



KÁTIA REGINA DE ANDRADE CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS AO
FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG
2022**

KÁTIA REGINA DE ANDRADE CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADAS AO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, com área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Campos, Kátia Regina de Andrade.

Caracterização molecular e morfológica de isolados de
Colletotrichum spp. associados ao feijoeiro. / Kátia Regina de
Andrade Campos. - 2022.

51 p.: il.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Marcadores Rep-PCR. 2. *Switching*. 3. *Colletotrichum
spp.* I. de Souza, Elaine Aparecida. II. Título.

KÁTIA REGINA DE ANDRADE CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADAS AO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, com área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 30 de junho de 2022
Dr^a Fernanda Aparecida Castro Pereira
Dr^a Maria Cristina Mendes Costa

Prof^a. Dr^a. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS-MG
2022**

À minha família,
por todo o amor,
carinho, compreensão e confiança.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa quero deixar presente nestas palavras o meu mais profundo agradecimento àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho; Em primeiro lugar quero agradecer a Deus porque sem ele não teria traçado meu caminho até aqui;

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Genética e Melhoramento de plantas pela oportunidade de realizar este curso;

À minha orientadora Elaine Aparecida Souza pela oportunidade, confiança, orientação, compreensão, paciência, e principalmente pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas e atenção sempre em todos os momentos durante o período do curso;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas que contribuíram agregando conhecimento e experiência ao longo do mestrado.

A minha colega de curso Mariana Andrade, quero agradecer de forma especial, pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos e pelas sugestões na conclusão deste trabalho;

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a quem quero agradecer a concessão de bolsa.

À minha família, em especial minha mãe, Maria dos Milagres pelo amor incondicional, pela compreensão em todos os momentos, força e apoio de sempre; Ao meu pai, Antônio Campos que Deus chamou para perto dele, mas deve estar me abençoando de onde ele estiver;

Às minhas amadas irmãs Carina, Karilia, Karla e Mary pela amizade e por me apoiarem sempre;

Á todos do Laboratório de Resistência de Plantas a doenças, em especial ao Miller e Rafael por me auxiliar sempre em todas as etapas de meu aprendizado, a Fernanda Castro, pela colaboração, sugestões, apoio e amizade de sempre;

Uma palavra especial, aos meus colegas de turma Alessandra Riviera, Carlos Montalvo, Marcelo Trindade, Danilo e Lorena Dubá que me acompanharam ao longo da minha caminhada, pelos ensinamentos transmitidos, pelo constante incentivo e amizade de sempre e por terem tornado meus dias mais felizes ao longo de nossa trajetória;

Finalmente, quero agradecer a este trabalho por ter crescido com ele, e porque gostei de aprender o que ele me ensinou.

RESUMO

No feijoeiro comum, o gênero *Colletotrichum* está entre os fitopatógenos economicamente importantes para a cultura. Várias espécies de *Colletotrichum* têm sido isoladas do feijoeiro. A técnica molecular de Rep-PCR vem sendo utilizada como alternativa na identificação de fitopatógenos e em estudos de variabilidade genética pela obtenção de *fingerprint* e pode ser uma alternativa promissora na diferenciação de fungos do gênero *Colletotrichum*. Portanto, o objetivo deste trabalho é caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp do feijoeiro por meio de da técnica de Rep-PCR e verificar a ocorrência de "switching" de colônias minus e plus. Foram utilizados isolados de *C. lindemuthianum*, *C. sojae*, *C. karstii* e *C. plurivorum*. A análise molecular foi realizada pela técnica Rep-PCR utilizando primers BOX, ERIC e REP, para obtenção de *fingerprint*. A caracterização morfológica foi realizada quanto ao tipo de colônia. Foi realizado o teste de compatibilidade sexual entre os isolados. Todos os primers utilizados neste estudo foram capazes de amplificar o DNA genômico e gerar perfis de banda com reprodutibilidade para todos os isolados testados. O marcador BOX revelou uma quantidade de polimorfismo muito baixa, o que impossibilitou a diferenciação das espécies por meio deste marcador. O marcador ERIC gerou polimorfismo, mas em uma quantidade também insuficiente para configurar a diferenciação eficiente dessas espécies. Levando-se em consideração as espécies em estudo, apenas o marcador REP foi capaz de detectar polimorfismo interespecífico e que apresentaram melhor resultado. Na análise de compatibilidade sexual, somente as combinações UFLA 13-1A x UFLA13-2A e UFLA13-1A x UFLA15-5 promoveram a formação de peritécios com ascos e ascósporos na linha de contato entre as colônias, sugerindo compatibilidade sexual. As progênies oriundas do cruzamento entre UFLA13-1A e UFLA13-2A na análise molecular, confirmaram os dados da análise individual de cada genitor, ou seja, ambos os genitores apresentaram o mesmo perfil para todos os marcadores utilizados. Portanto, estes marcadores não são adequados para verificar a ocorrência de cruzamento entre estes isolados. No entanto, o primer REP reproduziu um padrão de banda nas progênies de ambos os genitores (UFLA 13-1A e UFLA 15-5) as quais estão presentes em todas as progênies evidenciando a ocorrência de cruzamento entre estes isolados. A técnica utilizando o primer REP permitiu a diferenciação entre os isolados avaliados e evidenciou a ocorrência de cruzamento. A presença de colônias periteciais Plus e Minus, e conidiais evidencia a ocorrência de mudança de plus para minus no isolado UFLA 13-A1 em monocultivo e em cruzamento com UFLA15-5.

Palavras-chave: Marcadores Rep-PCR. *Colletotrichum*. "Switching

ABSTRACT

In common bean, the genus *Colletotrichum* is among the economically important phytopathogen groups for the crop. Several species of *Colletotrichum* have been isolated from common bean. Molecular techniques have been used as an alternative in the identification of phytopathogens. The REP PCR technique has been used in studies of genetic variability by obtaining fingerprints for fungi and may be a promising alternative in the differentiation of fungi of the genus *Colletotrichum*. The objective of this work is to characterize *Colletotrichum* spp isolates from common bean using Rep-PCR markers and to verify the occurrence of "switching" of minus and plus colonies. Isolates of *C. lindemuthianum*, *C. soyae*, *C. karstii* and *C. plurivorum* were used. Molecular analysis was performed using the Rep-PCR technique using BOX, ERIC and REP primers to obtain a fingerprint. The morphological characterization was carried out regarding the type of colony. The sexual compatibility test between the isolates was performed. All primers used in this study were able to amplify genomic DNA and generate band profiles with reproducibility for all isolates tested. The BOX marker revealed a very low amount of polymorphism, which made it impossible to differentiate the species using this marker. The ERIC marker generated polymorphism, but in an amount that was also insufficient to configure the efficient differentiation of these species. Taking into account the species under study, it can be observed that only the REP marker was able to detect interspecific polymorphism and that they presented better results. In the analysis of sexual compatibility, only the combinations UFLA 13-1A x UFLA13-2A and UFLA13-1A x UFLA15-5 promoted the formation of perithecia with asci and ascospores in the contact line between the colonies, suggesting sexual compatibility. The progenies from the cross between UFLA13-1A and UFLA13-2A in the molecular analysis, confirmed the data of the individual analysis of each parent, that is, both parents showed the same profile for all the markers used. Therefore, these markers are not suitable for verifying the occurrence of outcrossing between these isolates. However, the REP primer reproduced a band pattern in the progenies of both parents, for the contact line formed between UFLA 13-1A and UFLA 15-5, which are present in all progenies, evidencing the occurrence of crossing between these isolates. The technique using the REP primer allowed the differentiation between the evaluated isolates and evidenced the occurrence of crossing. The presence of plus and minus peritietal colonies, and conidials evidence the occurrence of a change from plus to minus in the UFLA 13-A1 isolate in monoculture and in crosses with UFLA15-5.

Keywords: Rep-PCR markers. *Colletotrichum*. "Switching"

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Antracnose do feijoeiro-comum	10
2.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>. no feijoeiro	12
2.3 Reprodução sexual em <i>Colletotrichum</i>	14
2.4 Marcadores Moleculares na avaliação da diversidade genética	16
2.5 Rep-PCR (“Repetitive sequence based-PCR”)	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local dos experimentos	19
3.2 Origem dos isolados	19
3.3 Caracterização Molecular por rep-PCR	20
3.3.1 Extração de DNA	20
3.3.2 Reações de PCR e eletroforese	21
3.3.3 Análise dos dados	21
3.4 Caracterização morfológica das colônias	21
3.5 Teste de compatibilidade sexual	22
4. RESULTADOS	22
4.1 Caracterização Molecular	22
4.2 Teste de compatibilidade sexual	27
4.3 Caracterização morfológica das colônias	29
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um componente fundamental na dieta da população e possui importância econômica. A produção brasileira em 2021 chegou ao patamar de 2.856,1 mil toneladas, com produtividade média no ano de 2021 de 977 kg/ha (CONAB, 2021).

No feijoeiro comum, o gênero *Colletotrichum* está entre os fitopatógenos economicamente importantes para a cultura, capaz de reduzir significativamente a produtividade de grãos (BAILEY; JEGER, 1992; FREEMAN et al., 1998; SUTTON et al., 1980). O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Briosi et cavara é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum capaz de infectar folhas, caules, ramos, vagens e sementes, podendo causar até a morte da planta em ambiente favorável para o desenvolvimento do patógeno, como elevada umidade e temperaturas amenas (QUEIROZ et al., 2017).

Recentemente em áreas produtoras do estado de Minas Gerais, tem se observado a presença tanto da fase assexuada quanto sexuada do gênero *Colletotrichum* spp. em plantas de feijoeiro (BARCELOS et al., 2014; DIAS, 2017; MOTA et al., 2016). Após isolamentos feitos em lesões de antracnose, os isolados obtidos foram submetidos às caracterizações morfológica, patogênica, molecular e filogenética (BARCELOS et al., 2014; DIAS, 2017; MARTINS, 2019; MOTA et al., 2016; PEREIRA, 2019). Os dados obtidos nestes estudos chamam a atenção para a ocorrência de diferentes espécies associadas as lesões de antracnose no feijoeiro.

A caracterização do agente causal da antracnose no feijoeiro, assim como em outras doenças baseava-se apenas em observações de características morfológicas e patogênicas (BARCELOS et al., 2014; DIAS, 2017; MARTINS, 2019). Porém, essa caracterização dificulta a diferenciação devido a similaridade morfológica encontrada entre as espécies do gênero *Colletotrichum* (WEIR et al., 2012; DAMM et al. 2012). Técnicas moleculares vem sendo utilizadas como alternativa na identificação precisa de fitopatógenos. O sequenciamento de regiões do genoma tem permitido essa identificação para diferentes espécies (WEIR et al.2012; DAMM et al. 2012). Espécies associadas a antracnose do feijoeiro tem sido identificadas por Pereira (2019), que utilizou filogenia baseada em três genes actina, β -tubulina e GAPDH para identificar as espécies que causam antracnose no feijoeiro. Essa análise permitiu identificar cinco espécies diferentes: *C. lindemuthianum*, *C. feijoicola*, *C. plurivorum*, *C. sojae* e *C. karstii* coabitando as lesões de antracnose. No entanto, quando se

utiliza um grande número de isolados o sequenciamento torna-se inviável, em função do seu alto custo e elevado tempo para obtenção dos dados. Dessa forma, técnicas alternativas que permitam a diferenciação rápida dos isolados devem ser testadas. Além disso, informações sobre a variabilidade genética de fungos são importantes e possui implicações diretas no manejo de doenças, bem como em programas de melhoramento visando resistência a doenças (VERSALOVIC et al., 1991; CORDERO et al. 2012; ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; WANG et al., 2017).

As linhagens de espécies de *Colletotrichum* podem ser classificadas quanto ao tipo de colônias em conidiais e periteciais. As colônias periteciais podem ser classificadas em Plus e Minus de acordo com Chilton e Wheeler (1949). A primeira descrição desta classificação de colônia foi realizada por Edgerton (1914). Em seus estudos o autor, caracterizou dois tipos de isolados autoférteis, “plus” e “minus”. Isolados do tipo “plus” formam massas aglomeradas de peritécios férteis e isolados “minus” produzem peritécios espalhados por toda a superfície da colônia, sendo estes últimos menos férteis. Quando certas combinações são realizadas, ocorre a formação de uma linha de contato visível de peritécios férteis desenvolvida no local onde as duas culturas entram em contato, indicando a presença de cruzamento. Esses cruzamentos, podem ocorrer tanto entre isolados periteciais quanto entre isolados conidiais quando combinadas com linhagens periteciais.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp do feijoeiro por meio de marcadores Rep-PCR e verificar a ocorrência de "switching" de colônias minus e plus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antracnose do feijoeiro-comum

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma doença de importância econômica para o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Pois está entre as doenças que contribuem para a redução na produtividade da cultura, registrando perdas de até 100% (PERSEGUINI et al., 2016). O primeiro relato da antracnose em feijoeiro ocorreu em 1878 por Saccardo e Magnus (AUGUSTIN et al., 1971). Na época o agente etiológico da doença foi descrito como *Gloeosporium lindemuthianum*. Posteriormente, Scribener em 1889 propôs uma nova classificação para o gênero o qual foi denominado de *Colletotrichum*. Após esse fato o agente causal da antracnose foi nomeado de *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

C. lindemuthianum é um fungo filamentosos, de comportamento hemibiotrófico onde os conídios germinam na superfície do hospedeiro e o tubo germinativo se diferencia em uma estrutura de penetração especializada conhecida como apressório. O apressório melanizado produz alta pressão de turgor para penetrar diretamente na superfície do hospedeiro. Um peg de infecção emerge do apressório e depois o fungo forma vesículas de infecção e hifas primárias (biotrofia). Hifas biotróficas espalha-se para algumas células adjacentes e então o fungo muda a necrotrofia pela produção de hifas secundárias (FERREIRA et al., 2013).

Conhecido por sua capacidade de sobrevivência em restos de cultura e no interior das sementes na forma de micélio (SILVA et al., 2020). A disseminação do patógeno ocorre por meio de sementes contaminadas, água da chuva ou irrigação. O homem também é considerado agente de disseminação, por meio da operação de máquinas agrícolas contendo resíduos de culturas e sementes contaminadas (VIEIRA et al., 1993).

A infecção é favorecida por condições de clima úmido e temperaturas amenas entre 13°C e 26°C (WENDLAND et al., 2018). Porém, o patógeno tem seu crescimento limitado em temperaturas acima de 30 °C e abaixo de 13 °C (CHAVES, et al. 1980; KELLY et al., 1994). Em ambiente favorável a manifestação da doença ocorre de 6 a 9 horas após a germinação de conídios. A observação dos sintomas só é possível a partir de seis dias após o início da infecção (PASTOR CORRALES; TU, 1989).

O sintoma típico da antracnose é o aparecimento de áreas necrosadas nas nervuras, essas lesões são de aspecto alongado, apresentando coloração avermelhada ou marrom-escuro ocorrendo geralmente na parte abaxial das folhas e algumas vezes na parte adaxial. Os sintomas podem ocorrer também nas vagens, nas quais são caracterizadas por lesões deprimidas, circulares com bordos mais escuros que o centro e apresentando coloração acinzentada ou rosada. As vagens quando infectadas podem apresentar enrugamento e encurtamento. Em sementes infectadas ocorre descoloração e formação de lesões escuras no tegumento e nos cotilédones (WENDLAND et al., 2018).

Entre os principais métodos de controle da doença estão o controle químico e o uso de cultivares resistentes. No entanto, o controle químico favorece a contaminação ambiental e humana, sendo o controle por meio de cultivares resistentes o método mais prático e econômico. Porém, a resistência das plantas em cultivares pode ser superada por diferentes patógenos, principalmente quando o patógeno apresenta alta variabilidade. O gênero *Colletotrichum*, é conhecido por sua alta variabilidade genética, tanto entre, quanto dentro da mesma espécie (MOTA et al., 2016, COSTA et al. 2017; SILVA et al., 2020), sendo um dos

principais fatores complicadores do manejo da doença, pois afeta a longevidade de uma cultivar resistente (SHARMA et al., 2019).

Nos programas de melhoramento genético do feijoeiro o uso de marcadores moleculares vem sendo uma ferramenta auxiliar para obtenção de cultivares resistentes. Essas ferramentas moleculares ajudam a elucidar os eventos relacionados a evolução, domesticação e variabilidade genética, o que não é possível de responder apenas por meio de análises fenotípicas, sendo este um método potencial para a melhor compreensão desta variabilidade, agregando simplicidade, eficiência e baixo custo (ASSEFA et al., 2019).

2.2 *Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro

O gênero *Colletotrichum* infecta diversas espécies de plantas, causando em sua maioria, a doença conhecida como antracnose. Segundo Dean et al. (2012), este grupo foi classificado como o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos de plantas, sendo, portanto, sempre necessários estudos acerca do gênero.

C. lindemuthianum é conhecido como organismo de grande importância econômica do gênero *Colletotrichum*, estando associado a antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (SOUZA et al., 2007) e a soja (*Glycine max* L. Merrill) (TAMIN; URAIHA, 2019). O fungo pertence à classe dos Ascomycetes, ordem Diaportales (BAILEY; JEGER, 1992). O patógeno em sua fase sexual é capaz de originar peritécios (corpos de frutificação), contendo ascos dentro dos quais são formados os ascósporos (KIMATI; GALLI, 1970).

Os peritécios possuem formato arredondado e hialino, sendo que posteriormente a parede peritecinal assume uma coloração escura a partir do ápice. Os ascos, medem 60 x 6µm, com o comprimento variando de 48 a 68µm e são envolvidos por paráfises (filamentos estéreis dos corpos de frutificação) filiformes e delicadas, que desaparecem a partir de 270 dias. Os ascos são encontrados em duas formas: alantoides (20 x 6,5µm) e elipsoidais (10 x 4µm). Cada asco contém de 1 a 8 ascósporos alantoides ou 8 ascósporos elipsoidais (BAILEY; JEGER, 1992; ROCA et al., 2003).

A reprodução de linhagens sexuais do gênero *Colletotrichum* pode ser classificada em homotálica (autofértil) ou heterotálica (autoestéril) (VAILLANCOURT et al. 2000). Os indivíduos classificados como homotálicos possuem a capacidade de se reproduzirem sem a necessidade de um parceiro, dessa forma, a reprodução sexual é realizada sem que ocorra diferenciação genética dos descendentes em relação ao genitor. Já os indivíduos classificados como heterotálicas possuem a capacidade de reproduzirem somente com a presença de outro

indivíduo (CISAR; TEBEEST, 1999; KRONSTAD; STABEN, 1997). Para a fase sexual, dentro de uma mesma espécie, pode haver linhagens: auto-fértil e de fertilização cruzada, enquanto outros, são de fertilização cruzada e autoestéril. Além disso pode ocorrer também uma linhagem autofértil que poderá originar progênie autoestéril, com frequência relativamente elevada (MENEZES, 2013)

O gênero *Colletotrichum* é conhecido pela ocorrência de variabilidade genética entre as espécies, e isso vem sendo observado com frequência em linhagens de *Colletotrichum* spp. obtidas de plantas de feijoeiro comum apresentando sintomas típicos de antracnose (BARCELOS, 2011; MOTA, 2016). Essa ocorrência de variabilidade dificulta a busca por novas fontes de resistência durável ao patógeno (BROWN, 2015). Barcelos et al. (2011) avaliaram a variabilidade genética de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* identificando grupos de compatibilidade vegetativa e analisou o polimorfismo gerado pela técnica de RAPD. Os resultados apontaram a existência de variabilidade genética entre as linhagens de uma mesma origem geográfica.

Pinto et al. (2012) realizaram a caracterização de isolados assexuais e sexuais de *Colletotrichum* spp. que coabitavam lesões de antracnose no feijoeiro. As análises foram realizadas utilizando dados de patogenicidade, morfológicos, fisiológicos, culturais e moleculares. Os autores investigaram a existência de outras espécies, além de *C. lindemuthianum*, associadas a essas lesões. Os resultados confirmaram a ocorrência de variabilidade entre os isolados, sugerindo que os isolados da forma sexual não são pertencentes a mesma espécie dos isolados da forma assexual *C. lindemuthianum*, sustentando a hipótese de que outra espécie possa estar infectando cultivares de feijoeiro comum.

Barcelos et al. (2014) desenvolveram estudos comparativos entre linhagens de *Colletotrichum* spp. provenientes de lesões de antracnose e, realizaram análises morfológicas, citológicas e moleculares conseguindo diferenciar os isolados em dois grupos. Os grupos foram denominados de *Glomerella* sp. grupo I e II, sendo que quando inoculadas, as linhagens agrupadas no grupo I, não infectaram plantas de feijoeiro comum. Além disso, este grupo não foi capaz de amplificar fragmentos específicos para a espécie de *Glomerella cingulata* f. sp *phaseoli*, utilizando os primers HMglo (BARCELOS et al., 2014). Linhagens do grupo II quando inoculadas produziram sintomatologia típica 10 dias após a inoculação, porém não amplificaram para os primers utilizados. Essa variabilidade das linhagens oriundas de lesões de antracnose, também têm sido investigadas por Mota et al. (2016) e Pereira (2019).

Mota et al. (2016) caracterizaram 22 linhagens de *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum* spp. isoladas de lesões de sarna e antracnose do feijoeiro, com o objetivo de analisar a relação entre as espécies do gênero *Colletotrichum*, a partir de dados morfológicos e moleculares. Para as análises moleculares utilizou-se os marcadores IRAP, considerando a hipótese de que a atividade de elementos transponíveis podem ser um mecanismo capaz de gerar variabilidade intra e interespecífica no gênero *Colletotrichum*. Os autores concluíram que as linhagens avaliadas apresentam variação para todas as características, corroborando com a hipótese de ocorrência de diferentes espécies em lesões de antracnose e sarna.

Pereira (2019) identificou as espécies associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro, por meio de análise filogenética multilocus, além da caracterização morfológica. Neste estudo 32 isolados do gênero *Colletotrichum* oriundas de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro foram utilizadas na análise multilocus para as regiões actina, β -tubulina e GAPDH os isolados estudados tiveram suas sequências comparadas com 28 acessos do GenBank do gênero *Colletotrichum*. Dados morfológicos das linhagens também foram utilizados para complementar a identidade das espécies estudadas. Os resultados obtidos na filogenia multilocus e análise morfológica, possibilitaram constatar que as linhagens do presente trabalho associadas ao clado de *C. lindemuthianum* são, de fato, a fase sexual de *C. lindemuthianum*. Assim, as linhagens avaliadas e associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro pertencem a um o complexo composto pelas espécies *C. lindemuthianum*, *C. sojae*, *C. karstii*, *C. plurivorum* e *C. feijoicola*.

Os isolados de *Colletotrichum* spp do feijoeiro, tanto a fase sexual quanto assexual, tem sido caracterizada principalmente por meio de caracteres morfológicos e fisiológicos. No entanto, ainda não há um marcador que consiga diferenciar de forma rápida e eficiente esses isolados, principalmente para promover os avanços nas elucidações dos mecanismos de recombinação sexual e assexual dessas linhagens. Portanto é imprescindível o conhecimento de um marcador molecular eficiente, rápido e de baixo custo que possa ser utilizado na rotina de laboratório de um programa de melhoramento.

2.3 Reprodução sexual em *Colletotrichum*

A reprodução sexual permite a geração de novas combinações de alelos em cada ciclo de recombinação, levando a um alto nível de diversidade genética na população do patógeno. Conseqüentemente, a ocorrência periódica da reprodução sexual pode explicar grande parte da variabilidade existente nas populações de *Colletotrichum* (SOUZA, 2010). Os fungos podem ser classificados quanto à reprodução sexual em homotálicos (auto-fértil, quando a

reprodução ocorre entre indivíduos com mesmo material genético ou entre duas células do mesmo indivíduo) ou ainda em heterotática (quando a espécie exige um parceiro com diferenças genéticas para realizar o acasalamento). O modo de reprodução da maioria dos ascomicetos filamentosos é controlado pelos genes “mating type” (*MAT*) (NI et al., 2011).

Nas espécies homotáticas, os isolados contêm geralmente os mesmos genes do “mating”, incluindo dois fatores transcricionais funcionalmente essenciais, o gene principal alfa do *mat1-1-1* e o gene (HMG) *mat1-2-1*. Em espécies heterotáticas, os indivíduos sexualmente compatíveis transportam uma das duas versões do locus *MAT*, *mat1-1-1* ou *mat1-2-1*. Estas duas versões do loco *MAT* são denominadas de idiomorfos, pois as sequências presentes nos mesmos locos não são homólogas. Este auto-reconhecimento determinado por dois tipos de sequências em um loco genético é também descrito como sistema de acasalamento bipolar (CHANG; STABEN, 1994).

Diferente do sistema de acasalamento típico dos ascomicetos, todas as espécies estudadas de *Colletotrichum* possuem um sistema de reconhecimento de acasalamento atípico (CROUCH et al., 2014). A mesma espécie de *Colletotrichum* pode apresentar indivíduos homotáticos e heterotáticos, e a fertilidade de cruzamentos entre diferentes isolados pode variar continuamente de completamente estéril a altamente fértil (CISAR; TEBEEST, 1999; MENAT et al., 2012; RODRIGUEZ-GUERRA, et al. 2005; VAILLANCOURT et al., 2000).

De acordo com Kimati e Gali (1970), Bryson (1990) e Rodríguez-Guerra et al. (2005), *C. lindemuthiaum* pode ser classificado como heterotático. Wheeler (1954) sugeriu um modelo desequilibrado de heterotalismo em que este seria derivado de um processo de homotalismo como resultado de mutações genéticas fora do locus *MAT*. Essas mutações localizadas em locus diferentes podem complementar-se umas às outras, possibilitando com que as espécies correspondentes se fertilizem mutuamente.

Mendes-Costa (1996) realizando pareamentos entre ascósporos de três linhagens sexuais de *C. lindemuthiaum*, oriundos do mesmo asco, observou incompatibilidade em todas as combinações possíveis. Posteriormente, Souza et al. (2010), utilizando cinco populações sexuais de *C. lindemuthianum*, também observou incompatibilidade para todos os pareamentos. Camargo-Júnior et al. (2007) também observaram incompatibilidade para a maioria dos pareamentos. Porém por meio de um cruzamento compatível foi possível verificar a presença de linhagens recombinantes, utilizando a técnica molecular de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (Randomly amplified polymorphic DNA - RAPD). Estas linhagens apresentaram morfologia e comportamento sexuais contrastantes, visto que algumas

possuíam comportamento homotálico e outras, heterotálico (CAMARGO-JÚNIOR et al., 2007).

Barcelos et al. (2014) observaram que linhagens sexuais de *Colletotrichum* oriundas de lesões de antracnose no feijoeiro possuíam alta tendência a perda de fertilidade. Os autores também observaram que a presença de compatibilidade sexual ocorria apenas quando o pareamento era realizado utilizando linhagem fértil. Esta complementação seria devido a substâncias oriundas das linhagens férteis (WHEELER, 1956). Além disso, existem estudos que indicam que hormônios específicos são capazes de induzir a autofertilidade (DRIVER; WHEELER, 1955; GARCIA-SERRANO, 2008; LIANG et al., 2021).

Liang et al. (2021) observaram em *Colletotrichum fruticola* um fenômeno que consiste na mudança geneticamente estável de colônias periteciais do tipo minus para plus e demonstraram a presença de peritécios formados na linha de contato como auto-fertilizados. Segundo o autor, a linha de cruzamento é composta de peritécios férteis e abundantes com ascósporos bem desenvolvidos de três tipos: o primeiro tipo são ascos com ascósporos do tipo plus, ocorrendo raramente, o segundo tipo são ascos com ascósporos que geram colônias plus e minus com segregação de 4:4, estes ocorrem em alta frequência e um terceiro tipo que consiste em ascos com ascósporos do tipo minus que ocorrem em alta frequência. A troca de Plus para Minus em *C. fruticola* relatada neste estudo difere do tipo de acasalamento unidirectional mating type switching em vários aspectos: importante citar.

- (i) both plus strains and minus strains derived from plus strains are self-fertile, although at low efficiency in the latter.
- (ii) plus-to-minus switching facilitates sexual reproduction by boosting both cross-fertilization and self-fertilization, whereas unidirectional mating type switching boosts outcrossing only;
- (iii) plus-to-minus switching involves no DNA change at the mating type locus (discussed below), implying a novel regulatory mechanism.

2.4 Marcadores Moleculares na avaliação da diversidade genética

A biologia molecular tem oferecido ferramentas importantes para geneticistas e epidemiologistas observarem alterações na composição e organização das populações (VENTER et al., 2001). A utilização de marcadores moleculares tem contribuído positivamente nas atividades dos programas de melhoramento de plantas nas duas últimas décadas (MOOSE; MUMM, 2008). Muitos marcadores foram desenvolvidos e aplicados para aperfeiçoar práticas como a seleção de genitores em programas de melhoramento genético

(RANDHAWA et al. 2013; GROVER; SHARMA, 2016) e compreensão da estrutura populacional de *Colletotrichum* que causam a antracnose no feijoeiro (BHAT et al., 2018).

Atualmente, há uma intensificação na utilização de técnicas de genética molecular para solucionar problemas e, ampliar os benefícios gerados para o uso dos recursos genéticos vegetais. Porém, é necessário adotar alguns cuidados para a escolha de um determinado marcador. Pois esta deve ser baseada nos questionamentos que serão abordados; na quantidade de DNA disponível para o experimento; nos conhecimentos técnicos do pesquisador. Além disso, é fundamental considerar a disponibilidade de recursos financeiros e equipamentos disponíveis em cada instituição (GROVER; SHARMA, 2016).

Os constantes avanços tornam possíveis informações relacionadas a estrutura genética, e posteriormente a construção de mapas genéticos para gerar informações completas sobre diversidade, filogenia e evolução, o que vem contribuindo bastante para o sucesso nos programas de melhoramento de plantas (NADEEM et al., 2017).

O uso de marcadores possibilita algumas vantagens, como a quantidade quase ilimitada de polimorfismos genéticos; identificação direta sem influência do ambiente; detecção em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de culturas de células ou tecidos; além de originar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores codominantes (COSTA et al., 2012).

Para o estudo da diversidade genética características importantes têm sido analisadas com sucesso por diversos autores, para diferentes tipos de parâmetros agrônômicos e morfológicos no gênero *Colletotrichum*. Rampersad et al. (2014) analisaram linhagens do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* a fim de confirmar a existência de variabilidade dentro deste complexo, por meio do uso de marcadores do tipo GAPDH, ACT, TUB2 e ITS. Os resultados obtidos apontaram diferenciação intra e interespecífica, o que comprova a eficiência dos marcadores utilizados na avaliação das espécies estudadas.

Silveira et al. (2016) estudando as espécies *C. acuatatum* e *C. gloeosporioides*, associadas a podridão floral dos citrus comprovaram a presença de variabilidade entre os isolados estudadas, com o uso de marcadores do tipo ISSR. Vieira et al. (2019) avaliaram o desempenho de um conjunto de marcadores utilizados na caracterização e taxonomia de *Colletotrichum*. Os resultados permitiram a classificação dos marcadores analisados em dois grupos distintos, ou seja, marcadores de baixo sinal filogenético (ACT), (CH3-1) e (nrITS) e os marcadores de forte sinal filogenético (HIS3), (APN2) e (MAT1-2-1), (GAPDH). Entre todas as regiões estudadas, GAPDH foi eleita como um bom marcador para estudos iniciais de

diversidade. Este tipo de estudo é importante para uma melhor compreensão da diversidade genética entre as espécies.

2.5 Rep-PCR (“Repetitive sequence based-PCR”)

A técnica de rep-PCR consiste na obtenção de um perfil genético a partir da amplificação de regiões altamente conservadas e repetidas do DNA (DAS et al., 2014). Existem três tipos de sequências repetitivas: As sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) composta por 35 a 40 pb (STERN et al., 1984); as sequências ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) com 124 a 127 pb (HULTON et al., 1991); e o elemento BOX com 154 pb (MARTIN et al., 1992).

O rep-PCR vem sendo amplamente aplicada em estudos de diversidade genética e obtenção de *fingerprint* para bactérias (VERSALOVIC et al., 1991; CORDERO et al. 2012; MULLIS et al. 2013; ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; WANG et al., 2017). Apesar do método ter sido criado para análises de diversidade em genomas bacterianos a técnica vem sendo aplicada com eficiência na detecção de variabilidade entre diversas espécies de fungos (PALENCIA et al., 2009; MEHTA; MEHTA, 2010; ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014).

Para fungos pertencentes a um complexo de espécies, o rep-PCR tem a capacidade de diferenciação rápida e precisa. Abdollahzadeh e Zolfaghari, (2014) realizaram a identificação de espécies de *Botryosphaeriaceae*, utilizando rep-PCR como ferramenta molecular, onde foram utilizados *primers* para regiões BOX, ERIC e REP.

O método pode ser realizado com DNA obtido a partir de colônias e a amplificação realizada com apenas um iniciador, ou um conjunto de iniciadores REP, ERIC e BOX, os quais proporcionam um eficiente padrão de diferenciação como relatado por Suzuki et al. (2010). Os autores utilizaram a técnica para identificar diferenças genéticas entre isolados de *C. gloeosporioides* com base em seus polimorfismos.

Karimi et al. (2019) utilizaram a Rep-PCR na validação da identidade de isolados de *Colletotrichum* spp. As análises produziram *fingerprint* de DNA específicas para as espécies estudadas. Além disso, o marcador rep-PCR foi utilizado para evidenciar a posição taxonômica precisa do agente etiológico da antracnose em morango.

Mais recentemente, Karimi et al. (2020) encontraram um segmento genômico específico que identifica *Colletotrichum nymphaeae*. O amplicon gerado foi extraído, purificado e um *primer* específico foi desenhado para diferenciar a espécie *C. nymphaeae* de outras espécies que coabitam lesões de antracnose em morango. No estudo os autores

concluíram que os *primers* desenhados a partir da diferenciação realizada por rep-PCR foram eficientes na identificação do agente etiológico da antracnose em morango.

Existe uma ampla variabilidade entre as espécies de diferentes patossistemas, revelando a necessidade de metodologias que possibilitem a orientação para uma identificação mais rigorosa e que proporcione um menor custo, associados a procedimentos mais simples de serem executados em um tempo também menor (WANG et al., 2017). Portanto, estudos com o objetivo de desenvolver técnicas que proporcionem um melhor entendimento da complexa variabilidade genética entre as espécies de *Colletotrichum*, causadoras da antracnose no feijoeiro, são essenciais para auxiliar de forma prática e eficiente na rotina dos laboratórios quanto a diferenciação dessas espécies. Além disso promover avanços nos trabalhos de obtenção de fontes de resistência durável ao patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas e no Laboratório de Genética Molecular no Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Origem dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum* avaliados neste estudo pertencem a micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas, localizado no Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras. Todos os isolados foram obtidos a partir de lesões de antracnose em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivadas em áreas produtoras do estado de Minas Gerais (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies e tipo de colônia de isolados de *Colletotrichum* spp.

ID	Isolados	Espécies	Tipo de Colônia
1	UFLA 7-1	<i>C.lindemuthianum</i>	Conidial
2	UFLA 20-1	<i>C.lindemuthianum</i>	Conidial
3	UFLA 21-3	<i>C.lindemuthianum</i>	Conidial
4	UFLA 84-1	<i>C.lindemuthianum</i>	Minus
5	UFLA 5-1	<i>C.lindemuthianum</i>	Conidial
6	UFLA 23-1	<i>C.sojae</i>	Conidial
7	UFLA LV 44	<i>C.sojae</i>	Conidial
8	UFLA LV 232	<i>C.sojae</i>	Conidial
9	UFLA LV 238	<i>C.sojae</i>	Conidial
10	UFLA 13-2A	<i>C.sojae</i>	Plus
11	UFLA 51-2	<i>C.sojae</i>	Conidial
12	UFLA 13-1A	<i>C.sojae</i>	Plus
13	UFLA 38-3A	<i>C.karstii</i>	Minus
14	UFLA 9A	<i>C.karstii</i>	Plus
15	UFLA 15-5	<i>C.plurivorum</i>	Conidial

Legenda: ID, número identificador do isolado.

3.3 Caracterização Molecular por rep-PCR

3.3.1 Extração de DNA

Para a obtenção da massa micelial, pequenos discos de micélio de cada linhagem foram transferidos para erlenmeyers contendo aproximadamente 125 mL de meio M3 líquido. Os frascos foram mantidos a 22 °C em incubadora com agitação constante de 110 rpm/min por cerca de 2 a 3 dias. A umidade do micélio foi reduzida utilizando membrana Miracloth, em seguida armazenado a -20 °C. O DNA foi extraído conforme as instruções do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification (Promega). A qualidade do DNA foi avaliada por meio de gel de agarose 0,8%. A quantificação do DNA de cada amostra foi realizada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, o DNA foi diluído para a concentração de 50 ng μL^{-1} e as amostras armazenadas a -80 °C.

3.3.2 Reações de PCR e eletroforese

A análise de rep-PCR foi realizada utilizando os conjuntos de primers BOXA1R, ERIC1 / ERIC2 e REP1R / REP2I (VERSALOVIC et al., 1994). As amplificações foram realizadas por meio da PCR, sendo que as reações foram ajustadas para um volume de 25 μL contendo 1 μL de cada primer (2,5 μM), 5 μL de 5x FIREPol Master Mix (Solis Biodyne), 1 μL de DNA molde a uma concentração de 50 ng/ μL de DNA genômico e o restante da reação foi completada com água. A amplificação dos fragmentos foi realizada de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento 51 °C por 1 minuto, extensão pela taq polimerase a 65 °C por 8 minutos e extensão final a 65 °C por 8 minutos.

Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese de 8 μl de cada amostra, em gel de agarose 1%, preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x e corado com brometo de etídio (20 mg/mL), durante 3 horas a 90 volts. Um marcador DNA Ladder 1 kb foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Posteriormente, as bandas formadas foram fotodocumentadas.

3.3.3 Análise dos dados

Os perfis de banda obtidos por meio da rep-PCR foram visualmente observados e os fragmentos amplificados de forma consistente foram pontuados quanto à presença (1) ou ausência (0). A reprodutibilidade do perfil de bandas do DNA foi testada por repetição da PCR com cada um dos *primers* utilizados. Somente bandas com reprodutibilidade foram consideradas para a análise. Produtos de amplificação fracos e instáveis em duas PCRs independentes não foram incluídos.

Os dados obtidos na caracterização molecular foram submetidos à análise de agrupamento com base nos padrões de banda de rep-PCR produzidas por cada um dos conjuntos de *primers* individualmente. Agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) (SCHNEIDER et al., 2000) com base no coeficiente de similaridade de Jacard, foi realizado utilizando o programa NTSYS – pc 2.1 (ROHLF, 2000).

3.4 Caracterização morfológica das colônias

Para a avaliação da morfologia das colônias, cada isolado foi cultivado em placas de petri contendo meio M3, estas foram incubadas em BOD por 15 dias a 23 °C no escuro. Após esse período as colônias foram avaliadas de acordo com classificação proposta por Chilton e

Wheeler (1949), na qual os isolados foram agrupados em três classes distintas: conidial, minus e plus. Onde: conidial: são aqueles isolados não periteciais que apresentam produção de conídios; minus: os isolados periteciais com produção de peritécios espalhados; e plus: são os isolados periteciais com produção de peritécios em grumos.

3.5 Teste de compatibilidade sexual

Os isolados foram confrontados dois a dois em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura M3. As placas foram incubadas por 21 dias a 23 °C. Após esse período, foi realizada a observação para detecção da formação de uma linha de contato de coloração mais escura entre os isolados caracterizando a ocorrência de cruzamento. As colônias foram examinadas ao microscópio (Leica AC 2000), para análise de presença ou ausência de peritécios com ascos férteis. Após a confirmação da presença de ascos e ascósporos, os peritécios foram submetidos a maceração e observados ao microscópio.

A partir dos peritécios resultantes dos cruzamentos foram obtidas as culturas monoascospóricas por meio de micromanipulação de acordo com a metodologia descrita por Mendes-Costa (2002, comunicação pessoal). Os ascos capturados foram transferidos para pequenos pedaços de ágar previamente estéreis e posteriormente, estourados com o auxílio de uma agulha, cada ascósporo foi transferido individualmente para placas contendo meio M3 e incubadas em BOD por 21 dias. As culturas monoascospóricas obtidas foram caracterizadas quanto a morfologia de colônia. Além disso, foi realizada a caracterização molecular das progênes, provenientes dos cruzamentos, pelos marcadores rep PCR de acordo com a metodologia descrita nos itens anteriores.

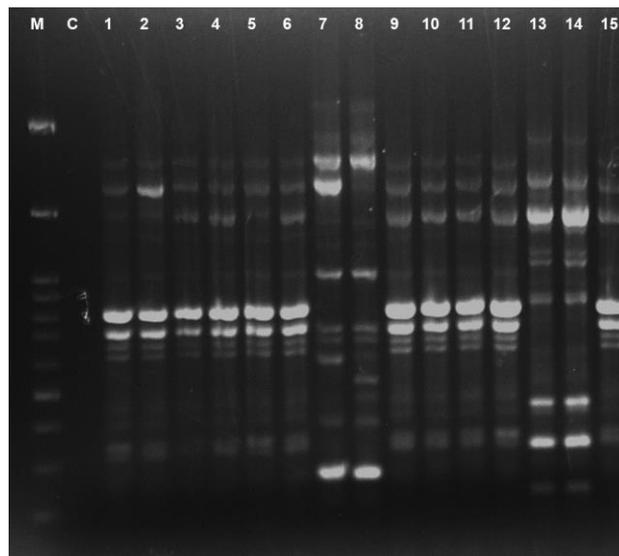
4. RESULTADOS

4.1 Caracterização Molecular

Todos os primers utilizados neste estudo (ERIC, REP e BOX) foram capazes de amplificar o DNA genômico e gerar perfis de banda com reprodutibilidade para todos os isolados testados (FIGURAS 1, 2 e 3). Os primers ERIC, REP e BOX, geraram 16, 17 e 7 bandas de DNA, respectivamente. Essas bandas variaram de 100 a 1000 pb.

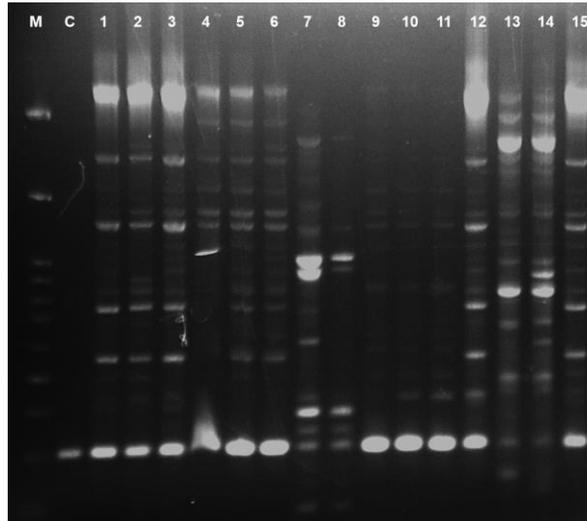
A avaliação de reprodutibilidade da técnica foi realizada através da repetição das reações com o objetivo de observar a persistência dos padrões de bandas apresentados inicialmente. Em ambas as reações com todos os primers, para todos os isolados testados, as bandas apresentaram mesmo padrão.

Figura 1 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer ERIC para os isolados de *Colletotrichum*: 1) UFLA 7-1, 2) UFLA 20-1, 3)UFLA 21-3, 4) UFLA 84-1, 5) UFLA 5-1, 6) UFLA 23-1, 7) UFLA LV 44, 8) UFLA LV 232, 9)UFLA LV 238, 10) UFLA13-A, 11) UFLA 51-2, 12) UFLA 13-1A, 13) UFLA 38-3A, 14) UFLA 9A, 15) UFLA 15-5, M) marcador, C) controle.



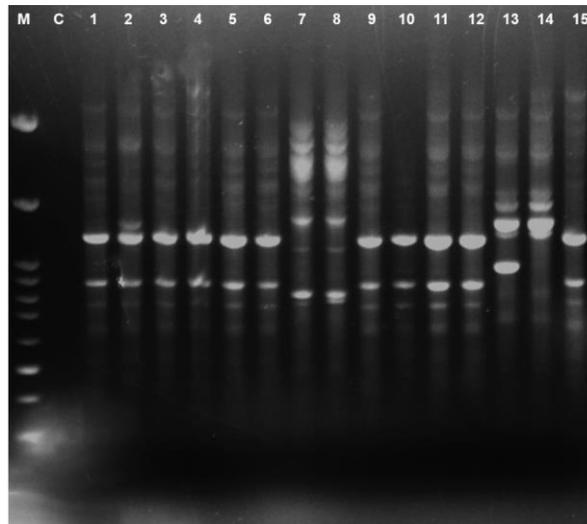
Fonte: Da autora (2022)

Figura 2 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer REP para os isolados de *Colletotrichum*: 1) UFLA 7-1, 2) UFLA 20-1, 3)UFLA 21-3, 4) UFLA 84-1, 5) UFLA 5-1, 6) UFLA 23-1, 7) UFLA LV 44, 8) UFLA LV 232, 9)UFLA LV 238, 10) UFLA13-1A, 11) UFLA 51-2, 12) UFLA 13-2A, 13) UFLA 38-3A, 14) UFLA 9A, 15) UFLA 15-5, M) marcador, C) controle.



Fonte: Da autora (2022)

Figura 3 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer BOX para os isolados de *Colletotrichum* : 1) UFLA 7-1, 2) UFLA 20-1, 3)UFLA 21-3, 4) UFLA 84-1, 5) UFLA 5-1, 6) UFLA 23-1, 7) UFLA LV 44, 8) UFLA LV 232, 9)UFLA LV 238, 10) UFLA13-A, 11) UFLA 51-2, 12) UFLA 13-1A, 13) UFLA 38-3A, 14) UFLA 9A, 15) UFLA 15-5, M) marcador, C) controle.



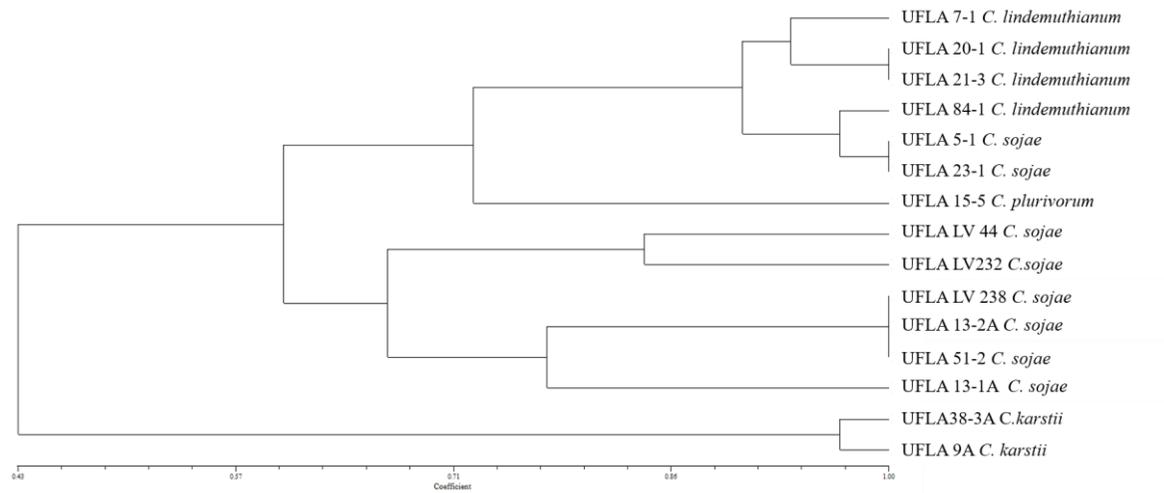
Fonte: Da autora (2022)

A quantidade e o tamanho das bandas variaram entre os isolados testados. Para a análise foram consideradas apenas as bandas bem definidas. A partir dos perfis de bandas, foi possível obter matrizes de distância para todos os marcadores e posteriormente, foram obtidos os dendogramas.

Foram gerados os dendogramas individuais para os marcadores ERIC, REP e BOX. Para o marcador ERIC foi possível observar a separação dos isolados em dois grandes grupos

os quais separaram bem as espécies analisadas (ANEXO 1). Já no marcador REP ocorreu a formação de dois subclados maiores apresentando indivíduos com percentuais de similaridade variáveis dentro do subclado (ANEXO 2). O marcador BOX revelou uma quantidade de polimorfismo muito baixa, o que impossibilitou a diferenciação das espécies por meio deste marcador (ANEXO 3). Foi realizado um agrupamento considerando os primers ERIC e REP, que melhor discriminaram os isolados, em que foram formados dois grandes clados o qual contém subclados com as espécies bem-organizadas. Levando-se em consideração as espécies em estudo, pode-se observar que ERIC e REP foram os primers capazes de detectar polimorfismo interespecífico e que apresentaram melhor resultado (FIGURA 4).

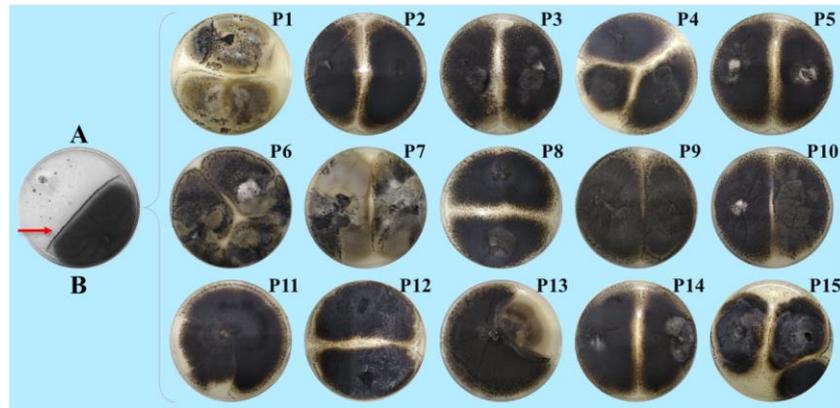
Figura 4 – Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA) de perfis de bandas de DNA geradas com o primer ERIC e REP. A semelhança entre os perfis foi estimada com o coeficiente de correlação de Jaccard.



4.2 Teste de compatibilidade sexual

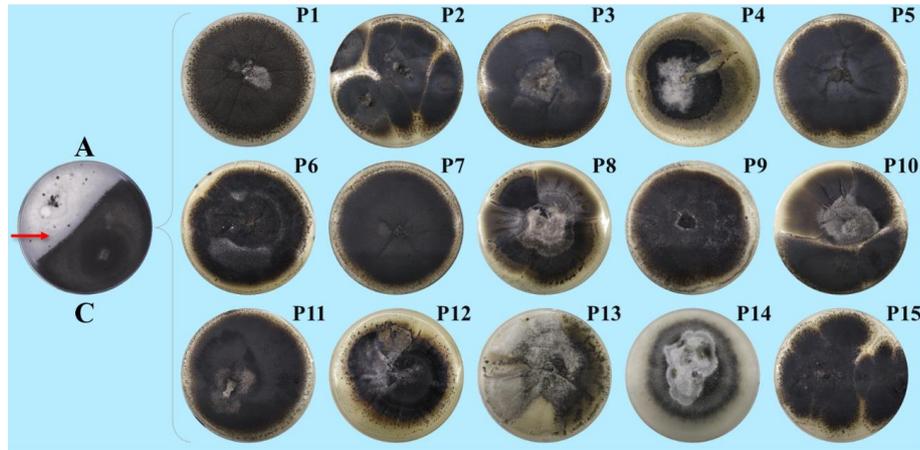
Na análise de compatibilidade sexual, somente as combinações UFLA 13-1A x UFLA13-2A e UFLA13-1A x UFLA15-5 (FIGURAS 5 e 6) promoveram a formação de peritécios com ascos e ascósporos na linha de contato entre as colônias, sugerindo compatibilidade sexual. As progênes oriundas da linha de contato formada entre UFLA13-1A e UFLA13-2A quando submetidas à análise molecular utilizando a técnica de Rep-PCR, para a confirmação de ocorrência de cruzamento, confirmaram os dados da análise individual de cada genitor, ou seja, ambos os genitores apresentaram o mesmo perfil para todos os marcadores utilizados. (ANEXOS 4, 5 e 6). Portanto, estes marcadores não são adequados para verificar a ocorrência de cruzamento entre estes isolados.

Figura 5 –Linha de contato (seta vermelha) formada pelo cruzamento entre os isolados A) UFLA 13-1A e B) UFLA 13-2A e o tipo de colônia das progênes (P1 – P15).



Fonte: Da autora (2022)

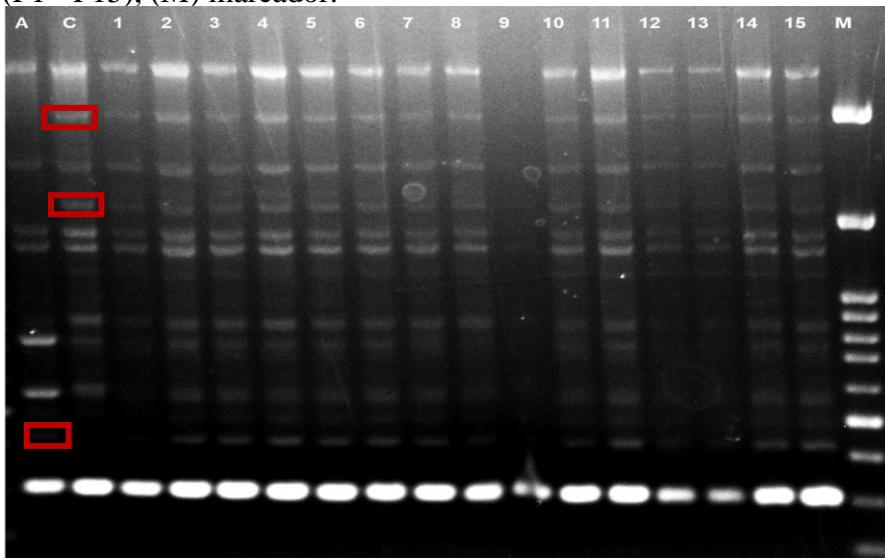
Figura 6 – Linha de contato (seta vermelha) formada pelo cruzamento entre os isolados A) UFLA 13-1A e C) UFLA 15-5 e o tipo de colônia das progênies (P1 – P15).



Fonte: Da autora (2022)

Já a análise das progênies obtidas a partir da linha de contato formada entre UFLA 13-1A e UFLA 15-5 não apresentaram perfis de banda que indicasse a ocorrência de cruzamento para o primer BOX e ERIC (ANEXOS 7 e 8). No entanto, o primer REP reproduziu um padrão de bandas nas progênies de ambos os genitores, para a linha de contato formada entre UFLA 13-1A e UFLA 15-5. Pode ser observado na Figura 7 que os diferem para três bandas, as quais estão presentes em todas as progênies evidenciando a ocorrência de cruzamento entres estes isolados.

Figura 7 - Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer REP para os genitores A) UFLA 13-1A, C) UFLA 15-5, e (1-15) refere-se às progênies (P1 - P15), (M) marcador.



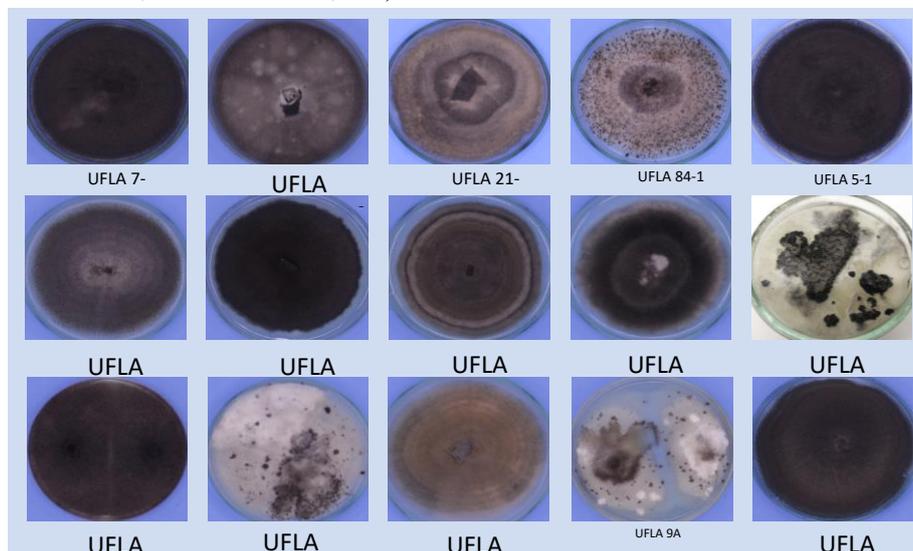
Fonte: Da autora (2022)

Colocar aqui a caracterização morfológica das progênes.

4.3 Caracterização morfológica das colônias dos isolados

De acordo com a classificação proposta por Chilton e Wheeler (1949), dos 15 isolados avaliados, dez foram classificados como Conidial, cinco como periteciais, sendo que destas, duas são do tipo Minus e três do tipo Plus. (Tabela 1) (Figura 8).

Figura 8 – Tipo de colônia dos 15 isolados avaliados de *Colletotrichum* spp: Colônia conidial (UFLA 7-1, UFLA21-3, UFLA 84-1, UFLA 5-1, UFLA 23-1, UFLA LV 44, UFLA LV 232, UFLA LV 238, UFLA 51-2, UFLA 15-5); Colônia minus: (UFLA43-1, UFLA38-3A Colônia plus: UFLA 13-1A, UFLA 13-2A, 9A).



Fonte: Da autora (2022)

A classificação também foi realizada para as progênes oriundas do cruzamento entre os isolados UFLA13-1A e UFLA15-5 (Tabela 2). Foi observado que 52% das progênes avaliadas apresentaram colônia do tipo conidial e 48% de colônias do tipo Minus. A descendência obtida da linha de contato entre os isolados UFLA13-1A e UFLA 13-2A (Tabela 2) também foi analisada. Das 15 colônias avaliadas aproximadamente 47% apresentaram colônias do tipo Minus e 53% foram conidiais.

Tabela 2 – Classificação do tipo de colônia para genitores e progênes avaliadas.

Genitores e progênes	Classificação	Genitores e progênes	Classificação
Genitor 1 (UFLA 13-1A)	Plus*	Genitor 1 (UFLA 13-1A)	Plus*
Genitor 2 (UFLA 13-2A)	Plus	Genitor 2 (UFLA 15-5)	Conidial
P1	Minus*	P1	Conidial
P2	Minus*	P2	Minus*
P3	Conidial	P3	Conidial
P4	Minus*	P4	Minus*
P5	Conidial	P5	Conidial
P6	Conidial	P6	Conidial
P7	Minus*	P7	Conidial
P8	Conidial	P8	Minus*
P9	Conidial	P9	Conidial
P10	Conidial	P10	Minus*
P11	Conidial	P11	Conidial
P12	Minus*	P12	Minus*
P13	Minus*	P13	Minus*
P14	Conidial	P14	Conidial
P15	Minus*	P15	Minus*

* Genitores e progênes que apresentaram colônias do tipo Peritecial

5 DISCUSSÃO

Diferentes espécies de *Colletotrichum* têm sido isoladas do feijoeiro e caracterizadas por meio de análises morfológicas e moleculares (BARCELOS et al., 2014). As quatro espécies utilizadas neste trabalho já haviam sido previamente identificadas por meio de

filogenia por este grupo de pesquisa (PEREIRA, 2019). Diante disso, é importante testar marcadores moleculares com o intuito de encontrar marcadores capazes de diferenciar essas espécies, bem como isolados da mesma espécie para que estes possam ser utilizados de forma rotineira, com baixo custo e de forma rápida nas análises de laboratório. No presente trabalho foi utilizada a técnica de Rep-PCR utilizando três primers BOX, ERIC e REP.

A técnica Rep-PCR tem sido útil para a identificação de espécies de bactérias e fungos (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; DAHAGHIN; SHAMS-BAKHSI, 2014). Marcas específicas são estratégias de diferenciação de micro-organismos principalmente para facilitar a identificação de micro-organismos que apresentem dificuldades na diferenciação morfológica e culturais, além de reduzir o tempo gasto e custo para essas análises (ABDOLLAHZADEH; ZOLFAGHARI, 2014; BEHNIA et al., 2016).

Para micro-organismos fitopatogênicos a técnica rep-PCR não é tão utilizada. Bardas, Koutita e Tzavella-Klonari (2009) utilizou esta técnica a fim de entender a relação geográfica entre isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões da Grécia. Pode também ser usada para estabelecer relações de virulência entre isolados como observado por Mahuku e Riascos (2004), que avaliaram a virulência e diversidades genética entre isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de vários genótipos de *Phaseolus vulgaris* de diferentes regiões.

Em seus estudos Abdollahzadeh e Zolfaghari (2014) conseguiram diferenciar 26 de 27 espécies presentes em oito gêneros da família Botryosphaeriaceae com base nos padrões de bandas apresentados pelos isolados após a utilização dos primers BOX, ERIC e REP. Espécies de Botryosphaeriaceae assim como as espécies estudadas neste trabalho apresentam morfologia semelhante, sendo, portanto, um desafio a identificação das espécies existentes por meio de características morfológicas. Como observado no presente trabalho a técnica rep-PCR pode auxiliar na diferenciação de espécies pertencentes ao complexo de espécies que causam a antracnose no feijoeiro. O primer REP foi capaz de gerar perfis de bandas suficientes para diferenciar linhagens filogenéticas pertencentes ao complexo, enquanto o primer BOX não foi capaz de produzir bandas suficientes para isso. Além disso, a repetição

das reações mostrou haver similaridade entre os perfis de bandas gerados em ambas as reações, revelando reprodutibilidade da técnica (ANEXO 9). Alguns autores afirmam que a reprodutibilidade das técnicas de *fingerprint* molecular como fator decisivo (McDonald et al., 2000; Alves et al., 2007).

Rademaker et al. (2000), sugerem que resultados mais significantes e consistentes podem ser obtidos por meio da combinação de dados obtidos a partir de BOX, ERIC e REP, já que o número total de bandas é aumentado. No presente trabalho, as análises de agrupamento realizadas utilizando dados combinados de BOX e ERIC ou BOX e REP não apresentaram resultados melhores em discriminar as espécies filogenéticas previamente identificadas, já que o primer BOX não foi capaz de produzir bandas suficientes e nem específicas. O primer ERIC apresentou os melhores resultados em comparação ao BOX, pois gerou dendrogramas mais coerentes, ou seja, apresentou um melhor agrupamento das espécies analisadas. Além disso, foram obtidos resultados semelhantes quando submetidos a análise dos dados combinados de ERIC e REP, podendo então ser utilizados.

Assim, a técnica utilizando o primer REP pode ser útil no auxílio de diferenciação de espécies de *Colletotrichum* que infectam o feijoeiro. Quando se considera um grande número de isolados, a técnica pode ajudar na seleção e triagem de isolados com base nos perfis de bandas apresentado, reduzindo custos e tempo.

Silva et al. 2019: Differentiation of lineages within “*Colletotrichum gloeosporioides* s.l.” associated with cassava anthracnose disease by BOX- and ERIC-PCRs. However, the use of concatenated data (BOX-/ERIC-PCRs) reduced the discriminatory capacity presented by ERIC-PCR alone, probably due to the lowest resolution of BOX-PCR. Therefore, ERIC-PCR technique enabled efficient differentiation of isolates belonging to the *C. gloeosporioides* complex and can be used to analyse multiple isolates in a collection and also being an important tool as a guide in the decision-making process prior to sequencing.

More recently, Silva et al. (2019) demonstrated that enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction markers (ERIC-PCR) can be used as a complementary tool for discrimination of species within the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with CAD in Brazil with a very high correlation with multilocus phylogenetic analysis.

O Polimorfismo encontrado parece estar mais relacionado com diferenças entre espécies do que intraespécies.

polymorphism seems to be more related with differences between species and phylogenetic lineages, than intraspecific genetic diversity. ERIC-PCR resulted in a total of 31 polymorphic bands.

Nas análises de compatibilidade sexual, foi possível observar a formação da linha de contato em apenas duas combinações, UFLA13-1A com UFLA13-2A e UFLA13-1A com UFLA15-5. Nesta etapa dos estudos os primers foram utilizados com o objetivo de confirmar a ocorrência de cruzamentos entre os isolados confrontados. Um dos desafios no laboratório é determinar de forma prática e rápida a confirmação da ocorrência de cruzamento entre isolados de *Colletotrichum*. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os primers não foram eficientes para confirmar a ocorrência de cruzamento entre os isolados UFLA13-1A com UFLA13-2A, apesar da formação de linha de contato observada entre eles, uma vez que estes isolados apresentaram o mesmo perfil de bandas para todos os marcadores avaliados.

A descendência oriunda dos peritécios da linha de contato entre UFLA13-1A com UFLA15-5, quando submetidas as análises com o primer REP permitiu a obtenção de marcas que foram semelhantes a ambos os genitores (FIGURA 7). Este cruzamento envolveu o cruzamento entre espécies distintas: *C. sojae* (UFLA13-1A) e *C. plurivorum* (UFLA15-5). Na caracterização morfológica realizada por Pereira (2019) o isolado UFLA15-5 foi classificado como peritecial Plus, no entanto, no presente trabalho como conidial. De acordo, com Liang (2021) linhagens de *C. fruticola* do tipo Plus podem apresentar na progênie colônias Plus, Minus e Conidial, esta última em menor frequência. Portanto, é provável que as espécies de *Colletotrichum* envolvidas neste cruzamento apresentem o mesmo comportamento verificado por Liang et al. (2021). O isolado UFLA15-5 utilizado neste trabalho é conidial, como já mencionado, mas é oriundo de uma colônia Plus e foi capaz de cruzar com isolado UFLA 13A1 que é Plus, de acordo com o resultado observado na análise molecular utilizando o marcador REP (FIGURA 7).

Na linha de contato observada entre UFLA 13-1A com UFLA 15-5 as progênies apresentaram colônias do tipo Conidial, peritecial minus e plus. A ocorrência de colônias conidiais e periteciais evidencia a ocorrência de mudança de colônias plus para minus como

relatado na literatura (LIANG et al. 2021). Houve variabilidade para a coloração das colônias periteciais independente da classificação plus ou minus. Todas as progênies periteciais foram do tipo minus.

A regulação genética da reprodução sexual de *Colletotrichum* é complexa tem sido mal compreendida. Liang et al. (2021) propuseram um modelo para *C. fruticola*, uma espécie com sistema de acasalamento sexual atípico apresentando mudança de Plus para Minus e o fenômeno de aprimoramento sexual mediado por Plus e Minus na linha de contato. Foi observado que a linhagem Minus comporta-se como o parceiro feminino e produz peritécios de forma abundante, podendo fertilizar linhagens de ambos os tipos. O estudo também revela que em cultura pura, o tipo minus pode apresentar peritécios férteis e o tipo plus pode apresentar as formas dispersas de peritécios estéreis e com má formação. A mudança de Plus para Minus, como observado nas progênies obtidas do cruzamento entre UFLA 13-1A com UFLA15-5, facilita, portanto, a reprodução sexual (fertilização cruzada e autofecundação). A linhagem tipo Minus quando se autofertiliza exibe pouca eficiência na maturação, ou seja, produz poucos ascósporos. No entanto, por meio da fertilização cruzada e por sinais liberados na zona de contato, essa condição pode ser alterada.

Os resultados obtidos evidenciam que novos trabalhos devem ser realizados visando elucidar o comportamento de isolados sexuais das espécies de *Colletotrichum* que co-habitam o feijoeiro.

6 CONCLUSÃO

A técnica utilizando o primer REP permitiu a diferenciação entre os isolados avaliados.

A presença de colônias periteciais Plus e Minus, e conidiais evidencia a ocorrência de mudança de Plus para Minus no isolado UFLA 13-A1 em monocultivo e em cruzamento com UFLA15-5.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; ZOLFAGHARI, S. Efficiency of rep-PCR *fingerprinting* as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: *Botryosphaeriaceae* species as a case study. **FEMS microbiology letters**, v. 361, n. 2, p.144-157, 2014.
- ASSEFA, T.; MAHAMA, A. A.; BROWN, A. V.; CANNON, E. K.; RUBYOGO, J. C.; RAO, I. M.; CANNON, S. B. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39, n. 2, 2019.
- AUGUSTIN, ELIANE; COSTA, J. G. C. Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no melhoramento do feijoeiro no sul do Brasil. **Pesqui. Agropecu. Brasil.**, v. 6, p. 265-272, 1971.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum*: biology, pathology, and control. Wallingpord: C. A. B. International/British Society for **Plant Pathology**, p. 388, 1992.
- BARCELOS, Q. L.; PINTO, J. M.; VAILLANCOURT, L. J.; SOUZA, E. A. Characterization of *Glomerella strains* recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 90910, 2014.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; SILVA, K. D. Vegetative compatibility, and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 230-242, 2011.
- BARDAS, G. A.; KOUTITA, O.; TZAVELLA-KLONARI, K. Molecular diversity and assessment of biological characteristics of Greek *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 311–318, 2009.
- BEHNIA, M.; JAVAN, N. M.; AMINIAN, H.; RAZAVI, M.; ALIZADEH, A. Population structure and sexual fertility of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato from citrus in Northern Iran. **Journal Agricultural Science Technology**, v. 18, p. 561-573, 2016.
- BHAT, N. N.; PADDER, B. A.; SHAH, M. D.; DAR, M. S.; NABI, A.; BANO, A.; RASOOL, R. S. Microsatellite mining in the genus *Colletotrichum*. **Gene Reports**, v.13, p.84-93, 2018.
- BROWN, J. K. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 513-539, 2015.
- BRYSON, R. J. Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*. PhD thesis, **University of Birmingham**. 1990
- JUNIOR, O. C.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C.; SANTOS, J. B.; SOARES, M. A. Identification of *Glomerella cingulata* sp phaseoli recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.6, p.3, p.607-615, 2007.
- CHANG, S.; STABEN, C. Directed replacement of mt A by mt a-1 effects a mating type

switch in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v.138, n.1, p.75-81,1994.

CHAVES, G.; La antracnosis. IN: SCWARTZ, H. F.; GALVES, G.E. La antracnosis in Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. **CIAT**, p. 37-53, 1980.

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

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

CONAB - **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. V.7 – SAFRA 202019/210-n.121 p. 3813 – Levantamento. 2021.

CORDERO, P.; CAVIGLIASSO, A.; PRÍNCIPE, A.; GODINO, A.; JOFRÉ, E.; MORI, G.; FISCHER, S. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from corn plants grown in a central region of Argentina. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 5, p. 342-351, 2012.

COSTA, M. A.; SPEHAR, R. C.; SERENO, B. R. J. Conservação de recursos genéticos no Brasil. **Embrapa Cerrados**, p.190, 2012.

CROUCH, J.; CONNELL, R.; GAN, P.; BUIATE, E.; TORRES, M. F.; BEIRN, L.; VAILLANCOURT, L. The genomics of *Colletotrichum*. In Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens. **Springer**, p. 69-102, 2014.

DAHAGHIN, L.; SHAMS-BAKHSI, M. Identification and genetic diversity of pectolytic phytopathogenic bacteria of mono- and dicotyledonous ornamental plants in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 2, p. 271-279, 2014.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, n.73, p.37-113, 2012.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80-100, 2014.

DEAN, R.; VAN KAN J. A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND KOSACK K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol** v.13, n.4, p.414–430, 2012.

DIAS, M. A. **Caracterização de linhagens *Colletotrichum spp.* e *Glomerella spp.* isoladas de lesões de sarna e antracnose do feijoeiro comum**. 2017. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

DRIVER C.H.; WHEELER, H.E. A sexual hormone in *Glomerella*. *Mycologia* v. 47, p. 311–316, 1955.

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

FERREIRA, JUAN J. OSÉ; CAMPA, A. NA; KELLY, J. AMES D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. **Translational genomics for crop breeding**, v. 1, p. 151-181, 2013.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GARCÍA-SERRANO, M.; LAGUNA, E. A.; SIMPSON, J.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, v.49, n.5, p.312-317, 2008.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development, and use of molecular markers: past and presente. **Reviews in Biotechnology**. v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-762, 1991.

KARIMI, K.; ARZANLOU, M.; PERTOT, I. Development of novel species-specific primers for the specific identification of *Colletotrichum nymphaeae* based on conventional PCR and LAMP techniques. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 463-475, 2020.

KARIMI, K.; ARZANLOU, M.; PERTOT, I. Weeds as potential inoculum reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* causing strawberry anthracnose in Iran and Rep-PCR *fingerprinting* as useful marker to differentiate *C. acutatum* complex on strawberry. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 129, 2019.

KELLY, J. D.; AFANADOR, L.; CAMERON, L. S. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Michigan and implications in dry bean resistance breeding. **Plant Disease**, v. 78, n. 9, p. 892-894, 1994.

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

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 245–76, 1997.

LIANG, X.; YAO, L.; HAO, X.; LI, B.; KONG, Y.; LIN, Y.; SUN, G. Molecular dissection of perithecial mating line development in *Colletotrichum fructicola*, a species with a nontypical mating system featuring plus-to minus switch and plus-minus-mediated sexual enhancement. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 12, p.00474-21, 2021.

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

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; MORRISON, D. A. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992.

MARTINS, A. C. F. **Caracterização da produção in vitro e in vivo de estruturas sexuais de linhagens de *Glomerella spp.* do feijoeiro**. 2019. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2010.

MENAT, J.; CABRAL, A. L.; VIJAYAN, P.; WEI, Y.; BANNIZA, S. *Glomerella truncata*: another *Glomerella* species with an atypical mating system. **Mycologia**, 104(3), 641-649, 2012.

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

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, p.170-179, 2013.

MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 969-977, 2008.

MOTA, S. F.; BARCELOS, Q. L.; DIAS, M. A.; SOUZA, E. A. Variability of *Colletotrichum spp* in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 71-76, 2016.

NADEEM, M. A.; NAWAZ, M. A.; SHAHID, M. Q.; DOĞAN, Y.; COMERTPAY, G.; YILDIZ, M.; ÖZKAN, H. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v.32, n.2, p.261-285, 2017.

NI, M.; FERETZAKI, M.; SUN, S.; WANG, X.; HEITMAN, J. Sex in fungi. **Annual review of genetics**, 45, 405, 2011.

PALENCIA, E. R.; KLICH, M. A.; GLENN, A. E.; BACON, C. W. Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section Nigri. **Journal of microbiological methods**, v.79, n.1, p.1-7, 2009.

PASTOR CORRALES. M. A.; TU, J. C. Anthracnose. In: PASTOR CORRALES, M. A., SCHWARTZ, H. H. (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, p. 375-433, 1989.

PEREIRA, L. F. **Análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* associados à sarna e à antracnose do feijoeiro**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2019.

PERSEGUINI, J. M. K. C.; OBLESSUC, P. R.; ROSA, J. R. B. F.; GOMES, K. A.;

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Genome-wide association studies of anthracnose and angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS One**, v. 11, n. 3, 2016.

PINTO, J. M. A.; PEREIRA, R.; MOTA, S. F.; ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490-497, 2012.

QUEIROZ, C. B de.; CORREIA, H. L. N.; MENICUCCI, R. P.; VIDIGAL, P. M. P.; QUEIROZ, M. V de. Draft genome sequences of two isolates of *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in common beans. **Genome Announcements**, v. 5, n. 18, 2017.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665–677, 2000.

RAMPERSAD, N. S.; HOSEIN, N. F.; CARRINGTON, V. C. Sequence exploration reveals information bias among molecular markers used in phylogenetic reconstruction for *Colletotrichum* species. **Springer Plus**, v. 3, n.1, p. 614, 2014.

RANDHAWA, H. S.; ASIF, M.; POZNIAK, C.; CLARKE, J. M.; GRAF, R. J.; FOX, S. L.; SPANER, D. Application of molecular markers to wheat breeding in C anada. **Plant Breeding**, v.132, n.5, p.458-471, 2013.

ROCA M, M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, v.28 n.4, p. 367-373, 2003.

RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; RAMÍREZ-RUEDA, M. T.; CABRAL-ENCISO, M.; GARCÍA-SERRANO, M.; LIRA-MALDONADO, Z.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; SIMPSON, J. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, v.97, n.4, p.793-803, 2005.

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

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

SHARMA, N.; KUMARI, N.; SHARMA, S. K.; PADDER, B. A.; SHARMA, P. N. Investigating the virulence and genetic diversity of *Colletotrichum lindemuthianum* populations distributed in the North Western Himalayan hill states. **Journal of Plant Pathology**, v.101, n.3, p.677-688, 2019.

SILVA, L. L.; MORENO, H. L. A.; CORREIA, H. L. N.; SANTANA, M. F.; DE QUEIROZ, M. V. *Colletotrichum*: Species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891-1904,

2020.

SILVEIRA, L. A. da; STRACIERI, J.; PEREIRA, D. F.; SOUZA, A. de; GOES, A. de. Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum spp.* associados a podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 1, p. 064-071, 2016.

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

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

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1015-1026, 1984.

SUTTON, B. C. The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. p.696 1980.

SUZUKI, T.; TANAKA-MIWA, C.; EBIHARA, Y.; ITO, Y.; UEMATSU, S. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duchesne). **Journal of general plant pathology**, v. 76, n. 4, p. 247-253, 2010.

TAMIN, A. S.; URAIHA, V. Molecular variability in host specific isolate of *Colletotrichum spp.* **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n.6, p.853-864, 2019.

VAILLANCOURT, L.; DU, M.; WANG, J.; ROLLINS, J.; HANAU, R. (2000). Genetic analysis of cross fertility between two self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. **Mycologia**, v.92, n.3, p.430-435. 2000.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; GOCCAYNE, J. D. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.

VERSALOVIC, J. T.; KOEUTH, J. R.; LUPSKI. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to *fingerprinting* of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

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

VIEIRA, S. A. W.; BEZERRA, A. P.; SILVA, C. A.; VELOSO, S. J.; CÂMARA, S.P.M.; DOYLE, P.V. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 143, 2019.

WANG, S.; CHU, B.; LIU, Q.; LUO, Y.; MA, Z. Development of a sequence-characterized amplified region marker using inter-simple sequence repeats for detection of *Puccinia*

striiformis f. *sp. tritici*. **Journal of Phytopathology**, v. 165, p. 442–447, 2017.

WANG, S.; CHU, B.; LIU, Q.; LUO, Y.; MA, Z. Development of a sequence-characterized amplified region marker using inter-simple sequence repeats for detection of *Puccinia striiformis* f. *sp. tritici*. **Journal of Phytopathology**, v. 165, p. 442–447, 2017.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in mycology**, n. 73, p.115-180. 2012.

WENDLAND, A.; LOBO JUNIOR, M.; FARIA, J. C. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. **Embrapa Arroz e Feijão**. 2018.

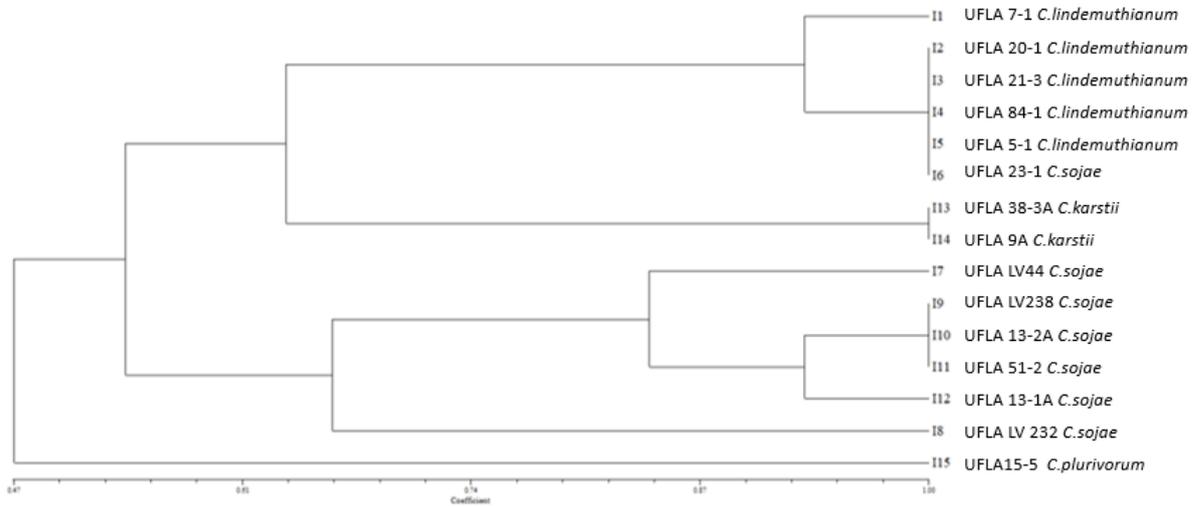
WHEELER, H. E. Genetics and evolution of heterotallism in *Glomerella*. **Am J Bot**, v.44, p.342-345, 1954.

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

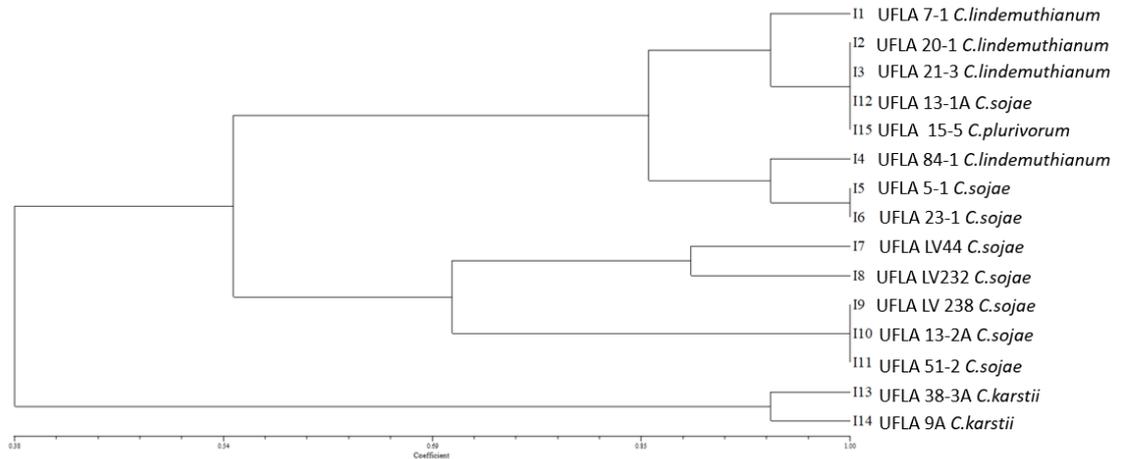
ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. D. A. **Agr. Teach. Bull.**, n. 868, 255p. 1957.

ANEXOS

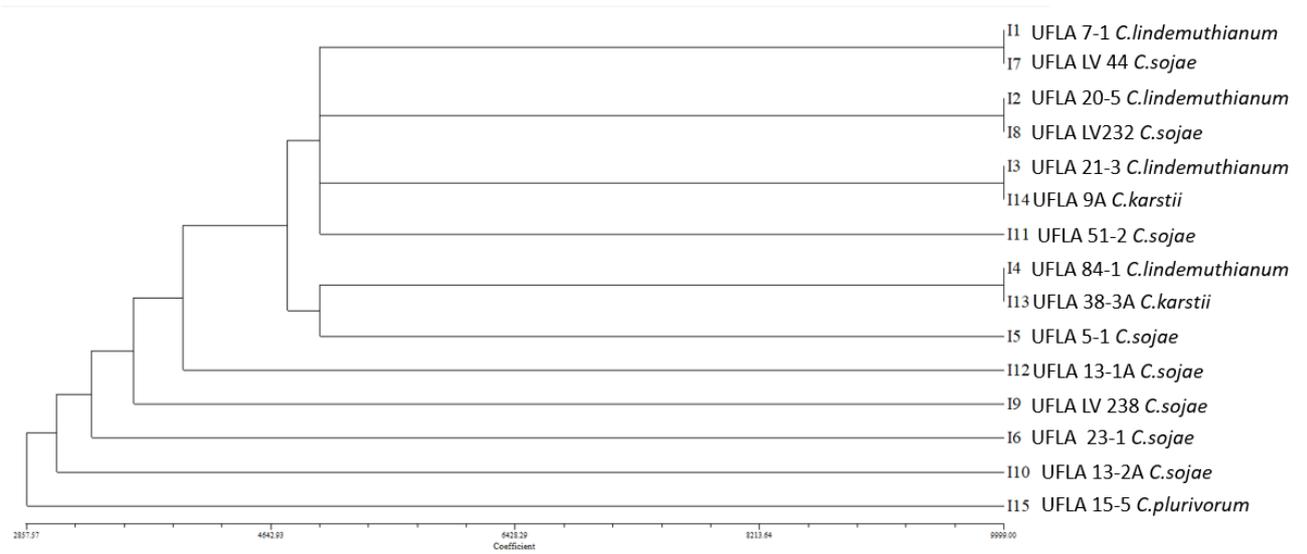
ANEXO 1 –Dendrograma resultante da análise em cluster UPGMA de perfis de bandas de DNA geradas com o primer ERIC. A semelhança entre os perfis foi estimada com o coeficiente de correlação de Jaccard.



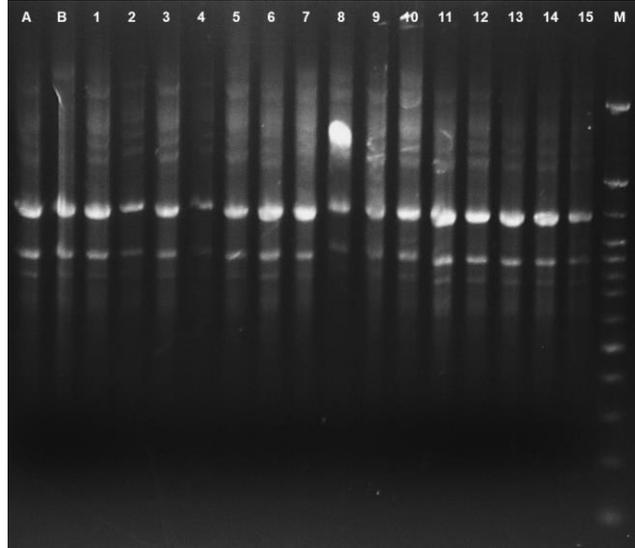
ANEXO 2 – Dendrograma resultante da análise em cluster UPGMA de perfis de bandas de DNA geradas com o primer REP. A semelhança entre os perfis foi estimada com o coeficiente de correlação de Jaccard.



ANEXO 3 – Dendrograma resultante da análise em cluster UPGMA de perfis de bandas de DNA geradas com o primer BOX. A semelhança entre os perfis foi estimada com o coeficiente de correlação de Jaccard.

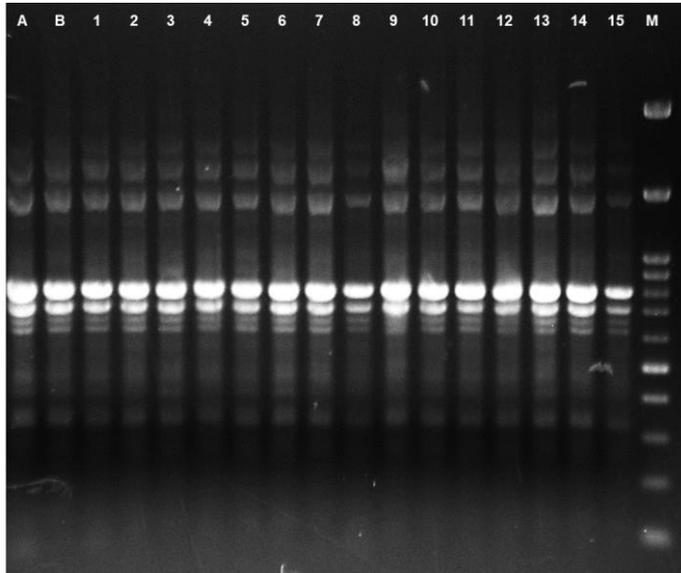


ANEXO 4 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer BOX para os genitores: A) UFLA13-1A, B) UFLA13-2A, e progênies (P1-P15), M) marcador.



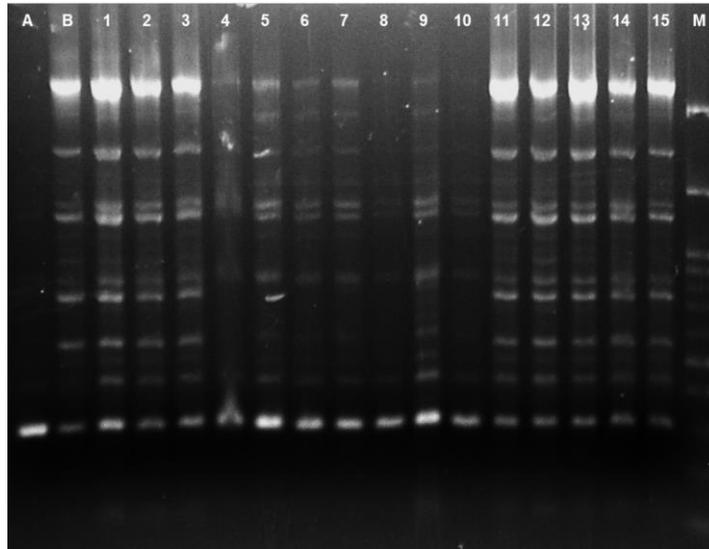
Fonte: Da autora (2022)

ANEXO 5 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer ERIC para os genitores: A) UFLA13-1A, B) UFLA 13-2A, e progênies (P1 – P15), M) marcador.



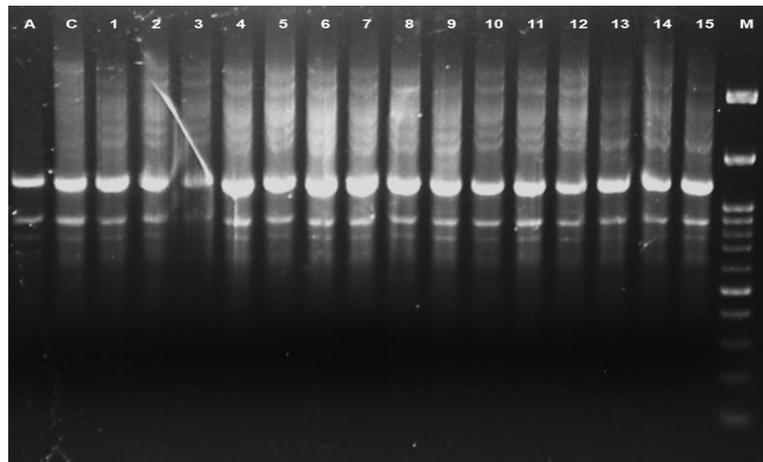
Fonte: Da autora (2022)

ANEXO 6 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer REP para os genitores os: A) UFLA13-1A, B) UFLA 13-2A, e progênies (P1 – P15) M) marcador.

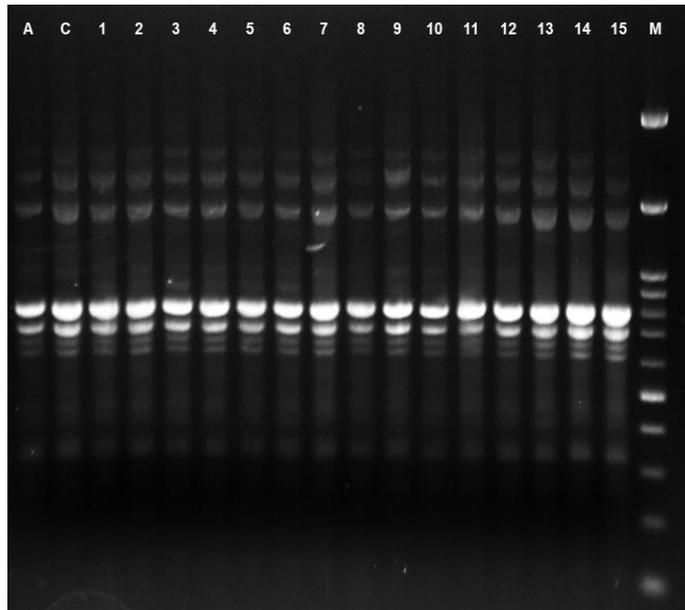


Fonte: Da autora (2022)

ANEXO 7 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer BOX para os genitores: A) UFLA13-1A, C) UFLA 15-5, e Progênies (P1-P15), M) marcador.

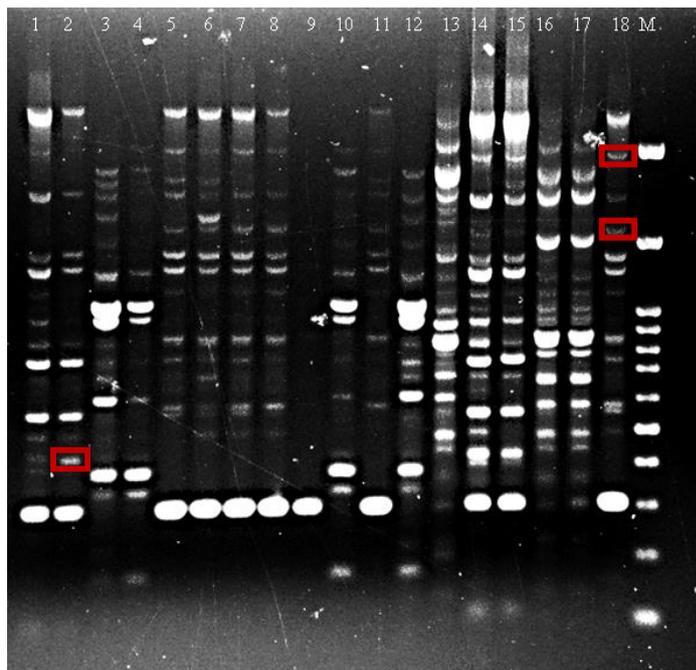


ANEXO 8 – Gel de eletroforese com bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer ERIC para os genitores e progênies: A) UFLA13-1A, B) UFLA 15-5, 1)P1, 2)P2, 3)P3, 4)P4, 5) P5, 6) P6, 7) P7, 8)P8, 9) P9, 10) P10, 11) P11, 12)P12, 13) P13, 14) P14, 15)P15, M) marcador.



Fonte: Da autora (2022)

ANEXO 9 – Gel de eletroforese com reprodutibilidade bandas de DNA gerados na reação de amplificação usando o primer REP para os genitores UFLA 13-1A (2) e UFLA 15-5 (18).



Fonte: Da autora (2022)

