quatro dessas enzimas (HEGEDUS; RIMMER, 2005).

Conídios assexuais não são produzidos, entretanto, microconídios são produzidos nas hifas ou no himênio do apotécio (KOHN, 1979a). Esses microconídios não germinam e sua função na biologia do fungo é desconhecida (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Já os escleródios que germinam de forma carpogênica produzem apotécios e, subsequentemente, ascósporos que infectam partes senescentes das plantas hospedeiras que se encontram sobre o solo. O número de apotécios produzidos é fortemente relacionado com o tamanho dos escleródios (HAO; SUBBARAO; DUNIWAY, 2003). As hifas resultantes desse tipo de germinação são hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas, com o micélio surgindo branco e escurecendo em meio de cultura e na planta (KOHN, 1979a).

A temperatura sob a qual os escleródios são produzidos afeta a germinação carpogênica (HUANG; KOZUB, 1993). Huang e Kozub (1991) notaram que isolados originados de regiões com temperaturas por volta de 10°C germinam mais rapidamente do que aqueles produzidos em temperaturas mais elevadas (25-30°C), indicando que a origem geográfica dos isolados também

influencia esse processo. A umidade do solo é um fator crítico na produção de apotécios e é uma das principais razões para que as doenças iniciadas por ascósporos sejam associadas a eventos de irrigação e períodos de muita chuva (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

#### **2.4 Apotécio e ascósporos**

O apotécio consiste em um estipe originado de um escleródio e um receptáculo que tem uma superfície com uma camada himenial côncava (2-10 mm de diâmetro), de cor ocre a tangerina. Um ou mais apotécios podem surgir de um escleródio. A camada himenial possui filas de ascos, os quais são cilíndricos e contêm oito ascósporos hialinos, elipsoides e binucleados (4-6 x 9-14  $\mu\text{m}$ ) (KOHN, 1979b). O número de apotécios é afetado significativamente pela disponibilidade de matéria orgânica. Solos ricos em matéria orgânica geralmente favorecem a germinação carpogênica dos escleródios (FERRAZ et al., 1999). *S. sclerotiorum* libera frequentemente ascósporos de uma grande quantidade de ascos simultaneamente. Este fenômeno é ativado por mudanças na umidade relativa ou mudanças físicas do apotécio (HARTILL; UNDERHILL, 1976).

A maioria dos ascósporos é depositada no solo onde é produzida (WEGULO et al., 2000), embora alguns possam ser carregados por meio de correntes de ar (LI; YONGLI; NIAN, 1994). Eles são cobertos por uma mucilagem pegajosa, a qual ajuda na sua adesão ao substrato e podem sobreviver no tecido da planta por volta de duas semanas, dependendo das condições ambientais; alta umidade relativa e luz ultravioleta são prejudiciais à sua sobrevivência (CLARKSON et al., 2003).

Os ascósporos podem germinar na superfície de um tecido saudável, mas não podem infectar a planta sem uma fonte exógena de nutrientes e uma

lâmina de água. Tecidos senescentes, necrosados ou flores geralmente servem como fonte de nutrientes para iniciar sua germinação, dando início à infecção micelial da planta hospedeira (ABAWI; GROGAN, 1979; LUMSDEN, 1979; MCLEAN, 1958). Depois da colonização dos tecidos senescentes, o fungo invade tecidos verdes vivos em contato com as flores e se espalha para outras partes da planta (HARIKRISHMAN; DEL RIO, 2006). A maioria das doenças causadas por *S. sclerotiorum* inicia-se a partir dos ascósporos (ABAWI; GROGAN, 1979; SCHUARTZ; STEADMAN, 1978; STEADMAN, 1979), sendo estes os principais propágulos infectivos desse patógeno (HARIKRISHMAN; DEL RIO, 2006).

Há um aumento linear na incidência de mofo-branco com um aumento na concentração de ascósporos. Em estudos sobre o tipo de inóculo, tanto a temperatura quanto a umidade relativa afetaram significativamente a incidência da doença. Entretanto, a quantidade de incidência de mofo-branco parece depender mais da umidade relativa pós-inoculação (HARIKRISHNAN; DEL RIO, 2006).

Ferraz et al. (1999) observaram, em experimento conduzido no outono, maturação precoce das plantas como resultado da alta intensidade da doença. A incidência foi menor no inverno do que no outono, provavelmente por causa das condições climáticas mais úmidas nesta estação. Já o total acumulado de apotécios formados no inverno foi cerca de quatro vezes maior do que no outono.

## **2.5 Controle do mofo-branco e resistência de plantas a *S. sclerotiorum***

A busca de resistência do hospedeiro a *S. sclerotiorum* tem sido um objetivo importante dos programas de melhoramento genético (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009). A natureza esporádica dos surtos da doença,

especificamente as iniciadas por ascósporos que são altamente dependentes das condições ambientais, faz com que a procura por resistência sob condições de campo seja frequentemente problemática sem o uso de irrigação e inoculação artificial. Além disso, não se sabe se parte da resistência no campo é resultado de resistência fisiológica ou mecanismos de escape, como época de floração, arquitetura, entre outros, que têm sido associados à severidade da doença (BOLAND; HALL, 1987; KIM; DIERS, 2000; NELSON; HELMS; OLSON, 1991). Portanto, a inoculação artificial de plantas em casa de vegetação e no campo deve ser parte integrante da metodologia de avaliação da resistência a este patógeno (DICKSON; PETZOLDT, 1996; KIM et al., 2000; MIKLAS et al., 1999; WHIPPS et al., 2002; ZHAO et al., 2004). Em estudos com alfafa, Pratt e Rowe (1995) concluíram que interações cultivares x isolados não foram significativas para *S. sclerotiorum*.

Devido à ausência de níveis adequados de resistência do hospedeiro, os fungicidas têm sido um método de controle importante das doenças causadas por *Sclerotinia* (BARDIN; HUANG, 2001; STEADMAN, 1979), mas o desenvolvimento de resistência do patógeno às substâncias é sempre uma ameaça, o que torna a eficiência do fungicida reduzida (GOSSEN; RIMMER; HOLLEY, 2001). Além disso, há o impacto ecológico negativo, devido à presença de resíduos tóxicos, e o custo é elevado (ROCHA; OLIVEIRA, 1998). A queima da palhada após a colheita das sementes é uma medida de controle eficaz porque os escleródios presentes nos resíduos são destruídos (PRATT; ROWE, 1995).

Outra prática de destaque no controle de doenças de plantas causadas por fungos é o uso de controle biológico. O controle biológico de doenças causadas por *S. sclerotiorum* é buscado como uma estratégia alternativa (LOBO JÚNIOR; ABREU, 2000). Sob condições de campo, os escleródios são atacados e degradados por alguns micoparasitas (AYERS; ADAMS, 1981). Várias

espécies de *Trichoderma* têm sido relatadas como potenciais agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos do solo, incluindo *S. sclerotiorum* (LOBO JÚNIOR; ABREU, 2000).

Como a secreção de ácido oxálico tem sido associada à patogenicidade do fungo, enzimas capazes de degradá-lo têm sido utilizadas para a produção de plantas transgênicas resistentes. Linhagens de soja transgênicas contendo o gene da descarboxilase isolado de *Flammulina* sp. foram produzidas pelo processo de biobalística. A análise molecular revelou que a incorporação do gene no genoma da planta foi bem sucedida e que ele foi transferido para as plantas da progênie. A curva do progresso da doença apresentou um atraso significativo no desenvolvimento dos sintomas, em comparação com o genótipo não transgênico (CUNHA et al., 2010).

Contudo, o uso de cultivares geneticamente resistentes é o melhor método para diminuir os riscos de epidemias (CASTAÑO; VEAR; LABROUHE, 2001). Essa resistência é conhecida como resistência fisiológica e tem natureza poligênica (MIKLAS et al., 2001). Estudos da resistência do feijão ao mofo-branco ainda são escassos na literatura e os resultados têm sido controversos. Segundo Antônio et al. (2008), o controle genético da resistência ao mofo-branco é caracterizado por dominância parcial, com predominância de efeitos aditivos, e pelo menos um gene de resistência está envolvido, embora o caráter seja altamente influenciado pelo ambiente. Entretanto, já foram identificados mais de 30 locos de caracteres quantitativos (QTLs) que condicionam resistência parcial ao mofo-branco (SOULE et al., 2011).

A seleção assistida por marcadores pode auxiliar na investigação para encontrar e incorporar a resistência fisiológica em cultivares. Marcadores estreitamente ligados a alelos de resistência e QTLs permitem analisar com base no genótipo tão bem como no fenótipo, maximizando a eficácia da seleção (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). QTLs para resistência a *S.*



*sclerotiorum* têm sido relatados em importantes culturas, como girassol e feijão (ARAHANA et al., 2001; BERT et al., 2004; KOLKMAN; KELLY, 2003; MIKLAS; DELORME; RILEY, 2003; ZHAO; MENG, 2003).

De acordo com Carneiro e Santos (2010), marcadores microssatélite (SSR) foram eficientes na identificação de indivíduos com maior proporção de recuperação do genoma recorrente (resistente) nas gerações iniciais de retrocruzamento, havendo ganho de até dois ciclos, comparando-se com o esperado no retrocruzamento convencional. Dessa forma, é possível selecionar plantas com grande proporção de alelos do genitor recorrente e portadoras do QTL de resistência ao mofo branco.

As conclusões que se obtêm em pesquisas sobre o tipo de ação dos genes são dependentes dos materiais genéticos estudados. Sendo assim, é temeroso, a partir de estudos realizados em certos cruzamentos, inferir a respeito do controle genético de um dado caráter para a espécie como um todo, principalmente quando o controle genético é complexo, envolvendo muitos locos ou, então, quando a influência de fatores ambientais sobre a expressão do caráter for pronunciada (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

## **2.6 Dinâmica populacional de *Sclerotinia sclerotiorum***

A análise da estrutura populacional de um patógeno, visando o estabelecimento de inferências evolutivas, pode ser mais bem entendida se forem utilizados marcadores genéticos seletivamente neutros (RFLP, RAPD, AFLP, etc.), pois estes fornecem informações sobre todo o genoma, possibilitam estimar o grau de parentesco, além de não sofrerem variações ambientais, tornando, assim, o estudo mais conciso (SILVA, 2004).

Isolados individuais são classificados em linhagens clonais por meio do uso de dois ou mais marcadores independentes como grupos de compatibilidade

micelial (GCM), DNA *fingerprinting* ou microssatélites (AUCLAIR et al., 2004; CARBONE; ANDERSON; KOHN, 1999; HAMBLETON; WALKER; KOHN, 2002; KOHN et al., 1991; SIRJUSINGH ; KOHN, 2001). A incompatibilidade micelial é a falha de diferentes isolados em se fundirem e formar uma única colônia e é caracterizada pela formação de células mortas e a redução no crescimento entre duas colônias incompatíveis (KOHN et al., 1991). Em geral, estudos têm demonstrado uma associação entre GCM, DNA *fingerprintings* e marcadores microssatélite (CARPENTER; FRAMPTON; STEWART, 1999; HAMBLETON; WALKER; KOHN, 2002; SEXTON; HOWLETT, 2004).

Estudos populacionais em *S. sclerotiorum* têm revelado um modo de reprodução predominantemente clonal (CUBETA et al., 1997; KOHLI; KOHN, 1998; KOHLI et al., 1995) com alguma ocorrência de reprodução cruzada contribuindo para a estrutura da população em algumas regiões (ATALLAH et al., 2004; KOHLI; KOHN, 1998; SEXTON; HOWLETT, 2004). Mert-Türk et al. (2007) encontraram um nível elevado de diversidade genética em uma população de *S. sclerotiorum* proveniente da província Çanakkale, na Turquia, utilizando dados de avaliações por meio de marcadores moleculares (microssatélites) e fisiológicos (GCM). Sete pares de *primers* de microssatélites revelaram 32 alelos polimórficos entre os 36 isolados estudados e o nível de similaridade encontrado foi muito baixo (15%). Na coleção de isolados, 19 GCM foram encontrados. Os resultados obtidos sugerem que, possivelmente, há alta taxa de cruzamentos que contribuem para elevar a diversidade da população do patógeno.

Esse fungo tem uma fase haploide somática, na qual a clonalidade é resultado tanto de reprodução assexual, por meio dos escleródios, quanto por reprodução sexual por “autofecundação”, pois é uma espécie homotática (KOHN, 1995) com a expectativa de que a variação intraclonal seja devido à ocorrência de mutação (CARBONE; KOHN, 2001; CARBONE; ANDERSON;

KOHN, 1999). Em populações naturais, existe um mosaico de clones que tendem a ser geneticamente isolados uns dos outros. Análises filogenéticas dos clones usando dados de sequências de DNA sugerem um modo predominantemente clonal de evolução, sem evidência de troca genética e recombinação entre genótipos individuais (KULL et al., 2004). Condições ambientais locais e rotação de culturas podem favorecer a recombinação sexual nas populações de *S. sclerotiorum*, além do uso de sementes contaminadas, o que pode aumentar o número de isolados que apresentaram diferentes genótipos (GOMES et al., 2010).

Gomes et al. (2010) utilizaram 10 locos microssatélite para avaliar a diversidade e estrutura genética de 79 isolados de *S. sclerotiorum* de feijão no Brasil. Oitos desses 10 locos foram polimórficos dentro das populações. Análises baseadas na diversidade genética e índices de fixação indicaram variabilidade entre e dentro de populações. Estes dados sugerem que o nível de fluxo gênico intrapopulacional é alto, proporcionando assim a oportunidade de disseminação de alelos raros, possivelmente incluindo aqueles que controlam determinadas características, tais como resistência a drogas e patogenicidade. Além disso, foi observado que o mofo-branco, na cultura de feijão no Cerrado do Brasil, é causado por populações geneticamente diversas de *S. sclerotiorum* e que este patógeno é altamente variável dentro de pequenas áreas geográficas. Sendo assim, são necessárias mais pesquisas para investigar os impactos potenciais de cruzamento sobre o manejo das epidemias e doenças.

A estabilidade dos marcadores utilizados rotineiramente em laboratórios foi investigada em um estudo de Kohn et al. (2008). Doze isolados foram propagados serialmente, por até 400 dias, a 22°C; cinco destes isolados também foram propagados a 30°C. Não foram observadas variações em grupos de compatibilidade micelial (GCM), DNA fingerprints, alelos de sete locos microssatélites ou alelos de 56 locos AFLP. Esses indicadores revelam que a

variação em populações de campo provavelmente é muito maior e influenciada por diferentes processos ambientais.

O genoma de 38-Mb de *S. sclerotiorum* foi sequenciado em 2005 e a publicação do genoma completo abre um novo capítulo na pesquisa sobre esse importante patógeno (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, no Laboratório de Genética Molecular e no campo experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.1 Coleta e armazenamento dos escleródios**

Os isolados foram coletados em campos experimentais e de cultivo de feijão localizados no estado de Minas Gerais (Tabela 1).

Escleródios retirados das plantas e do solo foram armazenados em sacos de papel em temperatura ambiente. Posteriormente, foram desinfestados por imersão em álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, em hipoclorito de sódio a 1%, durante 2 minutos. Logo após, foi realizada a lavagem em água destilada estéril por mais 2 minutos. Após a desinfestação, os escleródios foram cultivados em meio cenoura-ágar (LESLIE; SUMMERELL, 2006) a 22°C. Cada isolado é resultante de um único escleródio. Os isolados foram caracterizados e os escleródios desenvolvidos a partir do cultivo em meio cenoura-ágar foram utilizados para a indução da germinação carpogênica com o objetivo de obter a fase sexual do fungo.

#### **3.2 Obtenção da germinação carpogênica**

Para a avaliação das metodologias de obtenção da germinação carpogênica, foram utilizados dois isolados de *S. sclerotiorum* coletados no município de Ijaci, MG, denominados UFLA5 e UFLA11. Os testes foram realizados em 2 repetições para cada isolado. Cada repetição foi constituída por

uma caixa gerbox (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) contendo o substrato utilizado pelo método e 15 escleródios.

Tabela 1 Relação dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* e de seus respectivos locais de coleta no estado de Minas Gerais

<b>Isolado</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Procedência</b>	<b>Ano</b>	<b>Isolado</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Procedência</b>	<b>Ano</b>
UFLA1	Talismã	Ijaci	2009	UFLA36	Pérola	Guarda-Mor	2010
UFLA2	Talismã	Ijaci	2009	UFLA37	-	Viçosa	-
UFLA3	MAV 5.60	Ijaci	2009	UFLA38	-	Presidente Bernardes	-
UFLA5	-	Ijaci	2009	UFLA39	-	Cabeceira Grande	-
UFLA6	MAV 5.60	Ijaci	2009	UFLA44	Ouro Vermelho	Coimbra	2010
UFLA7	-	Ijaci	2009	UFLA45	Pérola	Paracatu	2010
UFLA8	BRS	Ijaci	2009	UFLA47	Pérola	Paracatu	2010
UFLA10	executivo Talismã	Ijaci	2009	UFLA48	Ouro Vermelho	Porto Firme	-
UFLA11	CNFP15 175	Ijaci	2009	UFLA49	Ouro Vermelho	Porto Firme	-
UFLA12	-	Ijaci	2009	UFLA52	-	Oratórios	-
UFLA13	-	Ijaci	2009	UFLA54	Ouro Vermelho	Viçosa	-
UFLA14	MAV I-21	Ijaci	2009	UFLA56	-	Viçosa	2010
UFLA15	MAV 3.36	Ijaci	2009	UFLA57	-	Viçosa	2010
UFLA18	Talismã	Ijaci	2009	UFLA58	-	Viçosa	2010
UFLA19	Talismã	Ijaci	2009	UFLA59	Pérola	Unaí	2010
UFLA20	Talismã	Ijaci	2009	UFLA60	Pérola	Unaí	2010
UFLA21	Talismã	Ijaci	2009	UFLA61	-	Unaí	-
UFLA23	Talismã	Ijaci	2009	UFLA63	Pérola	Unaí	-
UFLA24	Talismã	Ijaci	2009	UFLA64	-	Unaí	-
UFLA25	Talismã	Ijaci	2009	UFLA66	-	Unaí	-

Tabela 1, continuação

UFLA26	Carioca	Lambari	2010	UFLA67	-	Unaí	-
UFLA27	-	Lambari	2010	UFLA77	OPNS XVC 3	Lambari	2010
UFLA28	-	Lamabri	2010	UFLA86	-	Patos de Minas	2010
UFLA30	Carioca	Lambari	2010	UFLA91	Majestoso	Patos de Minas	2010
UFLA34	Pérola	Paracatu	-	UFLA92	Majestoso	Patos de Minas	2010



Após a identificação do método mais eficiente para a formação de apotécios, os 50 isolados avaliados foram testados quanto à capacidade e ao tempo para que ocorresse a germinação carpogênica. Estes testes foram realizados nas mesmas condições descritas anteriormente.

### **3.2.1 Método modificado de Mylchreest e Wheeler (1987)**

O método consiste em cultivar os escleródios, a 20°C, em frascos Erlenmeyers de 250 mL sobre grãos de feijão autoclavados (25 g de feijão, mais 60 mL de água destilada, autoclavados, a 120°C, por 20 minutos). Depois de três semanas, quando novos escleródios são formados e amadurecidos, os frascos são incubados a 4°C, durante quatro semanas.

Os escleródios são, então, removidos dos grãos de feijão e colocados a 1 cm de profundidade em substrato Plantmax® (Eucatex, Paulina, São Paulo, Brasil), em gerbox com tampa. Os recipientes são mantidos a 10°C sob aspersão com água destilada periodicamente. Quando os estipes são visíveis, as gerbox são colocadas na luz por 14 horas de exposição por dia, a 22°C, até que os apotécios estejam maduros.

### **3.2.2 Método modificado de Sun e Yang (2000)**

Foram utilizados alta intensidade de luz (120-130 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), nível elevado de umidade do solo e temperatura de 20°C, descritos como ideais pelos autores.

A metodologia consiste em colocar os escleródios em três camadas de papel toalha estéril, saturados com água destilada estéril e colocá-los em uma placa de Petri de vidro esterilizada. As placas são seladas com parafilme e colocadas no refrigerador a 4,5°C para o pré-condicionamento por dois meses.

Os escleródios pré-condicionados são, então, colocados na superfície de areia esterilizada umedecida em câmaras de crescimento com 12 horas de luz por dia, até a formação de apotécios maduros.

Um teste adicional, sem o pré-condicionamento a 4,5°C, foi realizado para se avaliar a possibilidade da obtenção de apotécios, por esse método, em um tempo reduzido.

### **3.2.3 Método de Brandão et al. (2008)**

O método consiste em distribuir escleródios viáveis sobre 250 g de solo estéril em caixas gerbox. As caixas com solo em capacidade de campo contendo os escleródios são incubadas a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, por 40 dias.

### **3.2.4 Método 1 de Paula Júnior (2010, Comunicação pessoal)\***

Por esta metodologia, os escleródios devem ser dispostos na superfície ou a 0,5 cm de profundidade em areia estéril úmida, em caixas gerbox e incubados à temperatura ambiente, a qual foi considerada, neste estudo, como 20°C com exposição a 24 horas de luz por dia. Foram realizados testes tanto com os escleródios dispostos na superfície como a 0,5 cm de profundidade em areia.

### **3.2.5 Método 2 de Paula Júnior (2010, Comunicação pessoal)**

Este método propõe que se coloquem os escleródios a 0,5 cm de profundidade em areia ou solo estéril e úmido, em caixas gerbox. As caixas

---

\* Informações extraídas de entrevista de 2010 com Trazilbo José de Paula Júnior, pesquisador chefe técnico da unidade regional da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG, Brasil

devem ser mantidas a 18°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz por dia. Os testes foram realizados tanto em areia como em solo.

### 3.3 Caracterização dos isolados de *S. sclerotiorum*

#### 3.3.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Discos de ágar colonizados, removidos de culturas em crescimento ativo, foram colocados em placas de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. As placas foram mantidas no escuro, à temperatura de 22°C. Os diâmetros das colônias (mm) foram medidos diariamente (MERT-TÜRK et al., 2007).

O IVCM foi calculado, utilizando-se a fórmula adaptada de Oliveira (1991):

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

sendo

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada placa uma repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância no programa MSTAT-C e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a  $P \leq 0,05$ .

### **3.3.2 Caracterização morfológica**

Após trinta dias de crescimento dos isolados em meio BDA, o número de escleródios formados por placa foi analisado. Além disso, os escleródios de cada isolado foram caracterizados de acordo com sua forma e tamanho. A coloração da colônia também foi avaliada (MERT-TÜRK et al., 2007), assim como o tempo necessário para a formação do primeiro escleródio de cada isolado.

Os experimentos para a caracterização morfológica dos isolados foram conduzidos e avaliados nas mesmas condições citadas para o IVC. Além disso, as correlações entre essas características foram avaliadas e a significância foi testada pelo Teste t de Student, a  $P \leq 0,01$ . Para esta avaliação, foram atribuídos valores numéricos para cada classe das características, colorações das colônias e forma dos escleródios.

### **3.3.3 Grupos de compatibilidade micelial (GCM)**

Testes para a determinação dos GCMs foram realizados em todas as combinações isolado x isolado possíveis. Um disco de BDA colonizado de cada isolado foi transferido para uma placa contendo meio BDA modificado com corante alimentício vermelho (300 $\mu$ L/L), aos pares, como descrito por Mert-Türk et al.(2007). As placas de Petri foram mantidas a 22°C, durante 5 dias, no escuro, antes da avaliação.

Os pares de isolados foram considerados incompatíveis quando uma região de contato entre eles foi observada. Essa região é caracterizada pela formação de uma zona de corante vermelho. Os pares de isolados nos quais não foi possível verificar a formação da região de contato, indicando que os micélios

dos mesmos se misturaram uniformemente, foram considerados compatíveis. Cada combinação de pareamento foi repetida três vezes.

### 3.3.4 Extração de DNA

Para se obter a massa micelial, três discos de ágar foram removidos de uma cultura em crescimento ativo e transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio malte líquido 2%. Estes foram mantidos em incubadora a 22°C, com agitação de 120 rpm/min, por um período de tempo que variou de três a quatro dias, dependendo do isolado. O micélio obtido teve sua umidade reduzida com a utilização de papel filtro e, posteriormente, foi liofilizado por 48 horas.

A extração de DNA foi realizada utilizando-se a metodologia de Raeder e Broda (1985), modificada com a metodologia de Kaufman, Richards e Dierig (1999). Dessa forma, o micélio liofilizado foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. O tecido macerado foi posteriormente ressuspendido em 10 mL de STE (0,25M sacarose, 0,03M TRIS e 0,05M EDTA) gelado e centrifugado, a 1000 xg, por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e acrescentaram-se 10 mL de tampão de extração (2% CTAB, 100 mM TRIS pH8,0, 1,4 M NaCl e 1% polivinilpirrolidona – PVP) ao *pellet* formado. Homogeneizou-se e o material foi incubado em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos. Após o banho-maria, o DNA foi extraído com 10 mL da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e, posteriormente, precipitado com a adição de 30 mL da mistura de etanol 95%:acetato de amônio 7,5 M (6:1) e posterior incubação a -20°C, durante uma noite. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado e seco. Em seguida, foi reidratado em tampão TE (1 mM TRIS e 0,1 M EDTA). Realizou-se uma segunda extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1) e uma terceira com clorofórmio:álcool isoamil (24:1). O DNA

do sobrenadante foi então precipitado em, pelo menos, três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3 M e etanol 95% (1:20). Após uma noite de precipitação a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o DNA foi centrifugado, seco e reidratado em tampão TE. As alíquotas de DNA obtidas de cada isolado foram quantificadas em gel de agarose 1%. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras, a concentração de cada amostra foi estimada e, posteriormente, diluída para a concentração de  $10\text{ng}/\mu\text{L}$ , utilizada nas reações.

### 3.3.5 Análise molecular por meio de microssatélites

Neste estudo foram utilizados nove pares de *primers* (Tabela 2), os quais, conforme mostrado por Sirjusingh e Kohn (2001), demonstraram o polimorfismo existente em uma população de *S. sclerotiorum*.

As reações de amplificação continham 20 ng de DNA genômico, 100  $\mu\text{M}$  de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase, 0,5 $\mu\text{M}$  de cada *primer* do par, 2  $\mu\text{M}$  de tampão de reação (50mM TRIS pH 8,3; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 20mM KCl; 10 $\mu\text{g}$  de BSA, 0,25% de ficol 400; 10 mM de tartrazine) e água bidestilada, totalizando um volume total de reação de 12  $\mu\text{L}$ . As amplificações foram realizadas em tubos de 0,2 mL em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, por meio do seguinte programa descrito por Sirjusingh & Kohn (2001):  $95^{\circ}\text{C}$ , por 8 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$ , anelacção dos *primers* a  $47^{\circ}\text{-}55^{\circ}\text{C}$  (Tabela 2) e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , por 30-45 segundos, com 5 minutos de extensão no ciclo final. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Às bandas polimórficas obtidas com cada par de *primers* microssatélite foi dado o escore de 1 (presença da banda) e 0 (ausência da banda) para cada isolado do patógeno.

Tabela 2 Relação dos *primers* microssatélites utilizados

<i>Primers</i>	Sequências repetitivas amplificadas	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Primer 1</i>	(GT) <sub>8</sub>	GTAACACCGAAATGACGGC GATCACATGTTTATCCCTGGC	55
<i>Primer 2</i>	(CA) <sub>9</sub>	CGATAATTTCCCCTCACTTGC GGAAGTCCTGATATCGTTGAGG	55
<i>Primer 3</i>	[(GT)2GAT]3(GT)14 GAT(GT)5 [GAT(GT)4]3(GAT)3	CAGACGAATGAGAAGCGAAC TTCAAAACAACGCTCCTGG	55
<i>Primer 4</i>	(GT) <sub>10</sub>	CCTGATATCGTTGAGGTCG ATTTCCCCTCACTTGCTCC	55
<i>Primer 5</i>	(TTA) <sub>9</sub>	TCATAGTGAGTGCATGATGCC CAGGGATGACTTTGGAATGG	47
<i>Primer 6</i>	TACA <sub>10</sub>	GTTTTCGGTTGTGTGCTGG GCTCGTTCAAGCTCAGCAAG	55
<i>Primer 7</i>	(CATA) <sub>25</sub>	TGCATCTCGATGCTTGAATC CCTGCAGGGAGAAACATCAC	55
<i>Primer 8</i>	(TATG) <sub>9</sub>	ATCCCTAACATCCCTAACGC GGAGAATTGAAGAATTGAATGC	55
<i>Primer 9</i>	(AGAT)14(AAGC)4	GCTCCTGTATACCATGTCTTG GGACTTTCGGACATGATGAT	55

A matriz gerada foi utilizada para a obtenção das estimativas de similaridade genética usando o programa NTSYS – pc 2.1 (ROLF, 2000).

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 banda apenas no indivíduo  $i$  e  $c$  presença de banda apenas no indivíduo  $j$ . A matriz de similaridade foi usada para construir o dendrograma 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  $sgs = \{sg_{ij} [(1 - sg_{ij}) / (n - 1)]\}^{0.5}$ , 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 dendrograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade ( $sgm$ ). O  $sgm$  foi

estimado por meio do teste de  $t$ , utilizando 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  $sgs$  o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

### 3.4 Reação de linhagens de feijão a isolados de *S. sclerotiorum*

Foram utilizadas 15 linhagens de feijão (União, Estilo, Radiante, Pérola, Esplendor, Ouro Negro, CNFRJ 105 64, Tesouro, Majestoso, RP2, Campeiro, Talismã, Cometa, RP1 e Valente) e cinco isolados (10% do total) de *S. sclerotiorum* (UFLA3, UFLA26, UFLA54, UFLA59 e UFLA92). O teste de patogenicidade consistiu em cinco experimentos de campo, realizados simultaneamente, em que todos possuíam as 15 linhagens, tendo sido realizada a inoculação de um isolado por experimento. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições. A parcela foi constituída por uma linha de um metro, sendo semeadas quinze sementes do feijoeiro por metro.

Para a obtenção de micélio para a inoculação, discos de ágar colonizados com micélio de cada isolado foram transferidos para placas contendo meio BDA e estas foram mantidas a 22°C, por quatro dias. Discos de meio colonizados foram retirados por meio da utilização de ponteiras plásticas de micropipeta, para que fosse realizada a inoculação.

O método utilizado para a inoculação foi o *straw test* proposto por Petzoldt e Dickson (1996), que consiste em cortar o ápice da haste principal da planta e inoculá-lo com um canudo contendo o micélio do fungo. Neste estudo, o canudo foi substituído pelas ponteiras. A inoculação foi realizada aos 42 dias após a semeadura.



Sete dias após a inoculação, procedeu-se a avaliação da reação de resistência das linhagens do feijoeiro ao mofo-branco, por meio de uma escala diagramática de 1 a 9. A nota 1 indica plantas sem sintomas; 2, invasão do fungo além do ponto de inoculação, porém, menor do que uma polegada; 3, invasão do fungo além de uma polegada até antes do primeiro nó; 4, quando o fungo atinge o primeiro nó; 5, invasão do fungo além do primeiro nó, porém, menor do que uma polegada; 6, invasão do fungo além de uma polegada até antes do segundo nó; 7, quando o fungo atinge o segundo nó; 8, invasão do fungo além do segundo nó e 9 indica morte da planta. Os dados médios das notas por parcela foram submetidos às análises de variância individual e conjunta, com o auxílio do programa MSTAT-C e foram comparados pelo teste de Scott Knott, a  $P \leq 0,05$ .

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Resultados**

#### **4.1.1 Obtenção da germinação carpogênica**

Para que a germinação carpogênica dos escleródios ocorresse de maneira mais rápida e eficiente, os melhores métodos foram o método modificado de Sun e Yang (2000) e o Método 2 de Paula Júnior (2010, comunicação pessoal), em que os escleródios foram dispostos a 0,5 cm de profundidade em areia.

Realizando-se o pré-condicionamento dos escleródios de dois meses, a 4,5°C, proposto pela metodologia de Sun e Yang (2000), não houve a formação de apotécios, mesmo após três meses de incubação dos escleródios a 20°C. Quando os escleródios foram colocados diretamente na superfície de areia esterilizada umedecida em câmaras de crescimento, com 12 horas de luz por dia, a 20°C, a germinação carpogênica ocorreu após 35 dias.

Do mesmo modo, bons resultados foram obtidos com a segunda metodologia proposta por Paula Júnior (2010, comunicação pessoal). Os escleródios germinaram em 35 dias, quando colocados a 0,5 cm de profundidade na areia. Não ocorreu germinação carpogênica quando a metodologia foi realizada com solo.

Avaliando-se o primeiro método do mesmo autor, a germinação de apotécios ocorreu após 50 dias quando os escleródios foram enterrados a 0,5 cm de profundidade na areia. Quando os escleródios foram colocados na superfície da areia estéril úmida, não ocorreu germinação carpogênica. Os escleródios também germinaram carpogenicamente após três meses e meio, quando a metodologia de Brandão et al. (2008) foi utilizada.

A avaliação da metodologia modificada de Mylchreest e Wheeler (1987) não resultou na formação de escleródios sobre grãos de feijão autoclavados, nem mesmo após as três semanas de armazenamento dos frascos a 20°C.

Assim sendo, para avaliar a germinação carpogênica dos 50 isolados, neste estudo, utilizou-se a metodologia modificada de Sun e Yang (2000) sem o pré-condicionamento dos escleródios. Desses isolados, 44% formaram apotécios em torno de 35 dias após a incubação a 20°C. Uma avaliação aos 46 dias de incubação foi realizada e 24% do total de isolados estavam em fase de aparecimento dos primeiros estipes dos apotécios. Até essa data, os outros 32% dos isolados não haviam germinado carpogenicamente (Tabela 3).

#### **4.1.2 Caracterização dos isolados de *S. sclerotiorum***

##### **4.1.2.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)**

A análise de variância dos dados médios do IVCM dos 50 isolados de *S. sclerotiorum* demonstrou que houve diferença significativa entre eles. O teste de médias Scott Knott separou os isolados em quatro grupos distintos de acordo com sua velocidade de crescimento micelial (Tabela 4). Os dois isolados mais lentos foram o UFLA20 e o UFLA23, apresentando média de crescimento de 14,75 mm/dia. A maioria dos isolados apresentou IVCM mais elevado, variando de 23,83 a 30,17 mm/dia.

Tabela 3 Relação dos isolados de *S. sclerotiorum* e de seus respectivos tempos para a germinação carpogênica, utilizando-se a metodologia modificada de Sun e Yang (2000)

Germinação em 35 dias	Germinação em 46 dias	Sem germinação
UFLA1, UFLA2, UFLA3, UFLA13, UFLA15, UFLA25, UFLA26, UFLA28, UFLA30, UFLA37, UFLA39, UFLA45, UFLA48, UFLA56, UFLA59, UFLA60, UFLA61, UFLA63, UFLA66, UFLA86, UFLA91, UFLA92	UFLA5, UFLA7, UFLA14, UFLA18, UFLA20, UFLA21, UFLA24, UFLA38, UFLA47, UFLA54, UFLA57, UFLA77	UFLA6, UFLA8, UFLA10, UFLA11, UFLA12, UFLA19, UFLA23, UFLA27, UFLA34, UFLA36, UFLA44, UFLA49, UFLA52, UFLA58, UFLA64, UFLA67

Tabela 4 Resultado do agrupamento de médias do IVCM (mm/dia) dos 50 isolados de *S. sclerotiorum*, pelo teste de Scott Knott a  $P \leq 0,05$

Isolados	IVCM	Isolados	IVCM	Isolados	IVCM
UFLA1	24,00D	UFLA23	15,00A	UFLA52	22,00C
UFLA2	18,33B	UFLA24	25,83D	UFLA54	26,67D
UFLA3	27,67D	UFLA25	21,00C	UFLA56	25,50D
UFLA5	26,83D	UFLA26	27,83D	UFLA57	27,83D
UFLA6	26,83D	UFLA27	30,17D	UFLA58	26,83D
UFLA7	29,50D	UFLA28	25,50D	UFLA59	27,00D
UFLA8	26,83D	UFLA30	27,83D	UFLA60	25,00D
UFLA10	28,00D	UFLA34	27,33D	UFLA61	19,50B
UFLA11	27,67D	UFLA36	26,33D	UFLA63	25,50D
UFLA12	28,83D	UFLA37	26,67D	UFLA64	24,83D
UFLA13	28,50D	UFLA38	23,83D	UFLA66	26,50D
UFLA14	26,83D	UFLA39	22,50C	UFLA67	25,67D
UFLA15	29,17D	UFLA44	28,17D	UFLA77	27,17D
UFLA18	22,83C	UFLA45	26,67D	UFLA86	26,17D
UFLA19	21,16C	UFLA47	26,17D	UFLA91	25,00D
UFLA20	14,50A	UFLA48	25,50D	UFLA92	22,00C
UFLA21	23,00C	UFLA49	27,00D		

#### 4.1.2.2 Caracterização morfológica

O crescimento dos isolados em meio BDA foi acompanhado diariamente e, após 30 dias, os mesmos foram caracterizados quanto à coloração da colônia. Observaram-se três categorias distintas de coloração predominante das colônias quando desenvolvidas sobre meio BDA, sendo elas branca, bege e de marrom a preta (Figura 2). Dos 50 isolados, 22% (11) apresentaram coloração branca da colônia, 58% (29) apresentaram coloração bege e 20% (10) apresentaram coloração de marrom a preta (Tabela 5).

O tempo necessário para a formação do primeiro escleródio de cada isolado também foi analisado e a análise de variância destes dados demonstrou que houve diferença significativa entre os 50 isolados avaliados. O teste de médias Scott Knott separou os isolados em quatro grupos distintos (Tabela 6), tendo os isolados que demoraram mais para a formação do primeiro escleródio sido UFLA25, UFLA37 e UFLA39, uma vez que o tempo necessário foi, em média, de 12,44 dias. Os isolados que mais rapidamente formaram o primeiro escleródio foram UFLA1, UFLA6, UFLA7, UFLA10, UFLA11, UFLA12, UFLA13, UFLA15, UFLA52, UFLA54, UFLA57 e UFLA58, tendo o primeiro escleródio se formado em torno do quarto dia de incubação.

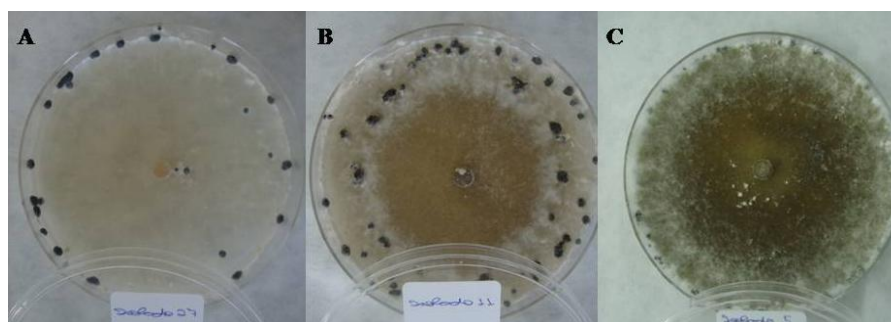


Figura 2 Coloração predominante das colônias de *S. sclerotiorum* em meio BDA, após 30 dias de crescimento, sendo A: coloração branca; B: coloração bege; C: coloração de marrom a preta

Tabela 5 Relação da coloração das colônias dos 50 isolados de *S. sclerotiorum* em meio BDA após 30 dias de crescimento

Coloração branca (22%)	Coloração bege (58%)	Coloração de marrom a preta (20%)
UFLA3, UFLA8, UFLA21, UFLA26, UFLA27, UFLA30, UFLA37, UFLA39, UFLA60, UFLA64, UFLA77	UFLA1, UFLA5, UFLA6, UFLA7, UFLA10, UFLA11, UFLA12, UFLA13, UFLA15, UFLA18, UFLA20, UFLA23, UFLA24, UFLA25, UFLA28, UFLA34, UFLA36, UFLA44, UFLA45, UFLA52, UFLA54, UFLA57, UFLA58, UFLA59, UFLA61, UFLA66, UFLA67, UFLA86, UFLA92	UFLA2, UFLA14, UFLA19, UFLA38, UFLA47, UFLA48, UFLA49, UFLA56, UFLA63, UFLA91

Tabela 6 Resultado do agrupamento de médias do número de dias para o aparecimento do primeiro escleródio dos 50 isolados de *S. sclerotiorum*, pelo teste de Scott Knott,  $q P \leq 0,05$

Isolados	Tempo para a formação do 1º escleródio	Isolados	Tempo para a formação do 1º escleródio	Isolados	Tempo para a formação do 1º escleródio
UFLA1	4,67A	UFLA23	7,33C	UFLA52	4,33A
UFLA2	7,67C	UFLA24	9,33C	UFLA54	4,33A
UFLA3	6,33B	UFLA25	12,33D	UFLA56	5,67B
UFLA5	5,67B	UFLA26	7,33C	UFLA57	4,00A
UFLA6	4,00A	UFLA27	6,00B	UFLA58	4,33A
UFLA7	4,00A	UFLA28	8,33C	UFLA59	5,00B
UFLA8	5,33B	UFLA30	9,67C	UFLA60	6,33B
UFLA10	4,67A	UFLA34	5,33B	UFLA61	5,33B
UFLA11	4,00A	UFLA36	6,67B	UFLA63	6,00B
UFLA12	4,00A	UFLA37	13,00D	UFLA64	7,33C
UFLA13	4,00A	UFLA38	8,00C	UFLA66	5,67B
UFLA14	6,33B	UFLA39	12,00D	UFLA67	6,67B
UFLA15	4,00A	UFLA44	5,33B	UFLA77	5,33B
UFLA18	8,00C	UFLA45	8,00C	UFLA86	6,33B
UFLA19	7,00C	UFLA47	7,33C	UFLA91	6,00B
UFLA20	8,67C	UFLA48	6,33B	UFLA92	6,33B
UFLA21	5,33B	UFLA49	6,00B		

A avaliação dos escleródios dos 50 isolados mostrou que há diferença significativa entre o número de escleródios por placa e entre o tamanho médio dos escleródios de cada isolado. Além disso, foram encontradas duas formas distintas de escleródios. O teste de médias Scott Knott separou os isolados em dois grupos distintos quanto ao número de escleródios formados por placa (Tabela 7), tendo o número de escleródios/placa variado de 10,33 (isolado UFLA47) a 46 (isolado UFLA63).

Em relação ao tamanho médio dos escleródios de cada isolado, o teste de médias Scott Knott separou os 50 isolados em três grupos (Tabela 8). O isolado que apresentou um maior tamanho médio dos escleródios foi o UFLA24 (5,33mm) e o isolado que apresentou um menor tamanho dos escleródios foi o UFLA91 (2,03mm).

A maioria dos isolados (82%) apresentou escleródios regulares e circulares. Apenas os isolados UFLA20, UFLA24, UFLA30, UFLA36, UFLA49, UFLA52, UFLA56, UFLA57 e UFLA77 apresentaram escleródios irregulares e alongados.

Tabela 7 Resultado do agrupamento de médias do número de escleródios por placa dos 50 isolados de *S. sclerotiorum* pelo teste de Scott Knott, a  $P \leq 0,05$

<b>Isolados</b>	<b>Nº de escleródios por placa</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nº de escleródios por placa</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nº de escleródios por placa</b>
UFLA1	24,67A	UFLA23	18,00A	UFLA52	31,67B
UFLA2	17,00A	UFLA24	29,00B	UFLA54	40,00B
UFLA3	25,67A	UFLA25	14,00A	UFLA56	23,67A
UFLA5	24,33A	UFLA26	19,00A	UFLA57	31,33B
UFLA6	36,00B	UFLA27	39,67B	UFLA58	20,67A
UFLA7	42,00B	UFLA28	21,00A	UFLA59	29,33B
UFLA8	29,00B	UFLA30	20,00A	UFLA60	23,67A
UFLA10	43,67B	UFLA34	34,00B	UFLA61	29,33B
UFLA11	42,67B	UFLA36	15,00A	UFLA63	46,00B
UFLA12	34,67B	UFLA37	13,33A	UFLA64	28,00B
UFLA13	35,67B	UFLA38	29,33B	UFLA66	13,67A
UFLA14	15,33A	UFLA39	18,00A	UFLA67	35,00B
UFLA15	29,00B	UFLA44	19,00A	UFLA77	15,33A
UFLA18	44,67B	UFLA45	22,67A	UFLA86	26,00A
UFLA19	14,33A	UFLA47	10,33A	UFLA91	17,33A
UFLA20	26,67A	UFLA48	36,33B	UFLA92	11,00A
UFLA21	28,00B	UFLA49	21,00A		



Tabela 8 Resultado do agrupamento de médias do tamanho médio dos escleródios (mm) dos 50 isolados de *S. sclerotiorum* pelo teste de Scott Knott, a  $P \leq 0,05$

<b>Isolados</b>	<b>Tamanho médio dos escleródios</b>	<b>Isolados</b>	<b>Tamanho médio dos escleródios</b>	<b>Isolados</b>	<b>Tamanho médio dos escleródios</b>
UFLA1	2,97 <b>A</b>	UFLA23	4,63 <b>C</b>	UFLA52	4,73 <b>C</b>
UFLA2	3,27 <b>A</b>	UFLA24	5,33 <b>C</b>	UFLA54	2,63 <b>A</b>
UFLA3	2,83 <b>A</b>	UFLA25	3,80 <b>B</b>	UFLA56	4,30 <b>C</b>
UFLA5	2,80 <b>A</b>	UFLA26	2,37 <b>A</b>	UFLA57	4,10 <b>B</b>
UFLA6	3,07 <b>A</b>	UFLA27	2,97 <b>A</b>	UFLA58	2,73 <b>A</b>
UFLA7	2,97 <b>A</b>	UFLA28	2,63 <b>A</b>	UFLA59	2,63 <b>A</b>
UFLA8	3,03 <b>A</b>	UFLA30	3,67 <b>B</b>	UFLA60	3,03 <b>A</b>
UFLA10	2,77 <b>A</b>	UFLA34	3,53 <b>B</b>	UFLA61	2,83 <b>A</b>
UFLA11	3,23 <b>A</b>	UFLA36	4,72 <b>C</b>	UFLA63	2,97 <b>A</b>
UFLA12	2,63 <b>A</b>	UFLA37	3,37 <b>A</b>	UFLA64	3,58 <b>B</b>
UFLA13	3,17 <b>A</b>	UFLA38	3,17 <b>A</b>	UFLA66	2,80 <b>A</b>
UFLA14	4,60 <b>C</b>	UFLA39	2,53 <b>A</b>	UFLA67	3,13 <b>A</b>
UFLA15	2,57 <b>A</b>	UFLA44	2,43 <b>A</b>	UFLA77	3,47 <b>A</b>
UFLA18	3,67 <b>B</b>	UFLA45	3,62 <b>B</b>	UFLA86	2,87 <b>A</b>
UFLA19	3,70 <b>B</b>	UFLA47	3,57 <b>B</b>	UFLA91	2,03 <b>A</b>
UFLA20	2,97 <b>A</b>	UFLA48	2,87 <b>A</b>	UFLA92	3,20 <b>A</b>
UFLA21	3,60 <b>B</b>	UFLA49	5,00 <b>C</b>		

O tamanho médio dos escleródios e a forma dos mesmos apresentaram correlação de 0,617. Escleródios com formato irregular e alongado, geralmente, foram maiores. Os tempos necessários para a formação do primeiro escleródio e o número médio de escleródios por placa apresentaram correlação de -0,455. Este valor negativo indica que quanto maior o tempo necessário para a formação dos escleródios, um menor número dos mesmos foi formados por placa (Tabela 9).

Tabela 9 Correlação entre as características morfológicas de *S. sclerotiorum*

Características morfológicas	CC	TE	NE	TME	FE
CC		-0,165 <sup>NS</sup>	-0,009 <sup>NS</sup>	0,185 <sup>NS</sup>	0,014 <sup>NS</sup>
TE			-0,455*	0,170 <sup>NS</sup>	0,047 <sup>NS</sup>
NE				-0,163 <sup>NS</sup>	-0,126 <sup>NS</sup>
TME					0,617*
FE					

CC – cor da colônia; TE – tempo para a formação do 1º escleródio; NE – número de escleródios por placa; TME – tamanho médio dos escleródios; FE – forma dos escleródios; NS - não significativo, pelo Teste t de Student, a  $P \leq 0,01$ ; \* - significativo pelo Teste t de Student, a  $P \leq 0,01$

#### 4.1.2.3 Grupos de compatibilidade micelial

Foram avaliadas 2.500 combinações de pareamento dos 50 isolados. Deste total, apenas 157, ou seja, 6,28%, apresentaram compatibilidade micelial. O restante dos pareamentos apresentou a região de contato caracterizada por uma zona de corante vermelho, sendo, portanto, incompatíveis (Figura 3).

Dentre os isolados avaliados, o UFLA58 não foi compatível com nenhum outro isolado e apresentou autoincompatibilidade. Já o isolado UFLA64 apresentou um maior número de combinações compatíveis, sendo compatível com nove outros isolados e apresentando autocompatibilidade (Tabela 10). Cinco isolados (UFLA19, UFLA37, UFLA38, UFLA56 e UFLA63), além do UFLA58, apresentaram autoincompatibilidade.

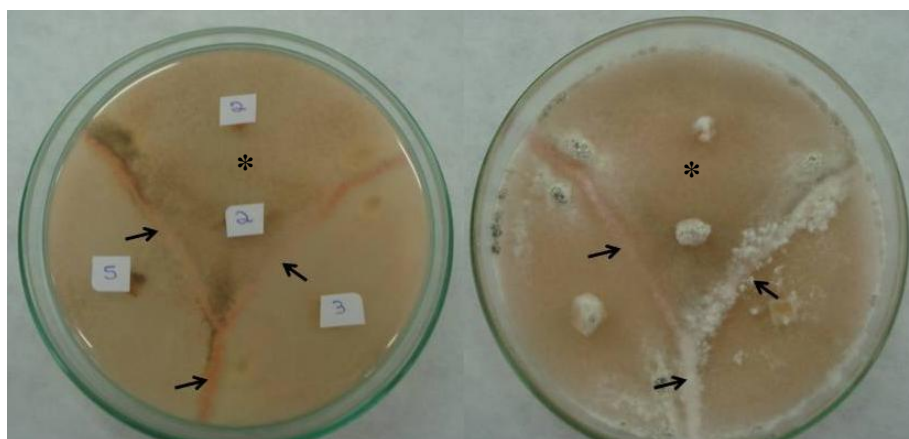


Figura 3 Exemplo de pareamento de isolados de *S. sclerotiorum* em meio BDA modificado com corante alimentício vermelho. As setas indicam regiões de incompatibilidade micelial e os asteriscos regiões de compatibilidade

Tabela 10 Porcentagem de compatibilidade micelial dos 50 isolados de *S. sclerotiorum*

Isolados	% CM	Isolados	% CM	Isolados	% CM
UFLA1	6	UFLA23	14	UFLA52	2
UFLA2	6	UFLA24	8	UFLA54	6
UFLA3	2	UFLA25	4	UFLA56	4
UFLA5	8	UFLA26	4	UFLA57	2
UFLA6	10	UFLA27	16	UFLA58	-
UFLA7	10	UFLA28	2	UFLA59	4
UFLA8	16	UFLA30	2	UFLA60	8
UFLA10	12	UFLA34	6	UFLA61	2
UFLA11	10	UFLA36	2	UFLA63	2
UFLA12	8	UFLA37	2	UFLA64	20
UFLA13	6	UFLA38	4	UFLA66	12
UFLA14	6	UFLA39	8	UFLA67	6
UFLA15	4	UFLA44	6	UFLA77	2
UFLA18	2	UFLA45	4	UFLA86	10
UFLA19	2	UFLA47	8	UFLA91	14
UFLA20	4	UFLA48	6	UFLA92	4
UFLA21	6	UFLA49	2		

#### 4.1.2.4 Análise molecular por meio de microssatélites

Os nove pares de *primers* utilizados apresentaram polimorfismo, amplificando um total de 45 bandas polimórficas, gerando, em média, cinco bandas polimórficas por *primer*. Um exemplo de padrão de bandas geradas pode ser observado na Figura 4.

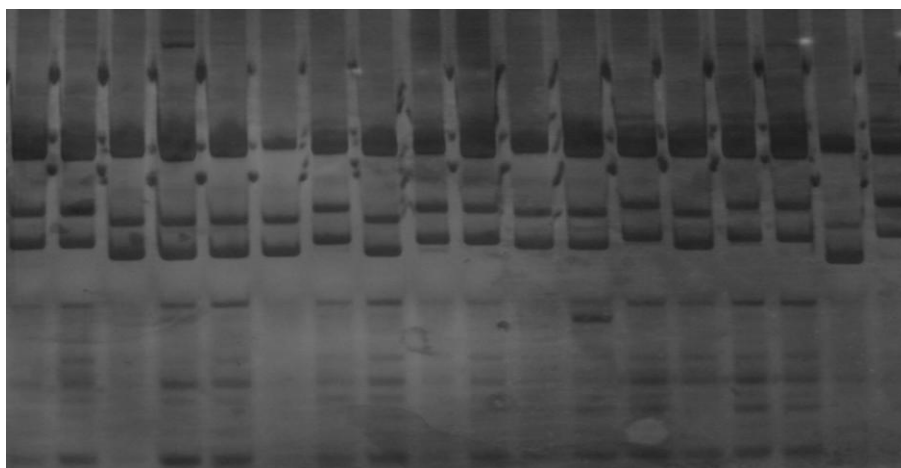


Figura 4 Padrão de bandas de microssatélite gerado pelo *primer* 3

Com base nas 45 bandas polimórficas, foi construída uma matriz de 0 e 1 e, utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice, obtiveram-se as estimativas das similaridades genéticas que variaram de 0,3 a 0,92. Para melhor visualização foi construído um dendrograma (Figura 5). A linha de corte, dada pela estimativa de *sgm*, a 1% de probabilidade, pelo teste de *t*, foi de 0,77. Pela análise do dendrograma foi possível verificar a formação de 35 grupos. Apenas três grupos continham mais que dois isolados considerados geneticamente semelhantes, o grupo XIII (UFLA60, UFLA61 e UFLA63), o grupo XVII (UFLA38, UFLA44, UFLA, UFLA45, UFLA47 e UFLA48) e o grupo XXIII (UFLA6, UFLA10 e

UFLA8), evidenciando a elevada variabilidade genotípica dos isolados avaliados.

#### **4.1.3 Reação de linhagens de feijão a isolados de *S. sclerotiorum***

Na análise de variância conjunta das médias das notas da reação das quinze cultivares aos cinco isolados de *S. sclerotiorum*, as fontes de variação cultivar, isolado e a interação cultivar x isolado foram significativas. A significância da interação cultivar x isolados indica que a reação das cultivares aos diferentes isolados não foi coincidente. Dessa forma, procedeu-se ao teste de médias Scott Knott da reação das cultivares para cada isolado.

O teste de médias (Tabela 11) mostrou que a reação das linhagens aos isolados UFLA3, UFLA54 e UFLA92 foram semelhantes, entretanto, houve uma variação na reação das linhagens aos demais isolados. De maneira geral, as linhagens União, Ouro Negro, CNFRJ10564 e Pérola reagiram de forma semelhante frente aos cinco isolados, apresentando médias de notas mais baixas e, portanto, maior nível de resistência.

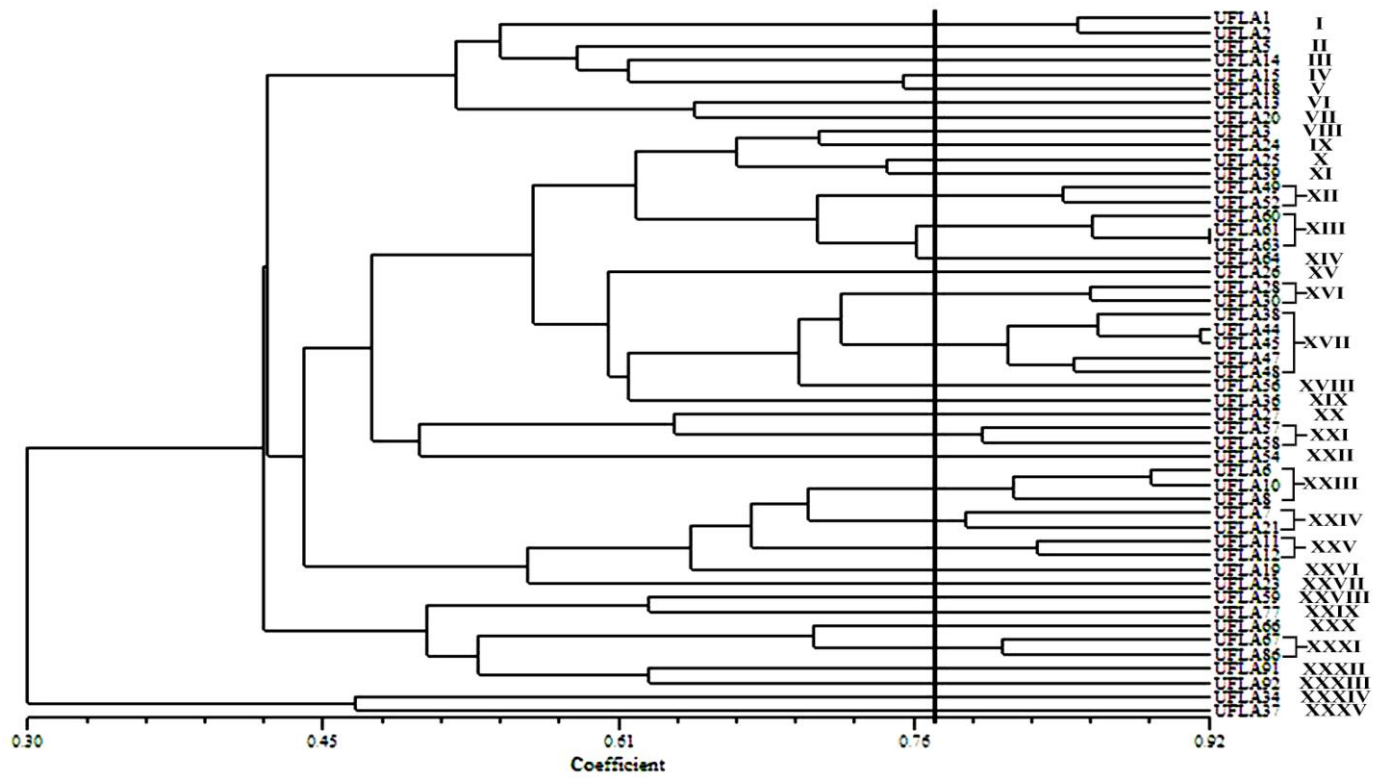


Figura 5 Dendrograma de similaridade genética dos 50 isolados de *S. sclerotiorum*

Os cinco isolados avaliados apresentaram níveis de agressividade diferentes (Tabela 11). Os isolados UFLA26, UFLA54 e UFLA59 formaram um grupo de isolados mais agressivos, enquanto o isolado UFLA92 apresentou um menor nível de agressividade.

Tabela 11 Resultado do agrupamento das médias da reação de cada linhagem aos cinco isolados de *S. sclerotiorum* pelo teste de Scott Knott, a  $P \leq 0,05$

<b>Linhagens</b>	<b>UFLA3</b>	<b>UFLA26</b>	<b>UFLA54</b>	<b>UFLA59</b>	<b>UFLA92</b>
União	3,30A	4,76A	4,58A	4,03A	2,04A
Tesouro	3,35A	5,21A	5,47A	5,70B	1,60A
Radiante	3,54A	4,92A	5,10A	5,21B	2,14A
Talismã	4,42A	5,27A	5,32A	5,69B	2,24A
Majestoso	4,17A	4,23A	5,63A	5,18B	2,43A
Ouro Negro	3,56A	5,04A	4,47A	4,47A	2,24A
Esplendor	3,33A	6,20B	5,62A	6,01B	2,04A
Valente	2,90A	6,97B	5,20A	6,40B	2,03A
Cometa	3,52A	5,07A	4,71A	5,33B	2,05A
Campeiro	4,25A	4,87A	5,52A	5,63B	2,03A
Estilo	3,02A	4,68A	4,22A	5,99B	2,02A
RP1	3,88A	5,74B	4,32A	4,52A	1,78A
RP2	3,98A	4,74A	5,03A	5,21B	1,85A
CNFRJ10564	3,90A	4,44A	4,60A	4,16A	1,98A
Pérola	4,42A	5,43A	4,79A	4,44A	1,75A
Médias	3,60B	5,17C	4,97C	5,20C	2,01A

## 4.2 Discussão

Os resultados deste trabalho confirmam a alta influência de fatores ambientais sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Dentre esses fatores, destacam-se a umidade do solo, a temperatura e a luminosidade sob os quais os escleródios são mantidos (HAO; SUBBARAO; DUNIWAY, 2003). Dessa forma, a obtenção de uma metodologia eficiente para a produção de apotécios *in vitro* é muito importante para o estudo de populações desse fitopatógeno. A avaliação das metodologias para a obtenção da germinação

carpogênica (MYLCHREEST; WHEELER, 1987; SUN; YANG, 2000; BRANDÃO et al., 2008; PAULA JÚNIOR, 2010, comunicação pessoal) apresentou resultados satisfatórios, uma vez que foram obtidos apotécios maduros em um período de tempo menor do que o apresentado pelos seus respectivos autores.

De acordo com a metodologia descrita por Sun e Yang (2000), a germinação carpogênica dos escleródios ocorre em torno de dois meses e alguns dias. Esses dois meses são referentes ao processo de pré-condicionamento a 4,5°C dos escleródios. Foi demonstrado que esse processo não é necessário, uma vez que, colocando-se diretamente os escleródios sobre a superfície da areia estéril, a formação dos apotécios ocorreu em 35 dias.

A metodologia descrita por Brandão et al. (2008) descreve que a formação de apotécios ocorre por volta dos 40 dias. O teste realizado no presente estudo mostrou, entretanto, que, com os isolados avaliados, esse tempo foi maior, não sendo, portanto, a metodologia mais adequada.

A primeira metodologia de Paula Júnior (2010, comunicação pessoal) propõe que a formação dos apotécios ocorra em 20 dias após a exposição dos escleródios às condições sugeridas. No entanto, os isolados avaliados germinaram carpogenicamente somente após 50 dias, quando os escleródios foram enterrados a 0,5 cm de profundidade. Dispondo-se os escleródios na superfície da areia, não houve a formação de apotécios.

Paula Júnior (2010, comunicação pessoal) afirma, em sua segunda metodologia, que a germinação carpogênica dos escleródios ocorre em torno de 30 a 40 dias, tanto quando são dispostos sob as condições apresentadas em solo quanto em areia. Neste estudo, os resultados estão dentro do esperado de acordo com o período apresentado pelo método, entretanto, os resultados positivos ocorreram apenas com a disposição dos escleródios em areia.



A avaliação dos 50 isolados de *S. sclerotiorum* mostrou que houve variação genética quanto à capacidade e ao tempo para que ocorresse a germinação carpogênica dos mesmos. Essa variação não teve nenhuma relação com o local de coleta dos isolados, tendo isolados de diferentes origens germinado em um mesmo período de tempo e isolados oriundos de um mesmo local formaram apotécios em épocas diferentes. Como as condições de condução dos experimentos foram uniformes para todos os isolados, essa variação deve-se a diferenças genéticas entre os mesmos.

Mylchreest e Wheeler (1987) avaliaram 35 isolados de *S. sclerotiorum* de colza quanto à produção de apotécios e observaram que a germinação carpogênica ocorreu em todos eles. Entretanto, o tempo necessário para a formação dos estipes variou consideravelmente.

Alguns dados demonstram que existe correlação entre o tamanho dos escleródios e a produção de apotécios. Escleródios que apresentam tamanho médio a grande produzem mais apotécios do que os pequenos (DILLARD; LUDWIG; HUNTER, 1995). De acordo com Bolton, Thomma e Nelson (2006), os escleródios de *S. sclerotiorum* variam muito de tamanho, dependendo do hospedeiro. Um levantamento na literatura realizado por Bag (1999) revelou que os escleródios variam de 2-11 mm em vários hospedeiros. No girassol, por exemplo, um escleródio pode ter 1 cm de espessura e excede 35 cm de diâmetro. No feijão, os escleródios podem possuir 2-10 mm de diâmetro (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Neste trabalho, o tamanho médio dos escleródios está dentro dessa faixa de tamanho, variando de 2,03-5,33 mm de diâmetro. No entanto, não foi observada relação entre a ocorrência da germinação carpogênica e o tamanho dos escleródios. Os isolados UFLA23, UFLA36, UFLA49 e UFLA52 apresentaram escleródios maiores, mas não apresentaram formação de apotécios até a última data de avaliação.

Hao, Subbarao e Duniway (2003), avaliando isolados de *S. sclerotiorum* encontrados em alface, relatam que escleródios considerados grandes são aqueles maiores que 4,75 mm, médios são os que variam de 2 a 4,75 mm e pequenos são os menores que 2 mm. Levando em consideração esta classificação, apenas os isolados UFLA24 e UFLA49 apresentando escleródios grandes, o restante dos isolados apresentando escleródios médios.

O IVCM dos isolados avaliados variou de 14,5 mm/dia (UFLA20) a 30,17 mm/dia (UFLA27) e o tempo para a formação do primeiro escleródio variou de 4 a 13 dias. Esses dados revelam a variabilidade existente entre os isolados quanto a essas características. Akram et al. (2008), avaliando 16 isolados de *S. sclerotiorum* encontrados em grão de bico, demonstraram que houve variação no crescimento radial dos isolados, os quais foram classificados em três grupos (crescimento rápido, intermediário e lento). Oito isolados apresentaram crescimento rápido; dois, crescimento intermediário e seis, crescimento radial lento da colônia. De acordo com a classificação mencionada acima, dos 50 isolados avaliados neste estudo, 39 apresentaram crescimento rápido da colônia.

Dos 11 isolados que formaram o primeiro escleródio mais rapidamente, 10 estão entre os que apresentaram um maior IVCM. Essa comparação é pertinente, uma vez que a formação dos escleródios ocorre depois que o crescimento micelial ocorre em um ambiente com limitações de nutrientes (CHRITIAS; LOCKWOOD, 1973).

A avaliação do número de escleródios formados por placa mostrou que 27 dos 50 isolados apresentaram número reduzido de escleródios, variando de 10,33 a 26,67 escleródios/placa. O restante dos isolados apresentou de 28 a 46 escleródios/placa, em média. Essa variação está dentro do esperado, como descrito por Bag (1999). Segundo este autor, espera-se uma população de 6 a 53

escleródios por placa em cultura artificial de isolados de *S. sclerotiorum* retirados de repolho.

Escleródios produzidos por isolados de *S. sclerotiorum* encontrados em repolho são, principalmente, regulares e circulares (BAG, 1999). Os escleródios produzidos pela maioria dos cinquenta isolados deste estudo também apresentaram morfologia regular e circular. Somente nove isolados apresentaram morfologia irregular e alongada. Esses grupos de morfologia dos escleródios não tiveram relação alguma com o tamanho dos escleródios de cada isolado e nem com o número de escleródios por placa.

Os cinquenta isolados foram avaliados quanto à coloração das colônias e apresentaram três colorações distintas. A maioria dos isolados (58%) apresentou coloração predominantemente bege da colônia, enquanto dez e onze isolados apresentaram coloração de marrom a preta e branca, respectivamente. Essas três colorações também foram identificadas por Mert-Türk et al. (2007), em isolados de *S. sclerotiorum* encontrados em colza. A maioria dos isolados avaliados por eles também apresentou coloração bege. Esses autores afirmam que a variação na coloração da colônia está correlacionada a diferenças genéticas dentro da população.

A avaliação da compatibilidade micelial dos cinquenta isolados estudados mostrou uma pequena porcentagem de isolados compatíveis (6,28%). Este resultado mostra que há grande variabilidade entre os genótipos avaliados. A maioria dos isolados apresentou autocompatibilidade, entretanto, foram identificados seis isolados que apresentaram autoincompatibilidade. Não houve relação entre a compatibilidade dos isolados e seus locais de origem, tendo isolados de um mesmo local sido incompatíveis, enquanto isolados de locais diferentes foram compatíveis.

Kull et al. (2004), avaliando 299 isolados de *S. sclerotiorum* retirados de vários hospedeiros (soja, feijão, canola, pera, colza, girassol e repolho) e de

vários locais (várias partes dos EUA, Canadá, Suíça, Argentina e Grã-Bretanha), identificaram 42 GCM. A maioria (61%) destes grupos era composta por um único isolado, mostrando a alta taxa de incompatibilidade entre os isolados. Três grupos de compatibilidade possuíam amostras de locais diferentes e, além disso, pelo menos um grupo de compatibilidade tinha isolados de diferentes hospedeiros. Já Mert-Türk et al. (2007), avaliando 36 isolados de *S. sclerotiorum* encontrados em colza, identificaram 19 GCM, tendo oito grupos incluído apenas dois isolados e nove isolados apresentaram apenas autocompatibilidade. Esses dados, juntamente com dados moleculares, mostraram grande variabilidade entre os 36 isolados. A análise molecular foi realizada com oito pares de *primers* microssatélite, tendo sete destes *primers* apresentado 32 alelos polimórficos. O nível de similaridade foi muito baixo entre alguns isolados, indicando um alto nível de diversidade genética dentro da população.

Os nove pares de *primers* microssatélite utilizados no presente estudo também foram utilizados por Sirjusingh e Kohn (2001) em um estudo de isolados da América do Norte, principalmente do Canadá e, destes *primers*, oito pares foram utilizados por Mert-Türk et al. (2007) com isolados de colza na Turquia. A análise dos dados moleculares demonstra elevada variabilidade genotípica entre os isolados, uma vez que houve a formação de 35 grupos, sendo a maioria deles (25) formada por um único isolado.

Em um estudo realizado com 79 isolados de *S. sclerotiorum* coletados de feijão no Cerrado brasileiro foram utilizados 10 pares de *primers* microssatélite, tendo oito desses pares sido polimórficos. Análises baseadas na diversidade genética e nos índices de fixação indicaram variabilidade entre e dentro de populações. Estes dados sugerem que o nível de fluxo gênico intrapopulacional é alto, o que indica que o mofo-branco na cultura de feijão no Cerrado do Brasil é causado por populações geneticamente diversas de *S. sclerotiorum* e que este

patógeno é altamente variável dentro de pequenas áreas geográficas (GOMES et al., 2011).

A análise molecular dos isolados avaliados no presente trabalho, juntamente com as características morfológicas e fisiológicas apresentadas, mostra que também há uma grande variabilidade entre e dentro de populações de *S. sclerotiorum* nos locais de Minas Gerais analisados. Os agrupamentos dos isolados tanto referentes às características morfológicas e fisiológicas, quanto à análise molecular, não tiveram relação com os locais de origem dos mesmos.

Nesse sentido, destacam-se os isolados originados da cidade de Ijaci, os quais foram coletados em uma mesma área de cultivo. Dos cinquenta isolados avaliados, dezenove (38%) possuem esta origem e mostraram variabilidade em todos os caracteres analisados. Dentre esses caracteres, destaca-se o tempo necessário para que ocorra a germinação carpogênica, pois os isolados mostram maior variabilidade. Sete isolados não apresentaram formação de apotécios até a última data de avaliação, seis isolados germinaram carpogenicamente em 35 dias e outros seis em 46 dias.

Litholdo Júnior et al. (2011) avaliaram a variabilidade genética de 40 isolados de *S. sclerotiorum* originados de várias regiões do Brasil e de diferentes culturas utilizando marcadores RAPD e GCM. A variabilidade encontrada também não mostrou qualquer relação com a origem geográfica ou o hospedeiro de origem.

Diante de toda essa variabilidade existente nas populações do patógeno, o controle do mofo-branco se torna um objetivo importante nos programas de melhoramento, os quais buscam resistência do hospedeiro. No entanto, a procura por resistência sob condições de campo é frequentemente problemática sem inoculação artificial (ZHAO et al., 2004).

A avaliação da reação de linhagens de feijão a cinco isolados de *S. sclerotiorum* mostrou que as linhagens apresentaram um comportamento

diferente frente aos isolados. Entretanto, as linhagens União, Ouro Negro, CNFRJ10564 e Pérola reagiram de forma semelhante aos isolados, apresentando notas de reação ao mofo-branco mais baixas, portanto, apresentando um menor nível de suscetibilidade.

Além disso, a interação cultivar x isolado e a agressividade dos isolados também apresentaram diferenças significativas. Apesar de a interação ter sido significativa, em geral, a reação das linhagens aos vários isolados foi semelhante, à exceção de algumas interações observadas entre as linhagens Majestoso e Ouro Negro, Estilo e RP1; RP1 e RP2, quando inoculadas com os isolados UFLA 26 e UFLA 59. Portanto, pode-se considerar que poucas interações cultivares x isolados do tipo complexa, ou seja, reação diferente das cultivares, quando inoculadas com os mesmos isolados, ocorreram. Esses dois isolados que discriminaram melhor o nível de resistência das linhagens também foram os mais agressivos.

Pratt e Rowe (1995) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a reação de nove cultivares de alfafa a cinco isolados de *S. sclerotiorum*. Os isolados apresentaram diferença quanto ao nível de agressividade e às cultivares quanto ao nível de suscetibilidade. No entanto, não foi observada interação cultivares x isolados.

As inferências sobre a resistência ou a suscetibilidade de uma cultivar a *S. sclerotiorum* são complicadas, uma vez que vários fatores estão envolvidos. Não se sabe se parte da resistência no campo é resultado de resistência fisiológica ou de mecanismos de escape como época de floração, arquitetura, entre outros, que têm sido associados com a severidade da doença (BOLAND; HALL, 1987; KIM; DIERS, 2000; NELSON; HELMS; OLSON, 1991).

Huang, Mündel e Erickson (2003) avaliaram o efeito do mofo-branco em 16 cultivares de feijão, inoculando as plantas com escleródios do fungo. Os resultados mostraram que cultivares com alguma resistência fisiológica

combinada com hábito de crescimento ereto eram menos suscetíveis ao patógeno, mesmo com uma pressão elevada da doença.

*S. sclerotiorum* apresenta ciclo sexual e a maioria dos isolados utilizados neste estudo foi capaz de produzir apotécios. O ciclo sexual é importante na geração de variabilidade e no potencial evolutivo das populações de patógenos (CHEN; MCDONALD, 1996). No entanto, este patógeno apresenta comportamento homotático (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Portanto, é importante investigar quais mecanismos estão gerando variabilidade, qual a importância da fase sexual na geração de variabilidade, se realmente o comportamento homotático é predominante nesta espécie e também conhecer a estrutura genética populacional de *S. sclerotiorum* no feijoeiro.

Os estudos voltados à caracterização de isolados de *S. sclerotiorum* quanto à morfologia, à fisiologia e à agressividade são escassos. A caracterização de populações do patógeno no estado de Minas Gerais, avaliada no presente estudo, é muito importante para subsidiar o desenvolvimento de cultivares de feijão resistentes ao mofo-branco. A avaliação de um número maior de isolados, bem como o teste de patogenicidade com um número maior de linhagens, poderá contribuir sobremaneira para o entendimento do patossistema *S. sclerotiorum*/feijoeiro e, conseqüentemente, para o controle do mofo-branco.

## 5 CONCLUSÕES

- a) as metodologias que se mostraram mais eficientes para a obtenção de apotécios dos isolados avaliados foram a metodologia modificada de Sun e Yang (2000) e a segunda metodologia proposta por Paula Júnior (2010, comunicação pessoal), em que os escleródios foram dispostos em areia;
- b) a maioria dos isolados tem a capacidade de formar apotécios e, portanto, possibilidade de ocorrer recombinação. Entretanto, poucos isolados apresentaram compatibilidade micelial;
- c) a população avaliada apresentou ampla variabilidade genética para as características morfológicas, fisiológicas e moleculares avaliadas, mesmo entre isolados de uma área restrita de coleta;
- d) a reação da maioria das linhagens de feijoeiro avaliadas foi semelhante, no entanto, as linhagens União, Ouro Negro, CNFRJ10564 e Pérola destacaram-se por apresentarem notas mais baixas quanto à severidade do mofo-branco causado pelos cinco isolados avaliados;
- e) os cinco isolados avaliados apresentaram níveis diferentes de agressividade, tendo os isolados UFLA26 e UFLA59 sido os mais agressivos e que melhor discriminaram as linhagens de feijão quanto à resistência ao mofo-branco.



## REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 899-904, 1979.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, 1979.
- AKRAM, A. et al. Morphological variability and mycelial compatibility among the isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* Associated with stem rot of chickpea. **Pakistan Journal of Botany**, South Waziristan, v. 40, n. 6, p. 2663-2668, 2008.
- ANTONIO, R. P. et al. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 733-740, 2008.
- ARAHANA, V. S. et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 1, p. 180-188, 2001.
- ATALLAH, Z. K. et al. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 737-742, 2004.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 891-895, Aug. 2004.
- AYERS, W. A.; ADAMS, P. B. Mycoparasitism and its application to biological control of plant disease. In: PAPAVIDAS, G. C. **Biological control in crop production beltsville symposium in agricultural research**. Granada: Osmun, 1981. v. 5, p. 91-103.
- BAG, T. K. notes on the variation of sclerotial structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary, incitant of cabbage head rot. **ENVIS Bulletin: himalayan ecology**, Uttaranchal, v. 17, n. 1, 1999. Disponível em: <<http://gbpihedenviis.nic.in/HTML/vol171/NOTES%20ON%20THE%20VARIATION.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2011.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v. 23, p. 88-98, 2001.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 411-451, 1986.

BERT, P. F. et al. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus L.*): characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 109, n. 4, p. 865-874, 2004.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 1, p. 934-936, 1987.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BRANDÃO, R. S.; PRADO, T. do S.; LOBO JÚNIOR, M. Inibição da germinação carpopêgica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos sob integração lavoura-pecuária com *Brachiaria ruziziensis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa, 2008. 1 CD-ROM.

CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, Toronto, v. 53, p. 11- 21, 1999.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. Multilocus nested haplotype networks extended with DNA fingerprints show common origin and fine-scale, ongoing genetic divergence in a wild microbial metapopulation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 2409-2422, 2001.

CARNEIRO, F. F.; SANTOS, J. B. Marker assisted selection of common bean plant in backcross populations. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 234 - 235, 2010.

CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 27, p. 13-21, 1999.

CASTAÑO, F.; VEAR, F.; LABROUHE, D. T. de. The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* measured by mycelium infections combined with ascospore tests. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 373-380, 2001.

CHEN, R. S.; MCDONALD, B. A. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 4, p. 1119-1127, 1996.

CHRISTIAS, C.; LOCKWOOD, J. L. Conversion of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient deprived conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 602- 605, 1973.

CLARKSON, J. P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C. S.; WHIPPS, J. M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 213-222, 2003.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DA HORTICULTURA. **HDC herb Best practice guide**. Warwickshire, 2011. Disponível em: <<http://www.hdc.org.uk/herbs/page.asp?id=22>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

CUBETA, M. A. et al. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 1000-1004, 1997.

CUNHA, W. G. et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology: a record of current work on plant diseases and pest in British Isles**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 654-660, 2010.

DICKMAN, M. B.; MITRA, A. Arabidopsis thaliana as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 255-263, 1992.

DICKSON, M. H.; PETZOLDT, R. Breeding for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica oleracea*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 407, p. 103-108, Apr. 1996.

DILLARD, H. R.; LUDWIG, J. W.; HUNTER, J. E. Conditioning Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for Carpogenic Germination. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 4, p. 411-415, 1995.

- DUTTON, M.V.; EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 9, p. 881-895, 1996.
- FERRAZ, L. C. L. et al. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology: a record of current work on plant diseases and pest in British Isles**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 77-82, 1999.
- GODOY, G. et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990.
- GOMES, E. V. et al. microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry Bean Crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 2, p. 94-99, 2011.
- GOSSEN, B. D.; RIMMER, S. R.; HOLLEY, J. D. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1206, 2001.
- HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L. M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, n. 4, p. 309 -315, 2002.
- HAO, J. J.; SUBBARAO, K. V.; DUNIWAY, J. M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* Sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Epidemiology**, Baltimore, v. 93, n. 4, p. 443-450, 2003.
- HARIKRISHNAN, R.; DEL RIO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.
- HARTILL, W. F. T.; UNDERHILL, A. P. ‘Puffing’ in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 14, p. 355-358, 1976.
- HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 177-184, 2005.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 85, p. 447-471, 1999.

HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Influence of inoculum production temperature on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 5, p. 548-550, 1993.

HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 32, p. 279-286, 1991.

HUANG, H. C.; MÜNDEL, H. H.; ERICKSON, R. S. Effect of physiological resistance and plant architecture on yield of dry bean under disease pressure of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 45, p. 169 - 176, 2003.

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, 1999.

KIM, H. S. et al. Reaction of soybean cultivars to sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 3, p. 665- 669, 2000.

KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2000.

KOHLI, Y. et al. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 69- 77, 1995.

KOHLI, Y.; KOHN, L. M. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, n. 2, p. 139- 149, 1998.

KOHN, L. M. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. **Mycotaxon: an international journal for research on taxonomy and nomenclature of fungi, including lichens**, Ithaca, v. 9, p. 365-444, 1979b.

KOHN, L. M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 881- 886, 1979a.

KOHN, L. M. et al. Marker stability throughout 400 days of in vitro hyphal growth in the filamentous ascomycete, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 5, p. 613- 617, 2008.

KOHN, L. M. et al. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 480- 485, 1991.

KOHN, L. M. The clonal dynamic in wild and agricultural plant pathogen populations. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1231-1240, 1995. Supplement 1.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 539- 548, 2003.

KULL, L. S. et al. Mycelial Compatibility Grouping and Aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 4, p. 325- 332, 2004.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 887- 890, 1979.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden: Blackwell, 2006.

LI, Y. B.; YONGLI, Z.; NIAN, L. B. Study on the dissemination distance of sunflower stem rot fungus. **Journal of Plant Protection Research**, Neimenggu, v. 20, p. 12- 13, 1994.

LIANG, Y.; STRELKOV, S. E.; KAV, N. N. V. The proteome of liquid sclerotial exudates from *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 6, p. 3290- 3298, 2010.

LITHOLDO JÚNIOR, C. G. et al. Genetic diversity and mycelia compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 868- 877, 2011.

LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 521 - 526, 2000.

LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 890-896, 1979.

LUMSDEN, R. D.; DOW, R. L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 708-715, 1973.

MCLEAN, D. M. Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 42, p. 663, 1958.

MERT-TÜRK, F. et al. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 3, p. 182-187, 2007.

MICHEREFF, S. J. **Doenças causam sérios prejuízos na safra de feijão em Pernambuco**. Recife: UFPE, 2011. Disponível em: <[http://www.ufrpe.br/artigo\\_ver.php?id Conteudo=1251](http://www.ufrpe.br/artigo_ver.php?id Conteudo=1251)>. Acesso em: 23 nov. 2010.

MIKLAS, P. N. et al. conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309-315, 2001.

MIKLAS, P. N. et al. Using a subsample of the core collection to identify new sources of resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 569-573, 1999.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; RILEY, R. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 4, p. 564- 570, 2003.

MYLCHREEST, S. J.; WHEELER, B. E. J. A method for inducing apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology: a record of current work on plant diseases and pest in British Isles**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 16- 20, 1987.

NASSER, L. C. B.; SUTTON, J. C. Palhada de arroz pode controlar doenças do feijoeiro irrigado. **Revista pesquisa e tecnologia FEI**, São Bernardo do Campo, v. 3, p.1- 6, 1995.

NELSON, B. D.; HELMS, T. C.; OLSON, M. A. Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 662-665, 1991.

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

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual report of the Bean Improvement Cooperative**, Fot Collins, v. 39, p. 142- 143, 1996.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Comparative Pathogenicity of Isolates of *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* on Alfalfa Cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 474- 477, 1995.

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

RIMMER, S. R.; MENZIES, J. G. Influence of host seedling exudates on germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 6., 1983, Paris. **Proceedings...** Paris: WPL, 1983. v. 2, p. 951-956.

ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), com *Trichoderma koningii*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, p. 180-183, 1998.

ROLF, J. F. **NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multi-variate analysis system**: version 2.1, Exeter Software. New York: Setauket, 2000.

ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. B. Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2539-2544, 1998.



ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 75- 81, 2001.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis, user manual ver 2.000. Geneva: University of Geneva, 2000.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 383-388, 1978.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, New York, v. 46, n. 6, p. 357- 365, 2004.

SILVA, A. P.; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology: a record of current work on plant diseases and pest in British Isles**, Oxford, v. 58, p. 487-496, 2009.

SILVA, K. J. D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 88 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SIRJUSINGH, C.; KOHN, L. M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 267-269, 2001.

SOULE, M. et al. Comparative QTL map for white mold resistance in Common Bean, and Characterization of Partial Resistance in Dry Bean Lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, p. 123- 139, 2011.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 12, p. 1287-1293, 2000.

TARIQ, V. N.; JEFFRIES, P. Appressorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum*: Scanning electron microscopy. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 82, n. 4, p. 645- 651, 1984.

TOWNSEND, B. B.; WILLETTS, H. J. The development of sclerotia in certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 37, n. 3, p. 213-221, 1954.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

WEGULO, S. N. et al. Spread of *Sclerotinia* stem rot of soybean from area and point sources of apothecial inoculum. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 80, n. 2, p. 389-402, 2000.

WHIPPS, J. M. et al. A glasshouse cropping method for screening lettuce lines for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 3, p. 373-378, 2002.

WILLETTS, H. J.; WONG, J. A. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, Bronx, v. 46, n. 2, p. 101-165, 1980.

ZHAO, J. et al. Evaluation of *Sclerotinia* stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. **Plant Diseases**, Saint Paul, v. 88, n. 9, p. 1033-1039, 2004.

ZHAO, J.; MENG, J. Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 106, n. 4, p. 759-764, 2003.