

**IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES DE  
*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* POR MEIO  
DE MARCADORES RAPD**

**OSNIL ALVES CAMARGO JUNIOR**

**2004**

**OSNIL ALVES CAMARGO JUNIOR**

**IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES DE *Glomerella cingulata*  
f. sp. *phaseoli* POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora:  
Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2004**

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

Camargo Junior, Osnil Alves

Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD / Osnil Alves Camargo Junior. -- Lavras : UFLA, 2004.

60 p. : il.

Orientadora: Elaine Aparecida de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fungo fitopatogênico. 2. Variabilidade genética. 3. Marcador Molecular. 4. Antracnose. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.24  
-635.6523

**OSNIL ALVES CAMARGO JUNIOR**

**IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES DE *Glomerella cingulata*  
f. sp. *phaseoli* POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 13 de fevereiro de 2004

Prof. Dr. João Bosco dos Santos                      UFLA/DBI

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa      UNILAVRAS

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

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

A Deus, meu dito refúgio e socorro sempre  
presente nas tribulações.

OFEREÇO

Aos meus pais, Osnil e  
Lúcia.

Ao meu irmão, Flávio.

À minha noiva, Raquel.

À minha tia, Cláudia.

Ao meu avô Dito Cuba de  
quem jamais me esquecerei  
(*in memoriam*).

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus e criador de todas as coisas, por sua infinita graça.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza pelo exemplo demonstrado e pelo apoio durante este período.

A UNILAVRAS, em especial a Profa. Dra Maria Cristina e ao amigo Marco Aurélio, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos professores João Bosco, César, Ângela, Magno e João Cândido pelos ensinamentos e experiências transmitidas.

Ao amigo e orientador (graduação) Prof. Dr. Luis Antônio por ter me encaminhado e me apoiado no mestrado.

Aos funcionários e colegas de curso do Departamento de Biologia da UFLA.

Aos companheiros José Sérgio de Araújo, Fábio Dias (Fabinho), José Marcello (Pit), Juliane, Marcelo (Jacaré) e Lamartine, pela amizade verdadeira e companheirismo nas horas mais difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais, por terem feito por mim além do que podiam.

Ao grande amor da minha vida, Raquel, por estar sempre presente.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Antracnose agente causal e sintomatologia.....	2
2.2 O fungo <i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>Phaseoli</i> .....	3
2.3 Variabilidade patogênica.....	4
2.4 Possíveis fontes de variabilidade em fungos.....	6
2.5 O ciclo sexual dos fungos filamentosos.....	7
2.5.1 Heterotalismo.....	8
2.5.2 Homotalismo.....	9
2.6 Marcadores moleculares no estudo de fungos fitopatogênicos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção e manutenção dos isolados.....	19
3.2 Identificação das raças fisiológicas.....	19
3.3 Cruzamentos e micromanipulações.....	21
3.4 Obtenção da massa de micélios.....	23
3.5 Extração de DNA.....	23
3.6 Análise RAPD.....	24
3.7 Análise de similaridade genética e agrupamento.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Cruzamentos e microculturas.....	27
4.2 Identificação das raças fisiológicas.....	29
4.3 Avaliação da similaridade genética.....	31
5 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	54

## RESUMO

Camargo Junior, Osnil Alves. **Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A ampla variabilidade genética existente em relação ao patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* tem intrigado os pesquisadores. A forma sexuada, até o presente momento, não foi detectada na natureza. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de marcadores RAPD, a capacidade de linhagens do fungo *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (forma perfeita ou sexuada de *C. lindemuthianum*) de formar recombinantes. Foram utilizadas as linhagens 40, 42, 20 e setores da linhagem 20 (B1, B2, B3, B4, B5 e B6). Cruzamentos em todas as combinações possíveis foram realizados em placa de Petri com meio de cultura M<sub>3</sub>. O cruzamento entre as linhagens 42 x B1 produziu maior quantidade de peritécios, sendo isolados 5 ascos com seus respectivos ascósporos. Procedeu-se à extração de DNA dos genitores e dos descendentes, realizando-se a análise de RAPD. A partir das 62 bandas polimórficas de RAPD obtidas, procedeu-se avaliações de similaridade genética pelo método de Sorence e Dice e a análise de agrupamento na forma de dendrograma, pelo do método UPGMA. Os resultados evidenciaram que: o fungo *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* é pseudo homotálico; as linhagens 42 e B1 são compatíveis em cruzamento, produzindo peritécios férteis e viáveis; os marcadores RAPD permitiram identificar recombinantes do cruzamento entre as linhagens 42 e B1 de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, tendo os 40 ascósporos descendentes apresentado 63% de similaridade genética com o parental 2 (linhagem 42) e 49% com o parental 1 (linhagem B1).

---

\*Comitê Orientador: Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza – UFLA (Orientador), Prof. Dr. João Bosco dos Santos – UFLA (Co-orientador).

## ABSTRACT

Camargo Junior, Osnil Alves. **Identification of recombinants of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* using RAPD markers.** Lavras: UFLA, 2004. 60P.  
(Dissertation – Master Program in Genetic and Plant Breeding). \*

The wide genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* pathogen has intrigued researchers since the perfect phase has not been found in nature. The aim of this work was to evaluate the ability of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (the perfect phase of *C. lindemuthianum*) in forming recombinants, using RAPD markers. Lines 40, 42, 20 and the sectors of the line 20 (B1, B2, B3, B4, B5 and B6) were crossed in all combinations under M3 culture medium. Cross 42 x B1 produced the largest amount of perithecia and five asci with their respective ascospores were isolated. DNA extraction from the genitors and descendants were processed for RAPD analysis. 62 polymorphic bands were used to estimate genetic similarity by the Sorence and Dice method. The clustering analysis and the dendrogram were performed through the UPGMA method. Results showed that *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* is a pseudo homothallic fungus. The lines 42 and B1 are cross compatible and produced fertile and viable perithecia. The RAPD markers allowed identifying recombinants from the cross between lines 42 and B1 and the 40 descending ascospores presented 63% of genetic similarity with line 42 and 49% with line B1.

---

\*Guindace Committee: Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza – UFLA (Major Professor), Prof. Dr. João Bosco dos Santos – UFLA (Co-advisor).

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que afetam a cultura do feijão, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn. ) Scrib., é uma das mais importantes, devido aos grandes danos e prejuízos que ela causa.

Este fungo tem como característica a ocorrência de uma grande variabilidade patogênica, o que tem dificultado a obtenção de cultivares de feijoeiro com resistência durável à antracnose.

Os processos responsáveis por esta ampla variabilidade ainda não foram perfeitamente entendidos. A possibilidade de a recombinação sexual estar entre os mecanismos responsáveis pela variabilidade do patógeno, foi evidenciada quando Shear & Wood, em 1913 descreveram seu estado ascógeno. Porém, o trabalho suscitou dúvidas, principalmente pela falta de provas em relação à patogenicidade. A fase sexuada também foi observada por Kimati & Galli (1970), denominando-a de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*.

Há na literatura estudos genéticos que visaram entender melhor o comportamento reprodutivo deste patógeno, podendo-se citar Kimati & Galli (1970), Batista e Chaves (1980), Bryson (1990), Mendes-Costa (1996), Mendes-Costa et al., 2004 (não publicado). Na maioria destes trabalhos, utilizando marcadores morfológicos, observaram-se evidências da ocorrência de recombinantes de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. No entanto, persistiram dúvidas sobre a origem dos descendentes, ou seja, se realmente eram recombinantes.

Apesar da ocorrência da fase sexuada, esta tem sido pouco explorada em estudos genéticos. Portanto, este trabalho visa identificar recombinantes obtidos do cruzamento entre linhagens de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD, que poderão ser úteis em futuros estudos genéticos e moleculares.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Antracnose: agente causal e sintomatologia

O agente causal da antracnose do feijoeiro é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, pertencente à classe dos Deuteromicetos, ordem Melanconiales e família Melanconiaceae (Briosi & Cavi, 1889, citado por Sutton, 1992).

Os sintomas da antracnose aparecem em todos os órgãos aéreos da planta e raramente nas raízes. O hipocótilo das plântulas é infectado geralmente por esporos, provenientes dos cotilédones, trazidos pela lavagem das chuvas. As lesões formadas no hipocótilo iniciam-se por pequenas manchas escuras que gradualmente se estendem por quase toda a planta, atingindo tamanhos consideráveis. Posteriormente, estas lesões tornam-se deprimidas e de coloração marrom-escuro. Em função disso, o caule pode enfraquecer-se a ponto de não suportar o peso da planta. No pecíolo e no caule, as manchas são geralmente ovaladas, deprimidas e de coloração escura, podendo causar queda das folhas e tombamento da plântula. Nas folhas, as lesões ocorrem inicialmente na face abaxial, ao longo das nervuras, com pequenas manchas de cor pardo-avermelhado, tornando-se, com o tempo, de cor café-escuro a negra. Essas lesões podem também ocorrer no mesófilo, formando manchas de diferentes tamanhos e conformações. A maioria das nervuras pode ser atingida quando o ataque é muito severo, formando-se manchas necrosadas nos tecidos adjacentes (Vieira, 1983; Sartorato, 1988).

## 2.2 O Fungo *Glomerella cingulata* f. *sp. phaseoli*

Na fase assexuada, ou imperfeita, o fungo apresenta micélio septado, ramificado e sua coloração, à medida que envelhece, varia de hialina a quase negra (Walker, 1969). Os conídios são hialinos, unicelulares, de alongados a cilíndricos, eretos, sem ramificação e medem de 40 a 60 $\mu$ m de comprimento, apresentando as extremidades arredondas ou uma delas pontiagudas. Normalmente, medem de 4,4 a 5,3 $\mu$ m de raio e o seu perímetro varia entre 13 a 22 $\mu$ m. Geralmente apresentam, na parte central, uma área clara semelhante a um vacúolo. Um conídio, ao germinar, pode emitir de um a quatro tubos germinativos, sendo mais freqüente dois, os quais formam apressórios em seus ápices por ocasião da penetração do hospedeiro. Os conídios são produzidos nos acérvulos, que são os corpos de frutificação do patógeno. Em condições favoráveis à doença, o patógeno esporula abundantemente, formando uma massa de conídios de cor rósea. As setas podem, às vezes, ser encontradas mergulhadas nos tecidos do hospedeiro e quase sempre estão presentes quando o patógeno é cultivado em meio de cultura. Estas setas, que são produzidas entre os conidióforos ou nas margens dos acérvulos, são pontiagudas, rígidas, de cor castanha e seu comprimento varia de 30 a 100 $\mu$ m (Chaves, 1980).

Na sua fase perfeita ou sexual, o fungo é classificado na classe dos Ascomycetes e na ordem Diaportales, sendo denominado inicialmente como *Glomerella lindemuthianum* Briosi & Cav. Mais recentemente este nome foi substituído por *Glomerella cingulata* (Stonem & V. Scherenk). Nesta fase o fungo produz peritécio (corpo de frutificação) mais ou menos arredondado, cujo diâmetro varia de 120 a 210 $\mu$ m (na maioria dos casos, 160 $\mu$ m). Os rostros, quando presentes, medem de 30 a 80 $\mu$ m. O canal do peritécio é forrado por paráfises hialinas e filiformes. A parede do peritécio é inicialmente hialina e, à medida que envelhece, torna-se enegrecida a partir do ápice. Os ascos em número médio de 30, medem 60 x 6 $\mu$ m, 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 do 27<sup>o</sup> dia. São de dois tipos: alantóides (20 x 6,5µm) e elipsoidais (10 x 4µm). Cada asco contém de 1 a 8 ascósporos alantóides ou 8 ascósporos elipsoidais (Bailey & Jeger, 1992; Roca et al., 2003).

### **2.3 Variabilidade Patogênica:**

Barrus, em 1911, foi o primeiro a verificar a existência da ampla variabilidade patogênica em *C. lindemuthianum*, observando que cultivares de feijoeiro, quando inoculadas com diversos isolados, apresentavam sintomas diferenciados, indicando a existência de duas raças diferentes do patógeno, as quais foram chamadas de Alfa e Beta. Em 1923, Burkholder identificou outra raça, chamando-a de Gama (Sartorato & Rava, 1994). Uma quarta raça foi descoberta por Andus e Wade, em 1942, a qual foi denominada de Delta (Walker, 1969). Yerkes & Ortiz (1956) também registraram mais três novas raças encontradas no México, denominando-as de México I, México II e México III.

Por meio do uso de apenas três cultivares diferenciadoras (Michelite, Dark Red Kindney e Perry Morrow) e duas classes de reação (suscetível e resistente) podia-se determinar um total de oito raças fisiológicas. Portanto, a última raça possível de ser identificada por esse método foi a Brasileiro I, identificada no Brasil (Oliveira et al., 1992).

Rava et al. (1993), estudando a agressividade de isolados da Nicarágua, verificaram que os mesmos quebraram a resistência de algumas cultivares importantes como a TO, TU, PI 207.262, México 222 e a AB 136, o mesmo foi observado por Boloños (1984), pesquisando o comportamento de isolados do México.

Rava et al. (1994), estudando 118 isolados de diferentes regiões brasileiras, conseguiram separar 25 raças pertencentes aos grupos Alfa, Delta, Gama, México I, México II e Brasileiro I.

A ampla variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* em várias partes do mundo e as diferentes denominações dadas, muitas vezes para a mesma raça, fizeram com que pesquisadores da área estabelecessem um conjunto padronizado de cultivares diferenciadoras que pudessem ser usadas internacionalmente, com o propósito de coordenar os esforços de investigação de todos os pesquisadores e facilitar a troca de informações. Em comum acordo, foi estabelecida uma única nomenclatura que pudesse ser usada por todos os pesquisadores do mundo. Este fato ocorreu em uma reunião ocorrida no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), sediado em Cali, na Colômbia, de 6 a 10 de junho de 1988, quando ficou definido o uso de um sistema binário, utilizando-se doze diferenciadoras para a caracterização das raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*. Esse sistema, combinado com as duas classes de resposta à infecção (resistência ou suscetibilidade), permite classificar um total de  $2^{n-1} = 2^{12-1} = 2^{11} = 2048$  raças, em que “n” é o número de cultivares diferenciadoras (Pastor-Corrales, 1992).

Por meio desse sistema binário, Molano et al. (1995) diferenciaram 11 raças de *C. lindemuthianum* de isolados coletados em várias regiões da Colômbia, com base na patogenicidade destas raças. Os autores concluíram que estas raças encontradas são geneticamente relacionadas, pois apresentavam em comum o fenótipo de virulência, diferenciando-se apenas em poucos genes de patogenicidade. Concluíram também que este tipo de informação permite aos pesquisadores monitorar a diversidade patogênica do fungo, ou seja, se essa variabilidade muda através dos anos e se o panorama de raças fisiológicas do fungo é similar em outras regiões. Citaram ainda que, por meio do fenótipo de virulência, é também possível deduzir a existência de reações evolutivas entre as

raças. Por exemplo, ao se observar o fenótipo de virulência das raças 1(a), 3(ab), 515(abj), 523(abdj) e 651(abdhj), pode-se imaginar que a raça 1(a) adquiriu um gene adicional de virulência, por exemplo, para dar origem a raça 3(ab). Esta por sua vez, pode ter dado origem a raça 515(abj), esta a 523(abdj) e 651(abdhj).

#### **2.4 Possíveis fontes de variabilidade em fungos**

Ambas as formas do patógeno (mitospórica e meiospórica) possuem ampla variabilidade genética que são diferenciadas por meio de estudos de patogenicidade em plantas hospedeiras.

Há variações dentro de populações selvagens de fungos que não apresentam ciclo sexual na natureza. Há também muitos relatos de variabilidade em isolados monospóricos, quando mantidos e cultivados em laboratório (Leslie e Dickman, 1991; citado por Roca; 2002). Alguns pesquisadores argumentam que a mutação é a principal fonte de variabilidade em fungos sendo que a recombinação sexual, a recombinação assexual por meio do ciclo parassexual e determinantes citoplásmaticos têm extrema importância na biologia reprodutiva de fungos conidiais e também de outros fungos.

Griffiths (1995) relatou que vários tipos de conexões entre células podem permitir a troca de material, tanto como o núcleo inteiro como simplesmente fragmentos. Estas podem também teoricamente permitir a troca de material genético mitocondrial ou plasmidial. Mendes-Costa et al. (1996) verificaram anastomoses entre hifas e a presença de conídios binucleados, contudo, não foi observada a passagem do núcleo. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram, em *C. lindemuthianum*, a ocorrência de anastomoses entre conídios e a passagem de mitocôndria e material nuclear em isolados brasileiros (Roca et al., 2003). Bos (1985) concluiu que a formação de

anastomoses em *C. lindemuthianum* não é um fato isolado, mas sim um evento comum.

O ciclo parassexual é um mecanismo importante no estudo da patogenicidade dos fungos imperfeitos. Apesar do esforço por parte dos pesquisadores, ainda não foi determinada a ocorrência do ciclo parassexual em *C. lindemuthianum*, mas ele já foi reconhecido em mais de 30 espécies de fungos (Azevedo, 1987).

O número e o comprimento de cromossomos em fungos filamentosos podem variar de 3 a 21 e de 0,2 e 10 Mb respectivamente. Eles podem gerar cariótipos moleculares e também podem ser visualizados através de microscopia eletrônica. Andrew et al. (1993), analisando 52 isolados de *Colletotrichum* spp., com o objetivo de identificar minicromossomos por meio de eletroforese de campo pulsado, conseguiram identificar a existência de 2 grupos diferentes, um com menos de 6 minicromossomos e outro com mais de 6 minicromossomos. Arce-Montoya et al. (1998), estudando polimorfismo cromossômico em isolados de *C. lindemuthianum* provenientes do México, verificaram ampla variação em tamanho e número de minicromossomos, ou seja, de 2 a 6, com tamanho variando de 0,7 a < 1,2 Mb. Os autores sugerem que este alto nível de polimorfismo observado é devido a freqüentes rearranjos cromossômicos. Ishikawa et al. (2003) e Roca et al. (2003) identificaram polimorfismo cromossômico em *C. lindemuthianum*, tendo os resultados variado de 4 a 8 cromossomos, mostrando ser este um potencial mecanismo de variabilidade genética.

## **2.5 O ciclo sexual dos fungos filamentosos**

Os fungos, especialmente as leveduras e os chamados fungos filamentosos, são também bastante estudados do ponto de vista genético. À semelhança das bactérias, além da variabilidade ocasionada pela mutação, eles

possuem também sistemas de recombinação que permitem combinar características encontradas nos diferentes indivíduos, em um único indivíduo. Muitos fungos possuem um ciclo sexual, facilitando, portanto, o seu estudo genético. Em outros fungos, o ciclo sexual ainda não foi descrito ou é até mesmo inexistente (Azevedo, 1998). Embora em cada espécie de fungo, cujo ciclo sexual já foi descrito, existam particularidades próprias, ele se caracteriza, de modo geral, pela existência, em um mesmo citoplasma, de núcleos haplóides de composição genética distinta que se fundem em estruturas apropriadas, produzindo um núcleo diplóide que quase imediatamente sofre meiose, restaurando o estado haplóide dos núcleos. Resultam assim esporos, chamados de esporos sexuais, que podem dar origem a novos indivíduos, resultantes do cruzamento de duas linhagens parentais envolvidas (Azevedo, 1998).

Há, entretanto, grandes variações durante as etapas do ciclo sexual, que é denominado de homotalismo e heterotalismo.

### **2.5.1 Heterotalismo**

Como ilustração será usado o ciclo sexual de *Neurospora crassa*, que é um dos fungos mais bem estudados do ponto de vista genético. *N. crassa* é um fungo chamado heterotalico porque possui dois tipos de reação sexual ou *mating types*, designados A e a. Esses dois tipos de reação sexual são indistinguíveis morfológicamente, mas anastomoses de hifas só ocorrem em tipos de reação sexual distintas, isto é, A com a e não A com A ou a com a. Isto resulta na obtenção de hifas contendo dois diferentes tipos de núcleos em um mesmo citoplasma, ou seja, no heterocário.

Embora um patógeno do tipo de reação A ou a possa dar uma reprodução assexual, produzindo esporos assexuais (conídios), é somente pôr meio do heterocário, formado pelos dois talos de diferentes tipos de reação sexual, que a meiose e a reprodução sexual podem ocorrer. Por anastomose com

conídios ou hifas de *N. crassa* de tipo de reação sexual distinta, as hifas tricógenas recebem o núcleo distinto, ocorrendo fusões nucleares e daí resultando núcleos haplóides. O núcleo diplóide, dentro do asco, sofre divisão meiótica, dando quatro células haplóides que sofrem, em seguida, uma divisão mitótica e daí resultam oito células, todas haplóides dentro de cada asco. Cada uma destas células é chamada de ascósporo e os oito ascósporos dispõem-se linearmente no interior do asco. Cada ascósporo é o produto de uma recombinação sexual e, devido a este fato, eles são chamados de esporos sexuados (Azevedo, 1998).

### 2.5.2 Homotalismo

Neste caso será utilizado como exemplo o ciclo sexual do fungo *Aspergillus nidulans*. Este patógeno é designado como homotálico, pois não possui tipos de reação sexual ou *mating types* distintos. Dessa maneira *A. nidulans* pode cruzar com ele próprio, ou seja, com o próprio talo, onde resultam descendentes todos iguais. Entretanto, pode haver também cruzamentos entre diferentes linhagens de *A. nidulans* e, nesse caso, o zigoto híbrido vai produzir segregantes de constituições genéticas distintas. Até mesmo em algumas linhagens, existe preferência para cruzamento com linhagens distintas, por um processo denominado de *Heterotalismo relativo*, no qual, apesar de ser homotálico, o fungo dá mais zigotos híbridos do que autofecundados. Nota-se então que todo ciclo sexual, ou seja, fusão nuclear com produção de diplóides, meiose e, conseqüentemente, haploidização, ocorre com base em um único talo, não havendo necessidade de diferentes tipos de reação sexual (Azevedo, 1998).

Na literatura existe contradição quanto à natureza do ciclo sexual em *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Kimati & Galli (1970) realizaram estudos genéticos nesta espécie e concluíram que o fungo é heterotálico. Já Bryson (1990) e Mendes-Costa (1996) encontraram evidências da natureza homotálica

deste fungo em seus trabalhos. Há problemas também quanto à classificação destes sistemas reprodutivos, ou seja, espécies dióicas e incompatíveis são classificadas como heterotálicas. Então, Esser (1967) propôs outras classificações, em que por exemplo, fungos homotálicos podem ser compatíveis ou incompatíveis.

Wheeler (1954) divide o processo sexual em *G. cingulata* em 4 passos: iniciação do peritécio, plasmogamia, cariogamia e divisão meiótica reducional. Uma descrição completa do processo pode ser encontrada em Wheeler et al. (1948) e McGahen & Wheeler (1951). Estudos citogenéticos em *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* foram realizados por Kimati & Galli (1970) e Roca et al. (2003). No entanto, a utilização da forma meiospórica para estudos genéticos tem sido pouco explorada (Batista & Chaves, 1982; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996).

Na tentativa de obter genótipos recombinantes de *C. lindemuthianum*, Bryson (1990) realizou cruzamentos entre diferentes linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e observou a formação de peritécios quando as linhagens foram misturadas 'a priori' na placa. No entanto, a fertilidade dos cruzamentos foi tão baixa que a segregação em ascos individuais ou peritécios não foi possível. Contudo, a análise de marcadores isoenzimáticos permitiu a identificação de genótipos recombinantes, indicando que o cruzamento/fertilização ocorreram durante a reprodução sexual nas culturas misturadas.

Chilton et al. (1945) relataram que a distribuição dos ascósporos nos ascos de um único peritécio em *Glomerella* é sempre na razão de 4:4 ou 0:8, mas nunca as duas. Este fato indica que as proporções são determinadas pela formação genética dos núcleos que se fundem nos ascos, ou seja, um único núcleo origina todos peritécios nos ascos.

Segundo Wheeler (1956), dois genes controlam a reprodução sexuada. O gene A controla a mudança entre o estado peritecual e o conidial e o gene B

controla a distribuição das estruturas de frutificação, sejam peritécios ou acérvulos.

Mendes-Costa (1996), utilizando três linhagens de *G. cingulata* f. sp. *Phaseoli*, realizou o cruzamento entre os oito ascósporos obtidos de ascos individuais de cada linhagem em todas as combinações possíveis, colocando-os em placa de Petri e verificou que não houve a formação de peritécios na linha de contato das colônias. Ao contrário, cada cultura desenvolveu seus próprios peritécios. Isolados de conídios e ascósporos individuais produziram peritécios auto-fertéis. Posteriormente, a mesma autora, em um trabalho (não publicado) no qual objetivou explicar a compatibilidade sexual no mesmo organismo, realizou inúmeros cruzamentos entre linhagens distintas quanto às características morfológicas e reprodutivas. Pode-se observar que a proporção 4:4 (dos ascósporos) ocorreu naqueles ascos em que núcleos de linhagens diferentes entraram em contato e se fundiram e que a proporção 0:8 ocorreu naqueles ascos em que 2 núcleos da mesma linhagem se fundiram. Inferiu-se então, que o fungo em questão se comporta tanto como homotático como heterotático, dependendo das combinações realizadas.

Há escassez de relatos sobre a herança da patogenicidade em *C. lindemuthianum* e a evidência para a relação gene-a-gene apóia-se na analogia com outros sistemas bem entendidos (Bryson et al., 1992).

A ausência de evidência direta de um sistema gene-a-gene pode agora ser remediada pelo desenvolvimento de métodos de cruzamentos de linhagens de *C. lindemuthianum*. Batista & Chaves (1982) e Bryson (1990) testaram amostras de progênies de ascósporos individuais do fungo em cultivares de feijão e verificaram que estas diferenciaram-se das linhagens parentais. Bryson (1990) cruzou as raças brasileiras BA9 e BA10 (Batista & Chaves, 1982), cujos testes de patogenicidade sobre os hipocótilos (Bailey & Deverall, 1971) diferiram na virulência nas cultivares Nerina e Tuf. Embora a amostra da progênie tenha sido

pequena, os resultados são consistentes com a segregação de dois genes independentes, um determinante da avirulência à Nerina (*AVRN*) e o outro à Tuf (*AVRT*). Os genótipos *AVRNavrT* e *avrN AVRT* surgiram como recombinantes no cruzamento com novos padrões de interação com as duas cultivares.

Batista & Chaves (1982) também relataram a formação de novas raças após a hibridação sexual. Segregação clara para avirulência:virulência para uma cultivar particular ocorreu em outros cruzamentos, indicando o envolvimento de genes maiores, embora as proporções nem sempre tenham-se ajustado ao modelo simples de um gene.

É interessante notar que tanto ambos Batista & Chaves (1982) como e Bryson (1990) verificaram que a avirulência das cultivares Dark Red Kidney e Perry Marrow tenderam a segregar juntas, sugerindo que estas duas cultivares têm um ou mais “genes” de resistência em comum. Estes resultados mostraram pela primeira vez, que a avirulência de raças de *C. lindemuthianum* para cultivares individuais de feijão é determinada por genes maiores identificáveis e são consistentes com o sistema gene-a-gene. No entanto, Bryson et al. (1991) enfatizam que a comprovação total deve ser aguardada pelo estabelecimento de uma relação específica entre a resistência de um hospedeiro particular e os genes de avirulência do patógeno.

Segundo Bryson et al. (1992), a literatura sobre *Colletotrichum* indica que a maioria das linhagens não formam peritécios na natureza ou em laboratório. Como resultado, o estado teleomórfico não tem sido reconhecido em muitas espécies, as quais são consideradas assexuais. Enquanto este fato pode ocorrer em algumas circunstâncias, parece provável que a assexualidade tem sido exagerada devido à pequena amostra de isolados avaliados, o uso de culturas ' velhas' , o fracasso em testar as combinações de linhagens e as condições inadequadas da cultura. A ênfase a estes fatores em *C. lindemuthianum* revelou que uma significativa proporção de linhagens pode

apresentar reprodução sexual (Kimati & Galli, 1970, Batista & Chaves, 1982; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996) e pesquisas similares deveriam ser realizadas em outros grupos. Uma vez que uma combinação de linhagens que produz alguma progênie de ascósporos tem sido encontrada, a seleção para aumentar a fertilidade deveria ser realizada por meio do intercruzamento de progênies em diversas gerações sucessivas, como tem sido feito para *Magnaporthe grisea* (Valent et al., 1991). A obtenção de linhagens férteis de laboratório facilitará muito os estudos genéticos e moleculares.

## **2.6 Marcadores moleculares no estudo de fungos fitopatogênicos**

O marcador genético corresponde a uma característica do organismo que pode ser facilmente detectada a olho nu ou com a ajuda de algum aparato tecnológico e que co-segrega com genes de interesse. Para ser útil como marcador, a característica deve evidenciar diferenças entre indivíduos e ser reproduzida na progênie. Esta característica pode ser um fenótipo, uma marca no cromossomo ou um fragmento de DNA. Em termos práticos, o marcador genético é uma ferramenta para acompanhar alguma característica de interesse que não pode ser analisada facilmente, em uma população (Keim et al., 1990).

Existem diversos tipos de marcadores que são produtos gênicos e vêm sendo intensamente utilizados em pesquisas genéticas, destacando-se os morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e enzimáticos. Como estes marcadores resultam da interação da constituição genética com o meio, pode-se classificá-los como fenotípicos. Por outro lado, os marcadores que se baseiam diretamente no DNA não sofrem influência do meio e abrangem tanto seqüências codificadoras como não codificadoras e sítios de controle da expressão gênica. Pode-se assim inferir que o número de marcas moleculares é infinitamente superior às marcas fenotípicas, ampliando as possibilidades de estudo e

manipulação do material genético da espécie que se está estudando (Hu & Quiros, 1991).

Williams et al. (1990) desenvolveram e descreveram um tipo de marcador de DNA baseado na técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) denominado RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que utiliza primers mais curtos (em torno de 10 nucleotídeos) do que aqueles usados em reações de PCR, com um conteúdo de C+G superior a 50%. Nesta técnica, o iniciador se liga ao DNA genômico em dois sítios, em fitas opostas do DNA-molde. Caso estes sítios estejam separados por uma distância entre 200 e 2000 pares de bases, o produto da amplificação será formado. Os produtos de amplificação são geralmente separados em um gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta quando corados com brometo de etídio. A técnica RAPD normalmente detecta a presença de apenas um alelo em cada loco, representado pela presença de uma determinada banda amplificada. A ausência de amplificação representa o somatório de todos os outros alelos naquele loco. Por isso pode-se dizer que os marcadores RAPD são, geralmente, dominantes, não podendo, portanto, ser utilizados para distinguir locos heterozigotos (Rafalski et al., 1991).

Uma das principais aplicações dos marcadores RAPD no estudo de fungos fitopatogênicos é o reexame das relações taxonômicas de grupos fúngicos, a qual promete esclarecer as relações existentes entre esses microrganismos. Isto é importante para o entendimento da identidade e complexidade genética de uma população de patógenos que infectam um hospedeiro particular, constituindo-se em uma ferramenta auxiliar na montagem de estratégias para o controle de doenças (Michelmore & Hulbert, 1987).

Sabe-se que a especialização de *C. lindemuthianum* é dinâmica na natureza, ou seja, o aparecimento de novas raças que quebram a resistência de cultivares melhoradas é muito freqüente e muito pouco se conhece sobre estes processos que criam tamanha variação. Um estudo molecular detalhado pode

fornecer argumentos que ajudem no entendimento da genética e do comportamento de tal patógeno.

Otoya et al. (1995) avaliaram a diversidade genética de *C. lindemuthianum* na Colômbia, por meio de marcadores RAPD. Foram avaliados, no total, 178 isolados coletados em diversas regiões do país. A partir do padrão de bandas polimórficas geradas por RAPD, concluíram que há ampla diversidade genética entre as raças e dentro dos isolados pertencentes à mesma raça.

Bandas polimórficas foram registradas por Plummer et al. (1994), no estudo de similaridade genética de linhagens de *Leptosphaeria maculans*, considerando linhagens agressivas e não agressivas. Os autores concluíram que não há uma divergência genética muito alta entre estes isolados virulentos, indicando que não há correlação entre distancia geográfica e distancia genética, ou seja, o fato de os mesmos estarem separados geograficamente não contribuiu para a segregação genética.

Com o objetivo de distinguir raças de *Gremmeniella abietina* provenientes da Europa e da América do Norte, Hamelin et al. (1993), utilizaram marcadores RAPD para tal propósito. Por meio das análises moleculares os autores tiraram as seguintes conclusões: ocorrência de alta similaridade genética entre os representantes da raça européia na América do Norte e, alta divergência genética intra-raacial na raça-norte americana.

Talamini et al. (2003), estudando a divergência genética entre e dentro de raças de *C. lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD, verificaram que: os grupos obtidos pelas marcas de RAPD relacionaram-se com a região de origem, na maioria dos isolados avaliados; não houve relação entre o agrupamento promovido pelo RAPD com as raças identificadas por meio das cultivares diferenciadoras; os isolados que pertenciam à fase sexuada (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*) pertenceram ao grupo mais distante geneticamente e

essa maior divergência se deve, possivelmente, à reprodução sexuada, em que a troca de material genético é mais intensa.

Chen et al. (1993) encontraram uma baixa associação entre virulência e padrões RAPD em *Puccinia striiformis*, indicando que o polimorfismo de DNA é independente de virulência e foi detectado também polimorfismo entre raças e isolados dentro de raças.

Com o propósito de estudar a similaridade genética entre diversos isolados de *Aspergillus fumigatus*, Aufavre-Brown et al. (1992) utilizaram sete primers previamente selecionados, os quais geraram marcas (bandas polimórficas) que permitiram aos autores concluir que a técnica RAPD é extremamente eficiente para caracterizar ou distinguir isolados pertencentes, muitas vezes, a um mesmo grupo geneticamente relacionado.

Estudos de similaridade genética do grupo *Aspergilli "black"* mostraram, por meio de marcadores RAPD, que as 17 linhagens analisadas puderam ser agrupadas ou subdivididas em 15 grupos diferentes (Megnegneau et al., 1993).

Bidochka et al. (1994) utilizaram a análise RAPD para diferenciar espécies e linhagens de fungos entomopatogênicos. Os autores avaliaram 24 isolados ao todo de fungos deuteromicetos (*Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoride* e *Beauveria bassiana*). Por meio dos padrões de bandas apresentados, os autores puderam concluir que em *M. flavoride* há pouca variabilidade intra-específica quando comparado a *M. anisopliae*. Verificaram também que o alto nível de variabilidade de *M. anisopliae* foi similar à variabilidade total entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoride*.

A partir da técnica RAPD foram pesquisados 24 isolados de *Colletotrichum orbiculare*, dois isolados de *Glomerella cingulata* var. *orbiculare* e três isolados de *C. magna*. Pelos resultados obtidos pôde-se

verificar grupos de compatibilidade vegetativa e similaridade genética (Correl et al., 1993).

Marcadores RAPD em *Cladosporium fulvum* foram obtidos por Arnau et al. (1994), a partir dos quais foi estabelecido um mapa genético baseado na recombinação mitótica neste fungo imperfeito. Pela avaliação dos segregantes, pode-se inferir que houve um alto grau de recombinação durante o ciclo parassexual.

Estudos do ciclo parassexual em *Penicillium roqueforti* teve como ferramenta principal marcadores moleculares RAPD. Nesses trabalhos foi isolado o DNA das linhagens parentais de um diplóide e de uma linhagem haplóide selecionada aleatoriamente de cada fenótipo recombinante. Com base nos resultados, os autores puderam concluir que produtos que caracterizavam as linhagens parentais foram perdidos em alguns recombinantes e que fragmentos que não existiam nas linhas parentais foram produzidos em alguns recombinantes (Durand et al., 1993).

Cerca de 43 linhagens de *Trichoderma* foram analisadas por meio de marcadores RAPD, sendo utilizados 9 primers. Por meio dos padrões de bandas geradas pela técnica, pôde-se verificar que, dentro de 23 linhagens de *T. harzianum* dez compartilharam padrões de RAPD similares, as quais originaram-se de várias regiões geográficas (Zimand et al., 1994).

Marcadores genéticos baseados em RAPD foram utilizados para distinguir isolados de *Pythium ultimum* (um oomiceto homotálico) e também para confirmar a ocorrência de cruzamentos entre os isolados. Dois isolados que apresentaram um alto nível de polimorfismo foram misturados e colocados sobre um meio que permite o desenvolvimento da fase sexual. Por meio dos marcadores RAPD, foram selecionadas progênies monospóricas com o propósito de se identificar possíveis híbridos entre os dois isolados parentais. Em seguida, foi autofecundado o suposto F<sub>1</sub>, dando origem a uma família F<sub>2</sub>, que apresentou

segregação e distribuição independente de marcadores RAPD. Os autores concluíram que outros oomicetos homotáticos podem ser capazes de cruzar e podem se reproduzir sexuadamente, desempenhando um papel importante na geração de variabilidade em oomicetos homotáticos (Francis & Clair, 1993).

Ayliffe et al. (1994) observaram a formação de heteroduplex entre produtos alélicos de RAPD utilizando vários primers decâmeros de seqüência aleatória para amplificar bandas de RAPD de DNA genômico de uma linhagem  $F_1$  de *Melampsora lini* (ferrugem do linho) e suas duas linhagens parentais, observando-se a presença de bandas não parentais. Este heteroduplex identificado estava ocasionalmente ausente em alguns experimentos, mas naqueles experimentos onde estava presente sempre foi encontrado nos mesmos indivíduos durante os mesmos experimentos.

Silva (1996), trabalhando com *Trichoderma pseudokoningii*, caracterizando geneticamente recombinantes por meio de marcadores RAPD, observou que 70,2% dos padrões de RAPD dos recombinantes foram idênticos aos dos parentais aos quais eles mais se assemelhavam geneticamente. Em 29,8% dos padrões de RAPD constatou-se o seguinte: ausência da banda do parental geneticamente mais relacionado, presença de banda do parental com menor similaridade genética ou presença de banda não parental e, ainda, uma combinação destas três situações. Por meio destes resultados não se pode descartar a hipótese de que ocorreu a fusão de núcleos com perda preferencial de um dos genomas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) e no Departamento de Química da UFLA (Laboratório de Bioquímica).

#### 3.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Foram utilizadas nove linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, obtidas pelo isolamento de lesões em caules, folhas e vagens de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). A coleta de material infectado foi realizada nas três épocas de plantio do feijoeiro no estado de Minas Gerais, objetivando-se observar a ocorrência da fase meiospórica. Posteriormente, os isolados foram repicados para esporulação em placa com meio M<sub>3</sub> (Junqueira et al., 1984).

O isolamento do fungo e a obtenção das culturas monospóricas foram realizados segundo a metodologia descrita por Mendes-Costa (1996). As culturas se desenvolveram em incubadora (BOD) com controle de temperatura (21°C) e luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro).

#### 3.2 Identificação das raças fisiológicas

Para a identificação das raças fisiológicas foi utilizado o conjunto de cultivares diferenciadoras internacional e seguiu-se a metodologia recomendada pelo CIAT (1988), como se observa na Tabela 1.

As 12 diferenciadoras mais a testemunha suscetível carioca foram semeadas em bandejas de 50 x 40 x 8cm, utilizando-se 10 sementes por cultivar, tendo sido usado como substrato o composto Plantimax<sup>®</sup>. Para cada isolado foram utilizadas duas bandejas. O inóculo foi produzido a partir de vagens

esterilizadas, parcialmente imersas em meio BDA e inoculadas a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro, por um período de oito a dez dias. A partir destas vagens, foram preparadas sucessivas suspensões de esporos contendo  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml.

**TABELA 1** Sistema para identificação de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* (CIAT, 1988).

Diferenciadoras	Sistema binário	Valor numérico das cultivares
<b>1-Michelite</b>	$2^0$	1
<b>2-MDKR</b>	$2^1$	2
<b>3-Perry Marrow</b>	$2^2$	4
<b>4-Cornell 49242</b>	$2^3$	8
<b>5-Widusa</b>	$2^4$	16
<b>6-Kaboon</b>	$2^5$	32
<b>7-México 222</b>	$2^6$	64
<b>8-PI 207262</b>	$2^7$	128
<b>9-TO</b>	$2^8$	256
<b>10-TU</b>	$2^9$	512
<b>11-AB 136</b>	$2^{10}$	1024
<b>12-G 2333</b>	$2^{11}$	2048

As inoculações foram realizadas nas plântulas de 9 a 11 dias após a semeadura, pulverizando-se ambas as faces das folhas e as hastes das plântulas.

As bandejas contendo as plântulas inoculadas, foram colocadas durante dois dias em câmara de nevoeiro a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e doze horas de luz e doze de escuro. A seguir foram transferidas para bancadas na casa de vegetação, sob condição de alta umidade relativa do ar.

As avaliações dos sintomas (Tabela 2) foram realizadas sete a nove dias após a inoculação, utilizando-se a escala descrita por Rava et al. (1993).

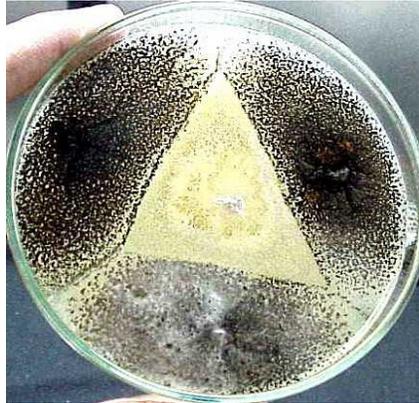
**TABELA 2** Escala descritiva utilizada na avaliação da incidência de antracnose do feijoeiro (folhas, caules e ramos), segundo Rava et al. (1993).

<b>GRAU</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>1</b>	Ausência de sintomas.
<b>2</b>	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior da folha.
<b>3</b>	Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior.
<b>4</b>	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
<b>5</b>	Maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau anterior.
<b>6</b>	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces da folha, apresentando algumas lesões nos caules, ramos e pecíolos.
<b>7</b>	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões nos caules, ramos e pecíolos.
<b>8</b>	Manchas necróticas na quase totalidade das nervuras, ocasionando numerosas rupturas no mesófilo, desfoliação abundante e redução do crescimento das plantas. Lesões muito abundantes nos caules, ramos e pecíolos.
<b>9</b>	Maioria das plantas mortas.

Foram consideradas resistentes aquelas plântulas que apresentaram graus de 1 a 3,6 e suscetíveis aquelas que apresentaram graus acima de 3,6.

### **3.3 Cruzamentos e micromanipulações**

Procederam-se cruzamentos em todas as combinações possíveis entre as linhagens 40, 42, 20 e setores da linhagem 20 (B1, B2, B3, B4, B5 e B6), de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Estes cruzamentos foram efetuados em placa de Petri com 20ml do meio de cultura M<sub>3</sub>, como se observa na Figura 1, seguindo-se a metodologia descrita por Mendes-Costa (2002, comunicação pessoal).



**FIGURA 1** Cruzamento entre as linhagens

Após o período de 22 a 27 dias de incubação a 20<sup>0</sup>C, no escuro, as linhas formadas entre as colônias, foram examinadas ao microscópio (Leica AC 2000), sendo observado a presença ou ausência de peritécios com ascos férteis. Verificou-se a presença de ascos e ascósporos, macerando-se os peritécios e observando-os ao microscópio.

Os peritécios resultantes dos cruzamentos foram macerados em lâminas que continham uma gota de água destilada estéril. Estas lâminas foram posteriormente invertidas sobre outras que continham uma fina camada de ágar a 2%, removidas após ligeira compressão. Em seguida, foi transferida para lâminas adaptadas para micromanipulação manual e levadas para o microscópio, o qual também foi adaptado com uma agulha de vidro proveniente de um tubo capilar, de modo que possibilitou capturar cada asco separadamente.

Os ascos capturados foram transferidos para pequenos pedaços de ágar livres de qualquer contaminação e posteriormente, estourados com o auxílio da agulha e, finalmente, cada ascósporo foi transferido para pedaços individuais de ágar.

Feito este procedimento transferiram-se separadamente os oito ascósporos de cada asco para placas de Petri com meio de cultura M<sub>3</sub>. Em

seguida, as placas foram levadas para uma estufa do tipo BOD, onde permaneceram por aproximadamente 25 dias.

### **3.4 Obtenção da massa de micélios para a extração de DNA**

Os ascósporos de cada asco micromanipulado foram repicados e transferidos para erlenmeyers previamente esterilizados em autoclave, com 150 ml de meio líquido M<sub>3</sub>S mais quemicetina<sup>®</sup> (antibiótico). Posteriormente, foram acondicionados em um agitador automático, regulado com uma velocidade de 110 rpm e uma temperatura de 22<sup>o</sup>C.

Após aproximadamente 5 dias, foram retirados os erlenmeyers do agitador e procedeu-se à desidratação da massa de micélios por meio de uma bomba a vácuo, almofariz e filtro de papel esterilizado. Em seguida, o material desidratado foi liofilizado por aproximadamente 2 dias ininterruptos.

### **3.5 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir do micélio liofilizado, utilizando-se a metodologia de Raeder & Broda (1985), adaptada com a metodologia de Rogers & Bendich (1988). Os micélios foram macerados com areia esterilizada, juntamente com 10ml de um tampão de extração pré-aquecido a 65<sup>o</sup>C (0,2g de brometo de cetiltrimetil-amônio; 1ml de tris 1M, 0,4ml de EDTA 0,5M, 0,82g de NaCl, 0,1g de polivinilpirrolidona 40.000, 8,6ml de água pura) e 20µl de 2-β-mercaptoetanol.

Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria a 65<sup>o</sup>C por 30-40 minutos, agitando-se três a quatro vezes. Posteriormente, foram adicionados 10ml da solução 24 clorofórmio:1 álcool isoamil e o material foi centrifugado durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm.

O sobrenadante foi coletado, misturado com 30ml da solução 6 álcool 95<sup>o</sup>: 1 acetato de amônio 7,5M e mantido no freezer por cerca de uma noite. Em

seguida, foi coletado o DNA e foram adicionados de 200-300µl da solução tris 1mM e EDTA 0,1mM, pH 8,0 (TE). Após o DNA ter se dissolvido, foi feita uma segunda extração com clorofórmio/álcool isoamil. O sobrenadante foi coletado, adicionado o triplo do seu volume com a solução 20 álcool 95<sup>0</sup> : 1 acetato de sódio 3M e mantido no freezer por pelo menos uma hora, ou até ocorrer a precipitação do DNA. A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA, dissolvido em 200-300µl de TE.

A etapa seguinte consistiu em quantificar a concentração do DNA em fluorímetro (Hoefer Scientific). Para isso foram usados 2µl da solução de DNA em 2ml de tampão (tris 10mM, EDTA 1,0mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1µg/ml do corante H32258. Após, o DNA foi diluído com TE para a concentração de 10ng/µl, que foi usada nas análises RAPD.

### **3.6 Análise RAPD**

Cada reação RAPD foi realizada misturando-se os seguintes ingredientes com as respectivas concentrações: 200µM de dNTP's, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 0,4µM de primer, tampão de reação pH8,0 (50mM Tris; 2,0mM Mg Cl<sub>2</sub>; 20mM KCL; 250µg/ml de albumina de soro bovino; 1% de ficoll 400; 1mM de tartrazine), 20ng do DNA genômico e água bidestilada até o volume de 15µl. O dNTP corresponde a uma mistura equitativa de ATP, GTP, CTP e TTP. Os primers utilizados são decâmeros, tendo sido testados cerca de 200 primers com diferentes seqüências. As seqüências dos 33 primers de interesse, ou seja, aqueles que evidenciaram polimorfismo, estão dispostos na Tabela 6.

A reação assim preparada foi depositada em tubos capilares de vidro, de 10cm de comprimento, próximo para o volume de 10µl e suas extremidades foram fechadas em chama de bico de bunsen.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology). Os programas usados foram: a) o primeiro por dois ciclos, sendo a desnaturação do DNA a 91<sup>o</sup>C por 60 segundos, o anelamento do primer a 42<sup>o</sup>C por 7 segundos e o alongamento da cadeia de DNA a 72<sup>o</sup>C por 70 segundos; b) o segundo foi programado por 38 ciclos diferindo do primeiro apenas no tempo de desnaturação que é de apenas um segundo; c) o terceiro foi de quatro minutos a 72<sup>o</sup>C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de ágar a 1,5% em tampão de TBE (tris, ácido bórico e EDTA) em corrente elétrica de 100v, por aproximadamente 2 horas e meia.

Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 minutos e lavado o excesso de corante, por uma hora, com água destilada.

### **3.7 Análise de similaridade genética e agrupamento**

Na avaliação dos géis, cada banda foi tratada como um caráter único e a sua presença em um indivíduo foi designada por um (1) e a ausência em outro indivíduo por zero (0). De posse destes dados, foi construída uma matriz de zero (0) e um (1) por meio do programa Microsoft Excel, cada coluna representando os ascos e seus respectivos ascósporos e as linhas os diferentes primers utilizados.

A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre cada par de indivíduos  $i$  e  $j$  foi efetuada pelo coeficiente de similaridade de Sorense-Dice, utilizando a

expressão:  $sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$ , (Rohlf, 1992).

As variáveis da expressão foram obtidas conforme o esquema da Tabela 3.

Os erros associados a cada similaridade ( $S_{sg}$ ) foram estimados a partir da expressão sugerida por Skroch et al. (1992):

$$S_{sg} = \left[ \frac{sg_{ij}(1 - sg_{ij})}{(n-1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

em que:

$n$ : número total de combinações  $a$ ,  $b$  e  $c$  utilizadas na estimativa similaridade genética. A partir desta expressão, calculou-se o erro médio da similaridade genética entre cada asco com os parentais e, posteriormente, o intervalo de confiança segundo Stell & Torrie (1980).

**TABELA 3** Tabela de contingência mostrando os quatro possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores dominantes.

		<u>Genótipo i</u>	
		<b>1</b>	<b>0</b>
<u>Genótipo j</u>	<b>1</b>	<b>a (1,1)</b>	<b>b (0,1)</b>
	<b>0</b>	<b>c (1,0)</b>	<b>d (0,0)</b>

A representação simplificada das distâncias foi feita por meio de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), por meio do programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cruzamentos e microculturas

Na Tabela 4 são apresentados os cruzamentos realizados entre as diferentes linhagens utilizadas de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Merece ser mencionado que os isolados B1, B2, B3, B4, B5 e B6 são provenientes de setores brancos obtidos da linhagem 20. Tem sido relatado na literatura que normalmente os cruzamentos compatíveis envolvem o cruzamento de isolados com colônias escuras com isolados de colônias claras (Lucas, 1946; Wheller, 1952).

Foram considerados cruzamentos compatíveis aqueles que apresentaram a formação de peritécios na linha de contato entre as linhagens. No entanto, apenas o cruzamento B1 x 42 apresentou grande produção de peritécios férteis e viáveis. Os demais cruzamentos compatíveis, tais como 42 x B6, 42 x B5, 20 x B1, apresentaram peritécios férteis. Contudo, a produção dos mesmos foi muito baixa, inviabilizando a utilização dos mesmos neste trabalho.

Deve ser salientado que, em todos os cruzamentos compatíveis, a morfologia dos peritécios ascos e ascósporos foi semelhante à descrita por Shear & Wood (1913); Lucas (1948); Kimati & Galli (1970); Bryson (1992); Mendes-Costa et al., 2004 (não publicado). Os materiais provenientes destes cruzamentos se mostraram de fácil manejo e de grande viabilidade em laboratório. Os peritécios iniciais foram produzidos em aglomerados formando grumos escuros e grandes sobre toda a superfície da placa de Petri. Esta produção exuberante de peritécios em grandes aglomerados só aconteceu nas primeiras placas isoladas. Repicagens sucessivas do isolamento inicial foram perdendo a capacidade de formação de peritécios, tanto para os parentais como para as culturas monoascospóricas oriundas dos mesmos, resultado diferente do obtido por Mendes-Costa et al. 2004 (não publicado), tendo os autores observado que as

culturas monoascospóricas oriundas (F<sub>1</sub>) e seus descendentes (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, etc...) conservaram a capacidade de produção de peritécios férteis.

A partir do cruzamento B1 x 42 foram isolados 5 ascos e de cada um deles os oito ascósporos por meio de micromanipulação, totalizando os 40 descendentes.

**TABELA 4** Cruzamento dois a dois entre as linhagens 42, 20, 40, B1, B2, B3, B4, B5 e B6.

	42	40	20	B1	B2	B3	B4	B5
42								
40	-							
20	-	-						
B1	+	+	+					
B2	+	+	-	-				
B3	+	+	+	-	-			
B4	-	+	-	-	-	-		
B5	+	+	-	-	-	-	-	
B6	+	+	-	-	-	-	-	-

+ Peritécios férteis na linha de contato

Com relação à coloração das colônias, todos os 40 descendentes apresentaram colônias escuras que variam de tons acinzentados ao preto intenso, sendo estas colônias periteciais. É importante também comentar que várias colônias dos descendentes apresentaram setores com coloração e aspectos diferentes.

Os resultados de compatibilidade sexual (Tabela 4) comprovam a natureza homotática e heterotática deste fungo, resultados coincidentes com o obtido por Mendes-Costa et al. 2004 (não publicado) que encontraram evidências a partir de marcadores morfológicos e moleculares da natureza pseudo-homotática de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

#### 4.2 Identificação das raças fisiológicas

As raças fisiológicas foram identificadas, segundo a reação das linhagens, em uma série de 12 cultivares diferenciadoras pelo CIAT.

Devido à pequena produção de esporos sexuais das linhagens e pela não produção de esporos por parte das culturas monoascospóricas, só foi possível fazer a distinção da raça fisiológica referente à linhagem B1, como se observa na Tabela 5. Vale ressaltar que já se sabia de antemão que a linhagem 42 já havia sido identificada como raça 73, pois foi a partir da colônia de *C. lindemuthianum* (fase assexuada) que se observou a ocorrência espontânea de peritécios e procedeu-se ao isolamento dos ascos. No caso da linhagem 20, que deu origem à linhagem B1, esta foi isolada a partir de folhas com lesões características da antracnose do feijoeiro. Vale ressaltar que no isolamento a partir das lesões de caules, folhas e vagens não se utilizou nenhum meio de cultura especial visando o desenvolvimento da fase sexuada. Simplesmente tem sido observado que todos os isolados obtidos da fase sexuada, pertencentes à Micoteca do Departamento de Biologia da UFLA, são provenientes de lesões de folhas e caules do feijoeiro.

Verificou-se que na inoculação utilizando-se a fase sexuada (*G. cingulata* f. sp. *phaseoli*), os sintomas são bem brandos quando comparados com os da fase assexuada (Figura 2). Não foram encontrados trabalhos relatando o processo de infecção de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* no hospedeiro. No entanto, para a fase assexuada, existem vários relatos (Perfect et al., 2001; Roca et al., 2003).

**TABELA 5** Reação das cultivares diferenciadoras aos isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e identificação das raças fisiológicas.

LINHAGENS	Cultivares diferenciadoras <sup>1</sup>											RAÇA	
	2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>		2 <sup>11</sup>
<b>B1</b>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<b>65</b>
<b>42</b>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<b>73*</b>

<sup>1</sup> +: Reação de suscetibilidade; -: Reação de resistência. Cultivares diferenciadoras: Michelite (2<sup>0</sup>), Michigan Dark Red Kidney (MDKR) (2<sup>1</sup>), Perry Marrow (2<sup>2</sup>), Cornell 49-242 (2<sup>3</sup>), Widusa (2<sup>4</sup>), Kaboon (2<sup>5</sup>), México 222 (2<sup>6</sup>), PI 207262 (2<sup>7</sup>), TO (2<sup>8</sup>), TU (2<sup>9</sup>), AB 136 (2<sup>10</sup>) e G 2333 (2<sup>11</sup>). \*raça previamente conhecida.

Estes resultados mostram que esforços devem ser dispendidos visando conhecer o processo de infecção de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* no feijoeiro, o que muito contribuirá para o entendimento dos diferentes sintomas da doença na planta dependendo de qual fase (sexuada ou assexuada) do fungo se utiliza na inoculação.



**FIGURA 2** Sintomas característicos de antracnose no feijoeiro, causada por *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (fase sexual de *C. lindemuthianum*).

### **4.3 Avaliação da similaridade genética**

Neste estudo, foram testados aproximadamente 200 primers, sendo que destes, 33 apresentaram polimorfismo (Tabela 6). Foi obtido um total de 62 bandas polimórficas, em média 1,87 por primer, valor este considerado baixo quando comparado com os valores encontrados em trabalhos nos quais foram utilizados diversos isolados de *C. lindemuthianum* (fase assexuada) (Balardin e Kelly, 1998; Mesquita et al., 1998; Vilarinhos et al., 1985; Otoy et al., 1995; Talamini et al., 2003).

Quanto ao número de bandas necessárias para o estudo da similaridade/dissimilaridade sugerem-se no mínimo, 30 marcadores, para *C. lindemuthianum*, pois, mesmo sendo um eucarioto, este patógeno possui um genoma menor (26 a 41 Mpb; Rodriguez & Redman, 1992) do que outros eucariotos superiores, como o feijão (637 Mpb; Arumuganathan e Earle, 1991), no qual 50 bandas foram consideradas suficientes para um estudo semelhante (Johns et al, 1997; citado por Duarte, 1998). Portanto, o número de bandas polimórficas utilizadas neste trabalho é suficiente para que se proceda a análise de similaridade.

**TABELA 6** Primers utilizados e suas respectivas seqüências de bases, número de bandas polimórficas obtidas para as linhagens genitoras e seus respectivos descendentes.

<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Seqüência (5'-3')</b>	<b>N<sup>o</sup> bandas polimórficas</b>
OPL-15	AAGAGAGGGG	4
OPM-05	GGGAACGTGT	5
OPL-04	GACTGCACAC	4
OPL-07	AGGCGGGAAC	1
OPM-13	GGTGGTCAAG	3
OPM-20	AGGTCTTGGG	3
OPO-10	TCAGAGCGCC	1
OPAR-10	TGGGGCTGTC	1
OPAR-11	GGGAAGACGG	2
OPAR-12	GGATCGTCGC	1
OPAR-13	GGGTCGGCTT	2
OPAS-12	TGACCAGGCA	2
OPAS-3	ACGGTCCAC	1
OPAS-06	GGCGGTTAG	2
OPAS-07	GACGAGCAGG	1
OPAS-08	GGCTGCCAGT	2
OPAS-09	TGGAGTCCCC	2
OPO-20	ACACACGCTG	3
OPBB-19	TTGCGGACAG	1
OPBB-04	ACCAGGTCAC	2
OPM-09	GTCTTGCGGA	2
OPM-15	GACCTACCAC	1
OPM-10	TCTGGCGCAC	1
OPZ-07	CCAGGAGGAC	2
OPAS-13	CACGGACCGA	1
OPM-19	CCTTCAGGCA	2
OPAT-07	ACTGCGACCA	1
OPAO-04	AACAGGGCAG	1
OPAQ-13	GAGTCGGCTG	3
OPAR-03	GTGAGGCGCA	1
OPAT-19	ACCAAGGCAC	1
OPAQ-12	CAGCTCCTGT	1
OPAQ-19	AGTAGGGCCT	2
<b>TOTAL</b>	<b>-</b>	<b>62</b>

Com base nas 62 bandas polimórficas obtidas nos genitores e seus respectivos descendentes, foi construída uma matriz de similaridade genética, utilizando-se o coeficiente de Sorence e Dice. E também foi construída uma matriz para cada asco individualmente.

Para melhor visualização das estimativas de similaridade genética, realizou-se o agrupamento dos mesmos utilizando o método UPGMA, os quais são apresentados nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Levando-se em consideração a análise de similaridade e o agrupamento de todos os ascos e respectivos ascósporos (Figura 3), percebe-se que a similaridade genética entre os ascos variou de 66% a 77%. Com relação à similaridade dos ascos avaliados e os respectivos parentais, pôde-se observar que, em geral, os 40 ascósporos descendentes avaliados estão geneticamente mais próximos ao parental 2 (linhagem 42), pois apresentaram 63% de similaridade genética com este parental. Já com o parental 1 (linhagem B1), a similaridade genética foi de 49%. Constatou-se, portanto, que estes valores estão próximos a 50%, o que comprova que os descendentes avaliados são produtos da meiose a partir do cruzamento entre as linhagens genitoras. Isto evidencia que os marcadores RAPD utilizados permitiram a identificação de recombinantes oriundos do cruzamento entre as linhagens de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. Silva (1996), em um estudo de caracterização genética por RAPD de recombinantes em *Trichoderma pseudokoningii*, verificou também a eficiência da técnica, observando uma similaridade genética de 70,2% dos recombinantes com o parental aos quais eles mais se assemelhavam.

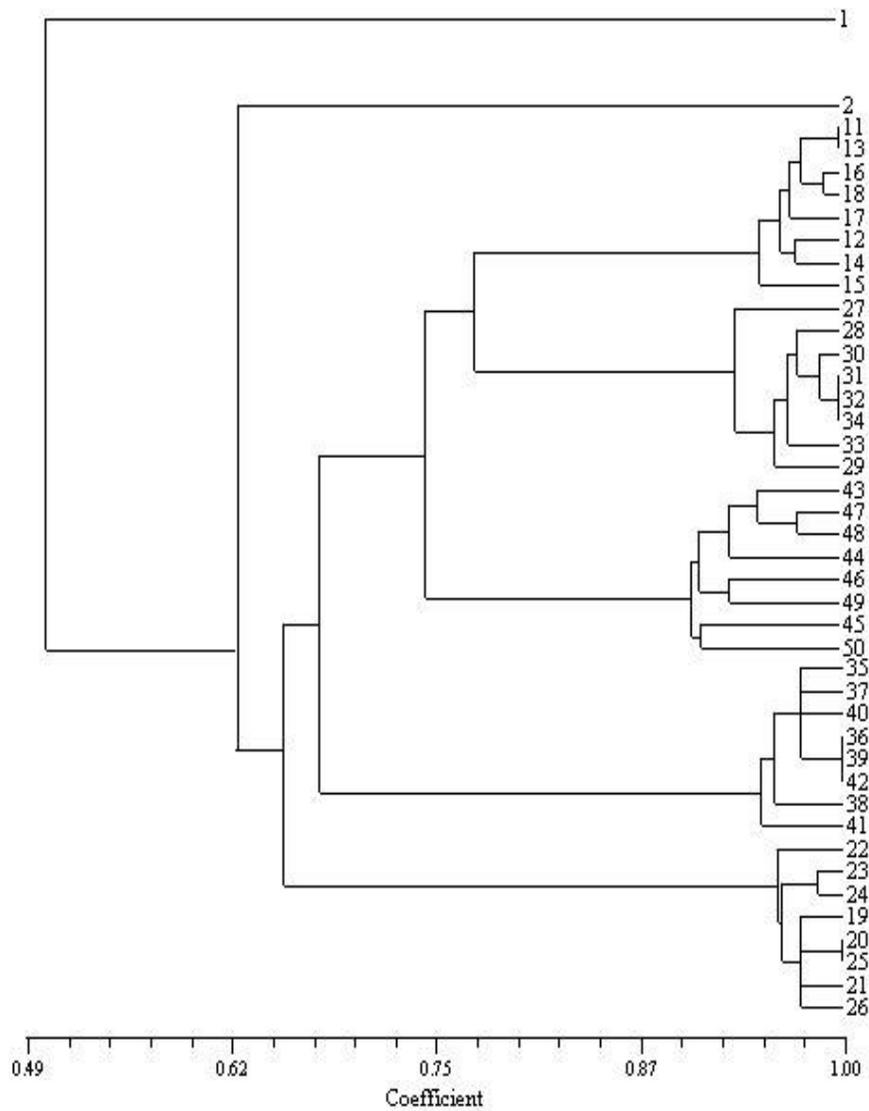
É importante enfatizar que o marcador morfológico cor da colônia não permitiu identificar os recombinantes, pois todos os 40 descendentes apresentaram colônias de coloração escura, semelhante ao parental 2 (linhagem 42).

Chama a atenção que os ascósporos descendentes foram agrupados dentro de seus respectivos ascos (Figura 3). Considerando que *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* apresenta 4 cromossomos ( $n = 4$ ), são possíveis 8 orientações diferentes na metáfase 1 da meiose. Portanto, provavelmente, estas diferentes orientações não seriam, a princípio, a principal causa da separação dos 5 ascos no dendrograma, uma vez que a amostra de ascos utilizadas foi de apenas 5, ou seja, a probabilidade deste evento ocorrer é de  $(1/8)^5$ . Pode-se especular que a provável causa desta distinção clara entre os ascos deve-se a recombinação intracromossômica (permuta genética, elementos transponíveis, etc.), que teria provocado alterações nos sítios de anelamento dos primers. Além disso, a recombinação intercromossômica não alteraria os sítios de anelamento dos primers. É importante ressaltar que se cada orientação apresentar  $S_{ij}$  diferente, isso indica que mecanismos intracromossômicos são provavelmente aleatórios, gerando  $S_{ij}$  específico para cada asco, o que também explicaria a pequena divergência observada dentro de cada asco, ou seja, entre os ascósporos “irmãos” (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Considerando que as 62 bandas polimórficas estejam distribuídas aleatoriamente nos quatro cromossomos, esperavam-se, em média, aproximadamente 15 locos de RAPD por cromossomo. A recombinação intracromossômica entre estes locos seria responsável pela maior parte da geração de variabilidade genética entre os descendentes, o que permitiu a perfeita distinção entre os ascos analisados. Estes resultados mostram o potencial de variabilidade genética que pode ser obtido pela reprodução sexuada em *G. cingulata* f. p. *phaseoli*. Variabilidade que é somada à distribuição independente.

Na literatura, há relatos sobre a tentativa de obtenção de recombinantes de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (Kimati & Galli, 1970; Batista & Chaves, 1982; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996, Mendes-Costa, et al. 2004, não publicado).

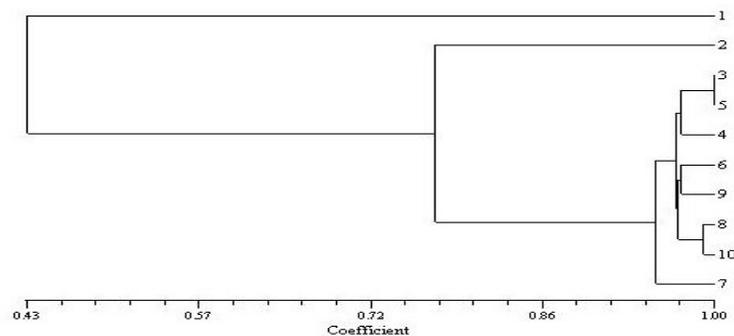
No trabalho de Kimati & Galli (1970), não ficou comprovada a obtenção de recombinantes por meio da reprodução sexuada, enquanto que Batista & Chaves (1982) relataram a formação de novas raças de *C. lindemuthianum* após a hibridização sexual. Já Bryson (1990), por meio de marcadores isoenzimáticos, identificou genótipos recombinantes, indicando que o cruzamento/fertilização ocorreu durante a reprodução sexual nas culturas de *C. lindemuthianum* misturadas. No entanto, a fertilidade dos cruzamentos foi tão baixa que a segregação em ascos individuais ou peritécios não foi possível. Dentre estes trabalhos, apenas Mendes-Costa et al. 2004 (não publicado) conseguiram evidências de obtenção de recombinante.



**FIGURA 3** Análise de agrupamento (dendrograma) referente aos 5 ascos e seus respectivos ascósporos micromanipulados, baseada na similaridade genética entre os mesmos e os prováveis parentais.

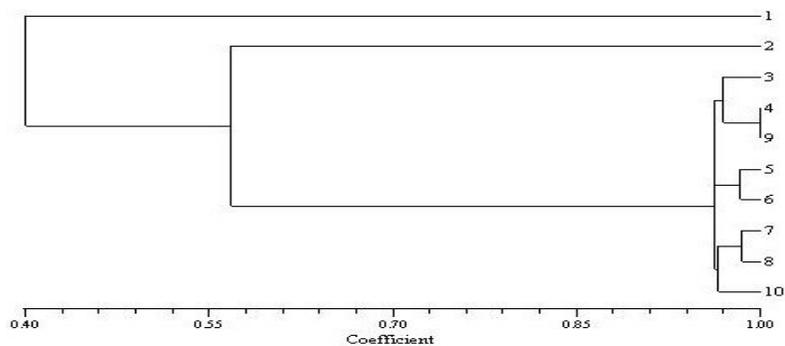
Para melhor visualização dos resultados, optou-se por fazer uma análise de similaridade individual para cada asco, como se observa nas Figuras de 6 a 10.

Para o asco 1 (Figura 4), evidenciou-se uma similaridade de 78% com o parental 2 (linhagem 42) e 43% com parental 1 (linhagem B1).



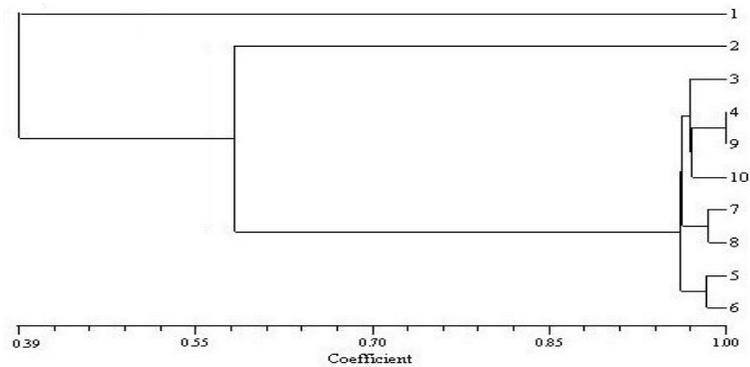
**FIGURA 4** Dendrograma de similaridade genética relativa ao asco 1 com as linhagens B1 e 42.

O asco 2 (Figura 5), apresentou uma similaridade de 58% com o parental 2 (linhagem 42) e 40% com o parental 1 (linhagem B1).



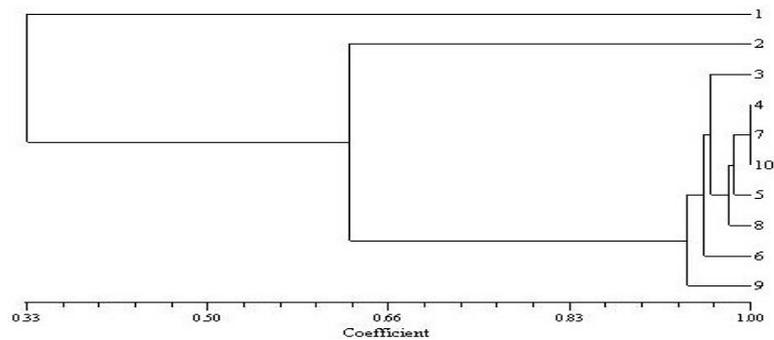
**FIGURA 5** Dendrograma de similaridade genética relativa ao asco 2 com as linhagens B1 e 42.

Em relação ao asco 3 (Figura 6), pode-se observar uma similaridade de 61% dos ascósporos com o parental 2 (linhagem 42) e 39% com parental 1 (linhagem B1).



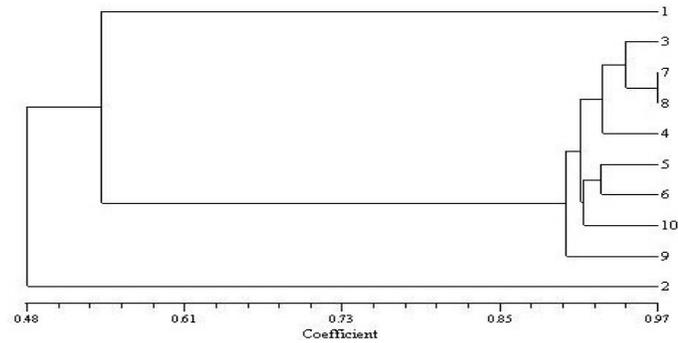
**FIGURA 6** Dendrograma de similaridade genética relativa ao asco 3 com as linhagens B1 e 42.

Para o asco 4 (Figura 7), o dendrograma revela que os recombinantes são similares em 63% ao parental 2 (linhagem 42) e apresentam 33% de similaridade com o parental 1 (linhagem B1).



**FIGURA 7** Dendrograma de similaridade genética relativa ao asco 4 com as linhagens B1 e 42.

Conforme se observou, o asco 5 (Figura 8) apresentou uma similaridade de 48% dos ascósporos com o parental 2 (linhagem 42) e 55% com o parental 1 (linhagem 42).



**FIGURA 8** Dendrograma de similaridade genética relativa ao asco 5 com as linhagens B1 e 42.

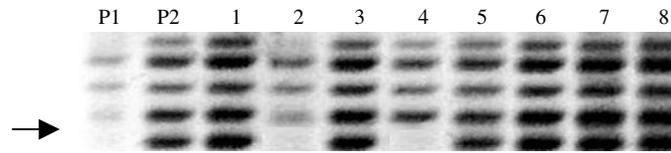
Como se pode observar nas figuras anteriores, apenas o asco 5 esteve mais próximo ao parental 1 (linhagem B1), devido às segregações dos seus respectivos ascósporos que mantiveram os padrões de tal linhagem, porém nenhum se agrupou com um dos parentais. Confirma-se assim que todos os ascos avaliados são provenientes da hibridação sexual entre as linhagens B1 e 42. Além disso, as estimativas de similaridade obtidas para todos os ascos com seus genitores encontram-se dentro dos limites inferior e superior dos intervalos de confiança estimados (Tabela 7), mostrando que os ascósporos de um mesmo asco são semelhantes entre si e divergentes em relação aos parentais (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

**TABELA 7** Estimativas da similaridade genética de cada asco com as linhagens parentais e seus respectivos intervalos de confiança.

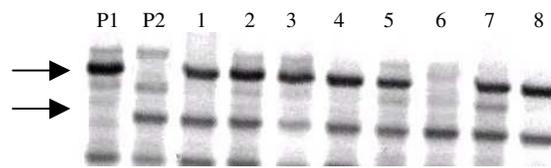
ASCO	P1 (linhagem B1)	P2 (linhagem 42)	Erro Médio
1	(0,32-0,43-0,54)**	(0,67-0,78-0,89)**	0,03648
2	(0,27-0,40-0,53)**	(0,45-0,58-0,71)**	0,0448
3	(0,27-0,39-0,50)**	(0,49-0,61-0,73)**	0,0405
4	(0,20-0,33-0,46)**	(0,50-0,63-0,76)**	0,0437
5	(0,40-0,55-0,70)**	(0,33-0,48-0,63)**	0,0525

\*\* Significativo ao nível de 5% pelo teste de t.

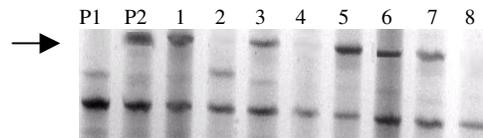
Observa-se que de um modo geral (Figuras 9 a 12), ocorreram segregações aberrantes na descendência de ascos individuais quando se avalia um único loco de RAPD. Na literatura, tem sido relatada a ocorrência destas segregações aberrantes em *Neurospora*, *Sordaria* e *Ascobolus immersus* (Olive, 1963; Lamb & Wickramaratne, 1973; Kitani et al., 1962; Mitchell, 1955), trabalhos nos quais foram utilizados marcadores morfológicos e nutricionais. Estes resultados encontrados foram explicados a partir da teoria da conversão gênica, que se mostrou associada à recombinação, pois ascos com segregação anormal apresentaram permuta. Azevedo (1998) realizou uma revisão sobre o assunto e comentou que estas segregações aberrantes foram muito frequentes para serem explicadas apenas por mutação e, mesmo se fosse mutação, ela deveria ser dirigida.



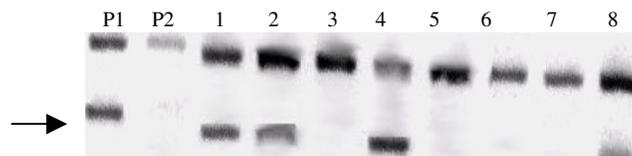
**FIGURA 9** Padrão de bandas RAPD com o primer OPL-14, na análise do asco 3 com os parentais, evidenciando uma segregação 6:2.



**FIGURA 10** Padrão de bandas RAPD com primer OPAR-3, na análise do asco 1 com os parentais, evidenciando uma segregação de 7:1.



**FIGURA 11** Padrão de bandas RAPD com primer OPO-20, na análise do asco 3 com os parentais, evidenciando uma segregação de 5:3.



**FIGURA 12** Padrão de bandas RAPD com primer OPL-4, na análise do asco 5 com os parentais, evidenciando uma segregação de 4:4.

Há, na literatura, muitos outros trabalhos relacionados a este assunto, porém, nenhum lançou mão de marcadores moleculares, apenas marcadores morfológicos e fisiológicos (Roman, 1958; Case & Giles, 1959, 1964; Strickland, 1958; Marcou, 1969; Gutz, 1971; Abla, 1994; Lamb & Zwolinski, 1992; Lamb, 1996; Detloff et al., 1991; Whit & Petes, 1993; Malone, 1992; Kolodkin, Klar & Stahl, 1986), superestimando assim segregações consideradas como normais (4:4; 2:2:2:2). Porém, mais sobre o assunto necessita ser pesquisado e analisado.

Tomando-se como exemplo a Figura 10, verifica-se a ocorrência de recombinantes para os dois locos de RAPD indicados. Todos os descendentes, exceto o seis, apresentam bandas dos dois parentais, evidenciando a ocorrência de recombinantes.

Deve ser mencionado que, na literatura, existem poucos relatos sobre a obtenção de recombinantes de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* e, nestes casos, não ficou comprovado que os descendentes obtidos eram realmente provenientes de cruzamentos. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a hipótese levantada por Bryson et al. (1992), de que a assexualidade em *C. lindemuthianum* tem sido exagerada, principalmente devido à pequena amostra de isolados avaliados, o uso de culturas “velhas”, o fracasso em testar combinações de linhagens e as condições inadequadas da cultura. Portanto, esforços deverão continuar a ser dispendidos na identificação de linhagens que apresentem o ciclo sexual e na obtenção de recombinantes por meio de cruzamentos entre estas linhagens, o que facilitará muito o estudo genético e molecular em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, e também contribuirá para o entendimento dos mecanismos de variabilidade deste patógeno, bem como nos estudos da herança da patogenicidade.

## 5 CONCLUSÕES

- As linhagens 42 e B1 apresentaram-se compatíveis em cruzamento, produzindo peritécios férteis e viáveis.

- Os resultados obtidos indicam que o fungo *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* é pseudo-homotático.

- A obtenção de linhagens férteis permitirá estudos genéticos e moleculares em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

- Os marcadores RAPD permitiram identificar recombinantes do cruzamento entre as linhagens 42 e B1 de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLA, T. S. A. **Recombination mechanisms in *Ascobulus immersus*: a quantitative study of gene conversion at the w1 locus, with reference to conversion control factor 2.** 1994. Theis (Ph. D.) - London University, Imperial College.
- ARCE-MONTOYA, M.; SANCHES-GARZA, M.; SIMPSON, J. Polimorfismo en el cariotipo molecular de aislados mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 16, p. 110, 1998.
- ARNAU, J.; HOUSEGO, A. P.; OLIVER, R. P.; The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 438-444, May 1994.
- ARUMUGANATHAN, K.. EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, Athenas, v. 9, p. 208-218, 1991.
- AUFAVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; D. W. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers to Distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2991-2993, Nov. 1992.
- AYLIFFE, M. A.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS, J. G.; PRYOR, A. J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 22, n. 9, p. 1632-1636, May 1994.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 1998. p. 490.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. International/British Society for Plant Pathology, 1992. 388 p.
- BAILEY, J. A.; DEVERALL, B. J. Formation and activity of phaseollin in the interaction between bean hypocotyls (*Phaseolu vulgares*) and physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 1, n. 4, 435-449, 1971.

BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 6, p. 1038-1047, Nov. 1998.

BARRUS, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, St. Paul, v. 1, p. 190-195, 1911.

BATISTA, U. G.; CHAVES, G. M. Patogenicidade de culturas monoascospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 285-293, 1982.

BIDOCHKA, M. J.; McDonald, M. A.; LEGER, R. J. St.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 107-113, Feb. 1994.

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

BOS, C. J. **Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi**. 1985. 156 p. Thesis (PhD.)- Agricultural University of Wageningen.

BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*** . PhD Thesis, University of Birmingham. 1990.

BRYSON, R. J.; CATEN, C. E.; HOLLOMON, D. W.; BAILEY, J. A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum* . In: BAILEY, J. A; JEGER, M. G. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: C. AB. International, 1992. p. 27-46.

CASE, M. E.; GILES, N. H. Allelic recombination in *Neurospora*: tetrad analysis of a three-point cross within the pan-2 locus. **Genetics**, v. 49, n. 3, 529-540, 1964.

CASE, M. E.; GILES, N. H. Recombination mechanisms at the *pan-2* locus in *Neurospora crassa*. **Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology**, Baltimore, v. 23, p. 119-135, 1959.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Informe anual de 1988. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Programa de Frijol**. Cali, 1988. p. 128-129. (CIAT. Documento de trabajo, 72).

CHARRIER, A.; BANNEROT, J. Contribution a l'étude des races physiologiques de l'antracnose du haricots. **Annales Phytopathologiques**, Paris, v. 2, p. 489-506, 1970.

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

CHEN, X.; LINE, R. F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation And DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, n. 12, p. 1489-1497, Dec. 1993.

CHILTON, S. J. P.; LUCAS, G. B.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella*. III. Crosses with a conidial strain. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 32, n. 9, 549-554, Sept. 1945.

CORREL, J. C.; RHOADS, D. D.; GUERBER, J. C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, n. 11, p. 1199-1204, Nov. 1993.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390 p.

DETLOFF, P.; SIEBER, J.; PETES, T. D. Repair of specific base pair mismatches formed during meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 737-745, Feb. 1991.

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

DURAND, N.; REYMOND, P.; FÉVRE, M. Randomly amplified polymorphic DNAs assess recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. **Current Genetics**, Berlin, v. 24, n. 5, p. 417-20, Nov. 1993.

ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Berlin: Springer Verlag, 1967. 500 p.

FRANCIS, D. M.; CLAIR, D. A. St. Outcrossing in the homothalic oomycete, *Pythium ultimum*, detected with molecular markers. **Current Genetics**, Berlin, v. 24, n. 1/2, p. 100-106, July/Aug. 1993.

GRIFFITHS, A. J. F. Natural Plasmides of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 4, p. 673-685, Dec. 1995.

GUTZ, H. Site specific induction of gene conversion in *Schizosaccharomyces pombe*, **Genetics**, Baltimore, v. 69, n. 3, p. 317-337, 1971.

HAMELIN, R. C.; OUELLETTE, G. B.; BERNIER, L. Identification of *Gremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1752-1755, July 1993.

HU, J.; QUIROS, E. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell reports**, Berlin, v. 10, n. 10, p. 505-511, Dec. 1991.

ISHIKAWA, I. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. C. Polimorfismo cromossômico do *C. lindemuthianum* agente causal da Antracnose do feijoeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 2003. CD-ROM

JOHNS, M. A.; SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J.; KINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUÑOZ-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 2, p. 605-613, Mar./Apr. 1997.

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

KEIM, P.; DIERS, B. W.; OLSON, T. C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, Baltimore, v. 126, n. 3, p. 735-742, Nov. 1990.

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

KOLODKIN, A. L.; KLAR, A. J. S.; STAHL, F. W. Double-strand breaks can initiate meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, Casmbridge, v. 46, n. 5, p. 733-740, Aug. 1986.

LAMB, B. C. The nine-parameter gene conversion model: simpler equations, validity tests, and multiple fits. **Genetics**, Baltimore, (in press), 1996.

LAMB, B. C.; ZWOLINSKI, S. A. New equations and a method for finding nine parameter values for two alleles at one locus to study gene conversion, using *Ascobolus immersus*, **Genome**, Ottawa, v. 35, n. 3, p. 421-427, June 1992.

LUCAS, G. B. Genetics of *Glomerella*. IV. Nuclear phenomena in the ascus. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 33, n. 10, p. 802-806, Oct. 1946.

MALONE, R. E.; BULLARD, S.; LUNDQUIST, S.; KIM, S.; TARTOWISK, T. A meiotic gene conversion gradient opposite to the direction of transcription. **Nature**, London, v. 359, n. 6391, p. 154-155, sept.

MARCOU, D. Sur la nature des recombinaisons intracistroniques et sur leurs répercussions sur la ségrégation de marques extérieurs chez le *Podospora anserina*. Comptes Rendro He domadaires des séances. **Academia des Sciences**, Paris v. 269, p. 2362-2365, 1969.

MCGAHEN, J. W.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, n. 8, p. 610-617, Aug. 1951.

MEDEIROS, J. Aspectos da biologia de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulde. & Scherenk (Forma anamórfica *Colletotrichum gloesporioides* Penz). 1988. 80 p. Dissertação -(Mestrado em Botânica) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergillii* based on random amplified polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, v. 3, n. 4, p.323-329, Apr. 1993.

MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* I. Sexual compatibility. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão preto, v. 19, n. 3, C230, p. 350, 1996. (Suplemento do Congresso Nacional de Genética, 42, Caxambu, 1996).

MENDES-COSTA, M. C.; DAVIDE, L. C.; ROCA, G. M. Cytology of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, no prelo.

MESQUITA, A. G. G. Universidade Federal de Viçosa. **Análise molecular de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* por marcadores RAPD**. 1997. 51 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MILCHELMORE, R. H.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetics analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MITCHELL, M. B. Aberrant recombination of pyridoxine mutants of *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America**, Washington, v. 41, n. 11, p. 215-220, 1955.

MOLANO, P. J. T.; OTOYA, M. M.; PASTOR-CORRALES, M. A. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*, el patogeno de la antracosis del frijol, en Antioquia. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fe de Bogota, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1995.

OLIVE, L. S. Genetics of homothallic fungi. **Mycologia**, New York, v. 55, n. 1, p. 93-104, Jan./Feb. 1963.

OLIVEIRA, E. A.; ANTUNES, I. F.; COSTA, J. G. C. **Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina de 1968 a 1972**. Pelotas: IPEAS, 1973. 55 p.

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

PASTOR-CORRALES, M. A. Variación de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, 1992. p. 212-239. 1992. (Documento de trabajo 113).

PLUMMER, K. M.; DUNSE, K.; HOWLETT, B. J. Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 42, n. 1, p. 1-8, 1994.

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.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. D.; WILLIAMS, J. G. K. RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. **Ag/Biotech News Informatio**, v. 3, p. 645-648, 1991.

RAVA, A. C.; SARTORATO, PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras do feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, jun. 1994.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 388-391, set. 1993.

ROCA, M. M. G. **Recombinación genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios**. 2002. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

- RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Molecular transformation and Genome Analysis of *Colletotrichum* (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C. AB. International, 1992. p. 47-65.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual A6**, p. 1110, 1988.
- ROMAN, H. Sur les recombinaisons non réciproques chez *Saccharomyces cerevisiae* et sur les problèmes posés par ces phénomènes. **Annales de Génétique**, Paris, v. 1, n. 1, p. 11-17, 1958.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem**. version 1. 70. New York, 1992. 470 p.
- SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. de O. et al. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafós, 1988. p. 457-477.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; YOKOYAMA, M. **Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1983. 53 p.
- SHEAR, C. L.; WOOD, A. K. **Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella***. U. S. D. A. Bureau of Plant Industry, 1913. 110 p. (Bulletin, n. 252).
- SILVA, IARA FINO. **Característica genética por RAPD de recombinantes em *Trichoderma pseudokoningii***. 1996. 108 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- STRICKBERGER, M. W. **Genetics**. 2. ed. New York: MacMillan, 1976. 914 p.
- STRICKLAND, W. N. An analysis of interference in *Aspergillus nidulans*. **Proceeding of the Royal Society**, London v. 149, p. 82-101, 1958.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. G. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C. AB. International, 1992. p. 1-26.

- TALAMINI, V. **Progresso espacial e temporal da antracnose a partir de diferentes níveis de inoculo inicial em sementes de feijoeiro**. 2003. 144 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- VALENT, B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics**, Baltimore, v. 127, n. 1, p. 87-101, Jan. 1991.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231 p.
- VILARINHOS, A. D.; PAULA JR, T. J.; BARROS, E. G. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by random amplified Polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 194-198, 1985.
- WALKER, J.; NIKANDROW, A.; MILLAR, G. D. Species de *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 1175-1193, 1969.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.
- WHEELER, H. E. Genetics and evolution of heterotalismo in *Glomerella*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 44, n. 7, p. 342-345, July 1954.
- WHEELER, H. E. Linkage groups in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 43, n. 1, p. 1-6, Jan. 1956
- WHEELER, H. E.; MCGAHEN, J. W. Genetics of *Glomerella* X. Genes affecting sexual reproduction. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 39, n. 2, p. 110-119, Feb. 1952.
- WHEELER, H. E.; OLIVE, L. S. ERNEST, C. T.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella*. V. crozier and ascus development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, n. 10, p. 722-728, Oct. 1948.
- YERKES, W. D. Jr.; ORTIZ, M. T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. **Phytopathology**, St. Paul, v. 46, p. 564-567,

ZIMAND, G.; VALINSKI, L.; ELAD, Y.; CHET, I.; MANULIS, S. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 5, p. 531-534, May 1994.

## ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas dos parentais e dos ascos avaliados.....55
TABELA 2A	Similaridade genética observada entre as linhagens parentais e entre os ascos oriundos da linha de contato entre as colônias.....59

**TABELA 1 A** Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos parentais e dos ascos avaliados.

Bandas*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
L15a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15c	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15d	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M5a	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M5b	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
M5c	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M5d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
M5e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
L4a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L4b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L4c	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L4d	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L7a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
M13a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13c	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M20a	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20c	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O10a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AR10a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AR11a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
AR11b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR12a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AR13a	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AR13b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
AS12a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AS12b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AS3a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AS6a	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS6b	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AS7a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AS8a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AS8b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AS9a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

CONTINUA...

**TABELA 1A CONT.**

Bandas*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
AS9b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
O20a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O20b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O20c	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BB19a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
BB4a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
BB4b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M9b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
M15a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
M10a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z7a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Z7b	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AS13a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M19a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
M19b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
AT7a	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AO4a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ13a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
AQ13b	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ13c	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR3a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AT19a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
AQ12a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ19a	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AQ19b	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

CONTINUA...

**TABELA 1A CONT.**

Bandas*	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
L15a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
L15d	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
M5a	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M5b	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M5c	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M5d	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
M5e	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L4a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
L4b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
L4c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
L4d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
L7a	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
M13b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M20a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
M20c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O10a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
AR10a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AR11a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR11b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AR12a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AR13a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AR13b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS12a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
AS12b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
AS3a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AS6a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS6b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS7a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AS8a	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AS8b	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AS9a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONTINUA...

**TABELA 1A CONT.**

Bandas*	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
AS9b	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O20a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
O20b	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O20c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
BB19a	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BB4a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BB4b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
M9a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M9b	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M15a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z7a	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z7b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AS13a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
M19a	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
M19b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AT7a	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1
AO4a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ13a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
AQ13b	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
AQ13c	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AR3a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AT19a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
AQ12a	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
AQ19a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\* Cada banda identificada pelo nome do primer seguida de uma letra do alfabeto. A letra "a" corresponde a banda de maior tamanho e as demais letras em ordem alfabética, indicam as bandas de tamanhos decrescentes.

**TABELA 2A** Similaridade genética observada entre as linhagens parentais e entre os ascos oriundos da linha de contato entre as colônias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	100																					
2	0	100																				
3	49	76	100																			
4	50	75	97	100																		
5	49	76	100	97	100																	
6	49	76	96	97	96	100																
7	41	76	95	94	95	95	100															
8	49	81	98	97	98	96	95	100														
9	47	76	97	96	97	95	96	97	100													
10	50	77	97	96	97	95	94	99	96	100												
11	44	75	67	68	97	69	67	69	70	68	100											
12	45	75	70	71	67	72	68	72	71	71	96	100										
13	47	56	67	68	70	69	65	69	68	68	96	96	100									
14	44	57	65	67	67	68	63	68	66	66	95	95	98	100								
15	45	53	68	70	65	71	66	71	69	69	95	95	95	96	100							
16	47	54	70	71	68	72	68	72	71	71	96	97	96	95	98	100						
17	44	58	70	71	70	72	68	72	71	71	96	100	96	95	95	97	100					
18	43	57	70	71	70	72	68	72	71	71	96	97	96	95	95	97	97	100				
19	45	57	73	74	70	75	73	72	76	71	67	68	65	65	63	65	68	69	100			
20	45	57	79	80	73	81	80	73	82	78	65	66	67	64	62	64	66	66	93	100		
21	45	59	78	80	79	80	79	79	81	77	67	68	65	65	64	65	68	68	93	96	100	
22	51	63	75	77	78	77	76	78	78	74	63	64	67	61	59	61	64	64	93	96	95	
23	53	60	77	78	75	79	77	75	80	75	64	65	63	63	61	63	65	65	73	96	96	
24	58	63	77	78	77	79	77	77	80	75	64	65	64	63	61	63	65	65	70	97	96	
25	52	60	74	78	77	76	74	77	77	73	66	67	64	64	63	64	67	67	68	95	94	
26	52	62	77	75	74	79	77	74	80	75	64	65	66	63	61	63	65	65	66	97	96	
27	36	60	69	70	65	72	70	75	70	63	66	68	67	62	63	65	67	64	70	76	73	
28	38	62	67	68	67	75	72	77	68	65	68	69	68	63	64	66	69	66	68	73	70	
29	37	63	68	69	68	72	73	70	69	66	66	67	66	64	62	64	67	64	66	72	68	
30	37	58	64	65	64	70	69	67	65	65	67	68	67	65	63	65	65	65	70	70	66	
31	37	62	67	68	67	69	72	68	68	65	68	69	68	65	64	66	69	65	68	73	70	
32	36	60	65	67	65	72	70	66	66	64	69	67	69	66	65	67	63	66	69	72	68	
33	37	64	68	70	68	70	73	68	69	67	64	65	64	67	63	65	55	67	69	72	69	
34	54	62	67	68	67	72	72	67	68	65	68	69	68	62	64	66	69	62	69	73	70	
35	49	56	77	76	77	77	75	75	76	73	64	63	64	66	61	63	63	66	70	79	76	
36	54	55	72	71	72	72	72	70	71	68	57	55	57	62	53	55	55	63	76	76	73	
37	53	51	76	75	76	74	74	74	75	72	62	60	62	55	58	66	60	55	73	73	70	
38	53	53	75	74	75	73	73	73	74	71	58	60	58	56	55	57	60	60	73	75	71	
39	55	54	76	75	76	76	74	73	74	72	62	61	62	60	59	61	61	57	75	78	74	
40	53	58	76	77	76	78	76	76	77	75	66	64	66	64	63	64	64	57	77	80	77	
41	53	55	72	73	72	72	72	72	73	71	60	59	60	58	57	59	59	61	75	76	73	
42	58	48	71	71	71	71	69	69	70	68	59	57	59	57	55	57	57	59	78	75	72	

CONTINUA...

**TABELA 2A CONT.**

	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	
<b>22</b>	100																					
<b>23</b>	95	100																				
<b>24</b>	98	100	100																			
<b>25</b>	98	97	97	100																		
<b>26</b>	96	100	100	97	100																	
<b>27</b>	98	76	76	75	70	100																
<b>28</b>	74	72	72	72	76	95	100															
<b>29</b>	71	71	71	70	72	93	98	100														
<b>30</b>	69	69	69	68	71	96	96	95	100													
<b>31</b>	67	72	72	72	69	95	100	98	96	100												
<b>32</b>	71	71	71	70	72	92	98	96	95	98	100											
<b>33</b>	69	72	72	71	71	96	95	93	92	95	93	100										
<b>34</b>	70	72	72	72	72	68	100	98	96	100	98	95	100									
<b>35</b>	71	76	76	75	76	67	64	62	60	64	65	63	64	100								
<b>36</b>	75	73	73	72	73	63	63	64	59	63	64	62	63	93	100							
<b>37</b>	72	70	70	69	70	62	59	60	55	59	60	58	59	91	89	100						
<b>38</b>	71	71	71	71	71	66	58	59	54	58	56	60	58	90	91	92	100					
<b>39</b>	72	75	75	74	75	66	62	60	58	62	63	64	62	96	94	90	94	100				
<b>40</b>	76	78	78	77	78	70	66	64	62	66	67	68	66	93	91	88	92	97	100			
<b>41</b>	74	73	73	72	73	67	63	64	59	63	64	65	63	86	90	88	93	90	93	100		
<b>42</b>	73	72	72	72	72	63	59	57	55	59	60	58	59	91	89	91	92	93	90	88	100	