



**PAULO ROBERTO CARVALHO GONÇALVES**

**CARIOTIPAGEM DE LINHAGENS DE**  
*Colletotrichum lindemuthianum* E *Glomerella* spp.  
**ISOLADAS DE LESÕES DE ANTRACNOSE NO**  
**FELJÓEIRO**

**LAVRAS-MG**

**2016**

**PAULO ROBERTO CARVALHO GONÇALVES**

**CARIOTIPAGEM DE LINHAGENS DE *Colletotrichum lindemuthianum* E  
*Glomerella* spp. ISOLADAS DE LESÕES DE ANTRACNOSE NO  
FEIJOEIRO**

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

Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS - MG**

**2016**

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

Gonçalves, Paulo Roberto Carvalho.

Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro / Paulo Roberto Carvalho Gonçalves. – Lavras : UFLA, 2016.

67 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. cariotipagem. 2. polimorfismo cromossômico. 3. arquitetura do genoma. 4. GTBM. 5. PFGE. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**PAULO ROBERTO CARVALHO GONÇALVES**

**Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella*  
spp. isoladas de lesões de antracnose no feijoeiro**

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

APROVADA em 15 de setembro de 2016.

Dra. Marisa Vieira de Queiroz UFV

Dra. Maria Cristina Mendes Costa UNILAVRAS

Dr. Eustáquio Souza Dias UFLA

Dra. Roselaine Cristina Pereira UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Aparecida de Souza  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

*À minha irmã Maria*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, pela educação e exemplo de honestidade. Por me fazer ver a vida com olhos simples.

À minha mãe, pelo amor, amizade e exemplo de determinação. Por investir no meu sucesso profissional e por ser sempre minha maior motivação de seguir em frente. Tenho sorte e orgulho por ser seu filho.

Aos meus irmãos, pelo apoio, compreensão e por sempre acreditarem no meu potencial. Mesmo distantes, serão sempre meus melhores amigos.

À minha irmã Maria, por ser o amor mais puro que a vida poderia oferecer à minha família. Por me ensinar o verdadeiro significado de inocência, e por despertar em mim o interesse pela Genética.

À minha avó e madrinha Ida (*in memoriam*), por ter feito minha vida sempre mais feliz e mais gostosa, e pelo aconchego ainda insubstituível.

Aos meus avós, Paulo e Lourdes, pelo exemplo de persistência e pelo amor incondicional.

À toda minha família, pelo carinho, pela colaboração na formação do meu caráter e por representarem o alicerce em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de fazer parte deste curso de excelência, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidad de Cádiz, pela oportunidade concedida em realizar meu doutorado-sanduíche. Aos professores Carlos Garrido e María Carbú, por me acolherem e colaborarem com a realização deste trabalho.

À professora Elaine Aparecida de Souza, pela orientação, confiança, paciência, e por ser grande colaboradora em meu amadurecimento profissional. Tenho muita admiração por sua competência, seja como professora ou pesquisadora.

Aos membros da banca desta tese, pelo aceite em participar da defesa, por cada contribuição dada a este trabalho, e por se fazerem presentes nesse momento único da minha carreira.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela co-orientação, por representar um exemplo de profissional e ter sido meu primeiro mestre.

Aos professores Eduardo Alves, Rosane Schwan e Vânia Techio, por concederem espaço em seus laboratórios para a realização deste trabalho, e por todas as contribuições dadas.

Aos meus amigos-irmãos Ana Flávia, Cissa, Isabela, Marcondes, Nádia e Simoni, por me mostrarem o significado real de amizade, pela presença nos momentos mais especiais e difíceis da minha vida e por deixarem meus dias mais leves e felizes. Vocês me fazem sentir especial e estiveram ao meu lado nos últimos anos incondicionalmente. Espero poder retribuir todo esse amor e dedicação. Vocês enchem meu coração de amor e gratidão. Amor de amigo é amor que completa a gente.

Aos meus amigos Margot, Carol, Roxane e Zina, pela amizade, companheirismo e ajuda em todos os momentos e por fazerem cada dia de sufoco valer a pena. Espero poder trabalhar junto com vocês um dia.

Ao meu namorado Kaio, por ser um grande companheiro e conselheiro, por ter me incentivado em cada passo na finalização deste trabalho. Sem você eu não teria conseguido.

Aos amigos de república, Pedro, Gustavo e Jefferson, por terem se tornado minha família, pela tolerância e pelos sorrisos até nas minhas horas mais difíceis. Fui muito feliz ao lado de vocês.

Ao Lamartine, por representar uma figura paterna durante todos esses anos, desejando sempre meu sucesso e crescimento. À sua esposa e filhas, por me acolherem como membro da família. Serei eternamente grato.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças da UFPA, pela ajuda e troca de experiências. Com vocês, a rotina de trabalho se tornou mais prazerosa.

Ao Miller, pelo exemplo de bom profissional, por cada incentivo e ajuda diária, e por contagiar a todos com seu bom humor, tornando o ambiente de trabalho mais divertido.

À Rose, por ter sido grande colaboradora em todas as etapas deste trabalho, por cada conselho e palavra amiga.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia, especialmente Dona Irondina, Lílian e Dona Sebastiana (*in memoriam*), pelo carinho e pelo sorriso sempre presente.

Ao Márcio Guedes, pela ajuda sempre imediata.

A todos os amigos que fiz nesses últimos dez anos de Lavras e de UFPA, pela torcida e por fazerem parte da minha história. Aos amigos de uma vida toda, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

A todos que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista em minha vida, o meu muito obrigado!



## RESUMO

Isolamentos realizados a partir de lesões de antracnose do feijoeiro-comum têm permitido a obtenção de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. Estudos vêm demonstrando a partir de caracterizações morfológicas, moleculares e citológicas, a extensa variabilidade presente nessas espécies, bem como a separação das mesmas em clados distintos. No entanto, não há informações quanto ao número cromossômico e à existência de polimorfismo entre as diferentes linhagens dessas espécies. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar o número cromossômico de diferentes linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro e verificar a presença de polimorfismo cromossômico entre as linhagens das duas espécies e a ocorrência de cromossomos acessórios. Para isso, foram utilizadas oito linhagens pertencentes às raças 65, 73, 81, 89 e 2047 de *C. lindemuthianum*, e cinco linhagens de *Glomerella* spp. A obtenção do cariótipo foi feita por meio da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e da análise citológica pelo Método de Rompimento de Tubos Germinativos (GTBM). As técnicas PFGE e GTBM permitiram a cariotipagem das linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. Houve polimorfismo cromossômico entre e dentro das linhagens avaliadas. Nas linhagens de *C. lindemuthianum*, o número cromossômico variou de cinco a 14 cromossomos, enquanto a variação observada para as linhagens de *Glomerella* spp. foi de seis a 12 cromossomos.

**Palavras-chave:** cariotipagem, polimorfismo cromossômico, arquitetura do genoma, GTBM, PFGE.

## ABSTRACT

Isolations from common bean anthracnose lesions have allowed obtaining strains of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Glomerella* spp. Studies have demonstrated from morphological, cytological and molecular characterizations, the extensive variability in these species, separating them into distinct clades. However, there is no information about the chromosome number and the existence of polymorphism among different strains of these species. Thus, this study aimed to obtain karyotypes of different strains of *C. lindemuthianum* and *Glomerella* spp. isolated from anthracnose lesions of bean plants and verify the presence of chromosomal polymorphism between strains of the two species and the occurrence of accessory chromosomes. For this, eight strains belonging to the races 65, 73, 81, 89 and 2047 of *C. lindemuthianum*, and five strains of *Glomerella* spp. were used. To obtain the karyotype of the strains, two complementary techniques were used to characterize chromosomes, the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and the cytological analysis by Germ Tube Burst Method (GTBM). The PFGE and GTBM techniques allowed the karyotyping of strains of both species. There was chromosomal polymorphism between and within the evaluated strains. The chromosome number ranged from five to 14 for the strains of *C. lindemuthianum* and six to 12 for the strains of *Glomerella* spp.

**Key words:** karyotyping, chromosome polymorphism, genome architecture, GTBM, PFGE.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Perfis de bandas obtidos para *C. lindemuthianum* na condição de corrida longa para a separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe*.....40
- Figura 2 - Perfis de bandas obtidos para *C. lindemuthianum* na condição de corrida curta para a separação de cromossomos menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisae*.....42
- Figura 3 - Perfis de bandas obtidos para *Glomerella* spp. na condição de corrida longa para a separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe*.....44
- Figura 4 - Perfis de bandas obtidos para *Glomerella* spp. na condição de corrida curta para a separação de cromossomos menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisae*.....45
- Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética utilizando o perfil de bandas obtido para cada linhagem na condição de corrida longa.....46
- Figura 6 - Dendrograma de similaridade genética utilizando o perfil de bandas obtido para cada linhagem nas condições de corrida longa e curta. ....46
- Figura 7 - Cariótipos de linhagens de *C. lindemuthianum*.....48
- Figura 8 - Cariótipos de linhagens de *Glomerella* spp.....49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem, morfologia de conídios, anastomoses entre conídios (%), e taxas de esporulação ( $\times 10^6$ esporos/ml) e germinação (%) de linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> spp. oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro. ....	32
Tabela 2 - Número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem de <i>C. lindemuthianum</i> . ....	42
Tabela 3 - Número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem de <i>Glomerella</i> spp. ....	44
Tabela 4 - Número de cromossomos estimado de acordo com a técnica utilizada (PFGE ou GTBM) de cada linhagem de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> spp. ....	50

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	15
2.2	<i>Glomerella</i> spp.....	17
2.3	Antracnose do feijoeiro-comum .....	20
2.4	A variabilidade em <i>C. lindemuthianum</i> e sua origem.....	23
2.5	Cariotipagem em fungos .....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1	Isolados .....	31
3.2	Método de Rompimento de Tubos Germinativos (GTBM) .....	33
3.3	Coloração por fluorescência e observação em microscopia de fluorescência.....	34
3.4	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) .....	35
4	RESULTADOS.....	39
4.1	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> .....	39
4.2	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de linhagens de <i>Glomerella</i> spp.....	43
4.3	Análise de agrupamento dos cariótipos das linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> spp. ....	45
4.4	Cariótipo de linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> spp. pelo método GTBM .....	47
5	DISCUSSÃO .....	51
6	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), levando à perdas significativas na produção e na qualidade de grãos. A doença é causada pela forma anamórfica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribn., o qual apresenta uma alta variabilidade em suas populações (PINTO et al., 2012). O controle da antracnose geralmente é feito pelo uso de cultivares resistentes, mas a alta diversidade genética das populações do patógeno no Brasil dificulta o desenvolvimento de cultivares com resistência durável.

O *C. lindemuthianum*, tem sido usado, por muitos anos, como base para estudos celulares e moleculares de estruturas de infecção e estabelecimento da infecção hemibiotrófica em fungos, assim como, em estudos das interações planta-patógeno (PERFECT et al., 1999). O teleomorfo de *C. lindemuthianum*, conhecido como *Glomerella lindemuthiana* Shear (syn. *G. lindemuthianum*, *G. cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk f. sp. *phaseoli*), foi descrito pela primeira vez em 1913 por Shear e Wood. Isolamentos realizados a partir de lesões de antracnose têm permitido a obtenção de colônias assexuais, *C. lindemuthianum*, e sexuais, *Glomerella* spp. Essas linhagens foram investigadas por meio de caracterização morfológica, citológica e molecular, bem como, por análises de infecção, e os resultados sugerem que *Glomerella* spp. seja uma nova espécie co-infectando as lesões de antracnose, e não a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* (BARCELOS et al., 2014).

Devido à ocorrência dessas espécies em lesões de antracnose, análises comparativas têm sido desenvolvidas entre linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. A alta diversidade genética encontrada reflete as diferenças na patogenicidade dessas linhagens (MOTA et al., 2016). Na elucidação dessa diversidade genética, estudos citogenéticos em fungos têm fornecido evidências importantes para demonstrar a conexão entre características de patogenicidade e

a estrutura do genoma, o que ainda não tem sido muito explorado no gênero *Colletotrichum*. Este gênero apresenta muitas espécies, mas a cariotipagem tem sido realizada apenas em algumas (PIRES et al., 2015; TAGA et al., 2015).

Em *C. lindemuthianum*, a cariotipagem tem sido realizada por meio de técnicas citológicas, tais como, a visualização dos cromossomos metafásicos em microscopia de luz e o Método de Rompimento de Tubos Germinativos (GTBM). Utilizando a primeira técnica quatro cromossomos meióticos foram observados em *C. lindemuthianum* (ROCA et al., 2003) e sete cromossomos foram visualizados por meio de microscopia de fluorescência (TAGA et al., 2012). Por outro lado, a cariotipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) tem sido utilizada para estimar não só o número cromossômico (CN), bem como o tamanho do DNA cromossomal (chDNA) e a ocorrência de polimorfismo cromossômico (O'SULLIVAN et al., 1998). Há discrepância entre os resultados encontrados nestes estudos, sendo de  $n = 9-12$  por PFGE (O'SULLIVAN et al., 1998);  $n = 4$  a partir de citologia meiótica (ROCA et al., 2003) e  $n = 7$  a partir do GTBM (TAGA et al.; 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar o número cromossômico de diferentes linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp., oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro, bem como verificar a presença de polimorfismo cromossômico entre as linhagens das duas espécies e a ocorrência de cromossomos acessórios.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Colletotrichum lindemuthianum*

O *C. lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav. foi descrito originalmente por Saccardo & Magnus, em 1878, como *Gloeosporium lindemuthianum* (BAILEY; JEGER, 1992), em material coletado por Lindemuth, em Bonn, Alemanha. Posteriormente, Scribner, ao verificar a presença de setas, estruturas filamentosas produzidas entre os conidióforos e as margens dos acérvulos, o transferiu para o gênero *Colletotrichum*. Apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita. Esta última somente foi encontrada sob condições de laboratório (ROCA, 1997).

O *C. lindemuthianum* é uma das espécies mais estudadas do gênero devido à sua importância econômica, como também por possuir uma estratégia de infecção distinta (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985), pela facilidade com a qual pode ser cultivada *in vitro*, e pela viabilidade de um sistema de transformação reprodutível e eficiente (RODRIGUEZ, REDMAN, 1992). Como tal, ele forma um bom sistema-modelo para o estudo de vários aspectos de interações planta-patógeno, incluindo respostas de defesa (BERGMANN et al., 1994); fitoalexinas, enzimas de degradação de parede celular de fungos, e diferenciação de estruturas fúngicas de infecção (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985).

Na fase assexuada, o *C. lindemuthianum* produz esporos (conídios) num corpo de frutificação denominado acérvulo, envolvidos em uma mucilagem hidrossolúvel composta de glicoproteínas de alto peso molecular, algumas das quais ricas em prolina (SUTTON, 1992). Essa mucilagem contém inibidores de germinação, bem como uma variedade de enzimas, e provavelmente funciona como proteção contra a dessecação dos conídios e metabólitos tóxicos de plantas



(NICHOLSON, 1992). Tais conídios são hialinos e unicelulares, podendo ser oblongos e circulares; e o micélio se caracteriza pela presença de septos e ramificações, e sua coloração, à medida que envelhece, varia de hialina à quase negra (WALKER, 1959). Em condições favoráveis à ocorrência da doença, a esporulação é abundante, formando uma massa de conídios de coloração rosada (CHAVES, 1980). Os esporos geralmente são dispersos por respingos de chuva ou irrigação, e rapidamente se aderem às partes aéreas das plantas hospedeiras (NICHOLSON, 1992).

Quando em condições favoráveis, germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o hospedeiro, formando o tubo germinativo, e em seguida o apressório, estrutura melanizada de onde a hifa de penetração se desenvolve. Ao penetrar as células epidérmicas pela cutícula, a hifa de penetração intumescer para formar a vesícula de infecção e uma ampla hifa primária, ao redor da qual a membrana plasmática vegetal se invagina. Ambas as estruturas são rodeadas por uma matriz interfacial, que dificulta o reconhecimento celular pela célula hospedeira. O protoplasto hospedeiro, então, permanece vivo durante todo esse estágio biotrófico de interação. Progressivamente, as hifas primárias colonizam novas células epidérmicas e do mesófilo, se tornando constrictas à medida que atravessam as paredes celulares. A matriz interfacial separando a membrana plasmática vegetal da parede celular fúngica é mantida e as novas células infectadas permanecem vivas por algum tempo. Após 48 horas de infecção e penetração inicial, as hifas secundárias são formadas, as quais não são circundadas pela camada de matriz. Assim, em células contendo hifas primárias e secundárias, a membrana plasmática vegetal e a matriz envolvendo as hifas primárias começam a se desintegrar. As hifas secundárias começam a secretar enzimas de degradação de parede celular antes da sua propagação, e rapidamente criam lesões necrotróficas em expansão (O'CONNELL et al., 1996). O

aparecimento de sintomas pode ser observado a partir do sexto dia após o início da infecção (KIMATI et al., 1997).

## **2.2 *Glomerella* spp.**

O teleomorfo, *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, é raro na natureza, embora a ocorrência de uma fase sexual do fungo em condições de laboratório tenha sido relatada primeiramente há mais de um século por Shear e Wood (1913), que nomearam esta forma como *G. lindemuthiana*. No entanto, Kimati e Galli, em 1970, propuseram o nome *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

Colônias de *G. cingulata* têm sido identificadas a partir de lesões de antracnose em caules, folhas e vagens do feijoeiro, oriundas de isolamentos vindos do campo e mantidas em condições de laboratório (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2010; SOUZA; CAMARGO JUNIOR; PINTO, 2012). Recentemente, Barcelos et al. (2014) trabalharam com a caracterização e filogenia de 68 linhagens isoladas a partir dessas lesões. As colônias foram classificadas em quatro grupos distintos de acordo com a sua morfologia e produção de esporos.

Quanto à caracterização da espécie, sabe-se que a fase sexual produz peritécios, corpos de frutificação com diâmetro que variam de 85 a 300  $\mu\text{m}$ . Dentro dos mesmos, observam-se em média 30 ascos, em formato de bastão ou cilíndricos, de dimensão de 60 x 8  $\mu\text{m}$ , contendo em seu interior de 1 a 8 ascósporos arranjados aleatoriamente (BAILEY; JEGER, 1992). Os peritécios formam-se espontaneamente em meio de cultura, e não apenas por acasalamento (ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003). Os ascósporos não possuem septo, sendo hialinos, fusiformes e curvados. Os mesmos podem ser alantóides (20 x 6,5  $\mu\text{m}$ ) e elipsoidais (10 x 4  $\mu\text{m}$ ) (BAILEY; JEGER, 1992; KIMATI; GALLI, 1970).

O tipo de reprodução tem sido estudado em *Glomerella* spp., e os relatos têm concordado que o gênero não é regulado por apenas um loco mating type, e que há um grande número de mating types compatíveis nas populações, o que indica um grande potencial para acasalamentos (VAILLANCOURT et al., 2000). Apesar de haver relatos da ocorrência de recombinação sexual em muitas linhagens férteis em laboratório, isso ainda não pôde ser observado em campo. Portanto, a contribuição desse processo para a diversidade em populações de *C. lindemuthianum* permanece desconhecida.

No entanto, ao contrário do que se acreditava até então, os resultados de Barcelos et al. (2014) comprovaram que as linhagens de *Glomerella* spp. isoladas de lesões de antracnose não são a forma teleomórfica de *C. lindemuthianum*. Baseado nas sequências de ITS e em análises filogenéticas da região HMG, a maioria das linhagens demonstraram pertencer a um grupo desconhecido, *Glomerella* spp., apresentando hábito epifítico no feijão, onde crescem e esportulam de maneira oportunista em lesões de antracnose, causada pelo *C. lindemuthianum*, evento confirmado em experimentos de co-infecção. Além disso, foi identificado um segundo grupo pertencente ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*, constituídos por patógenos de feijão de baixa virulência, que também se beneficiam das lesões provocadas pelo *C. lindemuthianum*, mas em contrapartida, produzem sintomas brandos nas folhas de cultivares suscetíveis, não sendo observado o mesmo comportamento quando inoculados nas cultivares diferenciadoras (BARCELOS et al., 2014).

Anteriormente, Pinto et al. (2012) já haviam descrito diferenças morfofisiológicas entre linhagens de *Glomerella* spp. e de *C. lindemuthianum*. Foi relatado um crescimento mais rápido em colônias de *Glomerella* spp., bem como, uma germinação conidial com taxas mais elevadas e conídios menores que os de *C. lindemuthianum* (LIU et al., 2013; PINTO et al., 2012). Monoascósporos recuperados de um único peritécio de *Glomerella* spp. deram

origem tanto a linhagens férteis, que produzem ascósporos e poucos ou nenhum conídio, como também a linhagens inférteis que produzem apenas conídios. Nesses estudos, foram descritos ascósporos com tamanho maior que conídios, com germinação mais rápida e mais intensa (BARCELOS et al., 2014). Não foi relatada a formação de tubos de anastomoses entre conídios (CATs) em ascósporos, porém, o fenômeno foi observado em conídios da maioria das linhagens conidiais, com variação na taxa dependendo da linhagem, similar ao observado em linhagens de *C. lindemuthianum* (PINTO et al., 2012). A habilidade da *Glomerella* spp. na produção de progêneses sexuais e assexuais pode conferir vantagens tanto no potencial de recombinação sexual, como uma maior capacidade de sobrevivência e germinação dos esporos sexuais, devido ao seu maior tamanho (provavelmente, por constituir reserva energética); combinado com a aptidão dos esporos assexuais à formação de CATs para recombinação assexual.

Dados moleculares também têm sustentado a divisão entre linhagens de *Glomerella* spp. e *C. lindemuthianum* de feijão. Barcelos et al. (2014) desenharam primers específicos para a sequência HMG de linhagens de *Glomerella* spp., sendo observado uma amplificação do mesmo fragmento para quase todas as linhagens de *Glomerella* spp. Constatou-se que as poucas linhagens que apresentaram uma amplificação imperfeita utilizando-se desse primer consistiam de linhagens conidiais, sendo a maioria delas completamente inférteis em confronto com todas as outras linhagens de *Glomerella* spp. Essas linhagens foram então, agrupadas em um conjunto denominado Grupo II de *Glomerella*, que representa uma população distinta tanto do *C. lindemuthianum*, quanto do restante das linhagens de *Glomerella* utilizadas no estudo, as quais foram agrupadas no chamado Grupo I de *Glomerella*. No Grupo I foi confirmada a ausência de relação com *C. lindemuthianum*, apresentando maior afinidade com o patógeno *C. magna*, espécie que foi distinta dos outros grupos

caracterizados de *Colletotrichum*. Além disso, linhagens do grupo II demonstraram ser do complexo de espécies *C. gloeosporioides*, a partir de caracterização baseada em sequências ITS. Porém, para uma identificação final das linhagens do grupo I e II, é necessária uma análise filogenética mais refinada.

A natureza específica da relação entre linhagens de *Glomerella* e *C. lindemuthianum* em feijoeiro-comum permanece indeterminada, embora existam evidências que sugerem haver uma interdependência das duas espécies. Além disso, a formação de CATs entre linhagens de *Glomerella* spp. e *C. lindemuthianum* tem sido observada (dados não publicados), havendo a possibilidade de troca genética entre os dois organismos, o que pode contribuir no aumento da diversidade das duas espécies. O reconhecimento dessas características no patossistema, associadas com a possibilidade de estudos aprofundados dessas espécies, confere uma nova dimensão ao entendimento do papel de cada organismo e de seus mecanismos na patogenicidade e adaptabilidade dos patógenos, e conseqüentemente, uma importante ferramenta para a pesquisa no melhoramento das plantas hospedeiras.

### **2.3 Antracnose do feijoeiro-comum**

A antracnose do feijoeiro é uma das doenças de maior importância da cultura, pela sua ocorrência nas três épocas de cultivo (CARBONELL et al., 1999). Trata-se de uma doença que possui distribuição ampla, tendo sido constatada em diversos países da África, América, Ásia, Europa e na Austrália. No Brasil, a antracnose prevalece nos principais estados produtores, sobretudo em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VIEIRA et al., 2005). A doença é favorecida por temperaturas moderadas, entre 15 e 22°C, associadas à alta umidade relativa do ar, acima de 95% e precipitação

frequente. Temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 13°C limitam tanto a infecção como o desenvolvimento do fungo. E para que a antracnose ocorra, é necessário que as condições ambientais sejam favoráveis por um período de no mínimo, seis a nove horas (PASTOR-CORRALES; TU, 1994).

O patógeno sobrevive no solo associado a restos de cultura por um a dois anos, mas a maior fonte de inóculo, do ponto de vista epidemiológico, são as sementes infectadas. A disseminação também ocorre por meio de ventos, respingos de águas de chuva e irrigação. Chuvas moderadas e frequentes, bem como, a utilização de cultivares suscetíveis, são necessárias para que a doença ocorra em maior intensidade (PAULA JÚNIOR; WENLAND, 2012). Os danos ocasionados pela antracnose podem ser da ordem de 100%, quando se utilizam sementes infectadas em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Além de diminuir o rendimento da cultura, esta doença também deprecia a qualidade do produto por provocar manchas nos grãos, tornando-os indesejáveis para o consumo (VIEIRA et al., 2005).

Os sintomas podem aparecer em toda a parte aérea da planta, e em todos os estágios de crescimento, a partir de cinco dias de contato com o fungo (CHAVES, 1980), dependendo da fonte de inóculo e da intensidade da doença. Quando a fonte de infecção é a semente, os primeiros sintomas aparecem nas folhas cotiledonares, como lesões necróticas. As lesões foliares ocorrem, inicialmente, na face abaxial, e ao longo das nervuras principais, na forma de pequenas manchas de cor vermelho-alaranjado à púrpura, tornando-se, posteriormente, de cor escura (PASTOR-CORRALES; TU, 1994). A infecção pode ocorrer também na haste da folha, apresentando sintomas de manchas e cancos. Em casos severos, há o enfraquecimento dessas regiões a tal ponto que a folha dobra-se no sítio da lesão. Podem ocorrer também lesões 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 (SARTORATO, 1988; VIEIRA, 1983). Os sintomas mais típicos da doença ocorrem nas vagens e são caracterizados por lesões arredondadas, deprimidas, de tamanho variável e coloração marrom, sendo o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante que, geralmente, possui bordo de coloração vermelho-alaranjada. As lesões podem coalescer e cobrir parcialmente as vagens. Em condições de temperatura e umidade favoráveis, forma-se uma massa de esporos de coloração rosada no centro das lesões (SARTORATO, 1988).

O hipocótilo das plântulas geralmente é infectado por esporos, provenientes dos cotilédones, carregados pela água das chuvas (SARTORATO, 1988; VIEIRA, 1983), podendo apresentar lesões alongadas, superficiais ou deprimidas, podendo até ocorrer o estrangulamento do mesmo e morte da planta conforme a agressividade do patógeno (KIMATI et al., 1997). No pecíolo e no caule, as manchas são geralmente ovaladas, deprimidas e de coloração escura, podendo causar queda das folhas e tombamento da plântula (SARTORATO, 1988; VIEIRA, 1983).

O controle da antracnose do feijoeiro pode ser alcançado pelo uso de práticas culturais, como a utilização de sementes saudáveis e tratadas com fungicidas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras e pelo uso de defensivos agrícolas. Embora o uso de fungicidas seja frequente na cultura do feijoeiro-comum, a principal estratégia de controle da antracnose é o emprego de cultivares resistentes, uma vez que reduz o custo de produção, além de trazer benefícios sociais e ambientais, garantindo a sustentabilidade do agronegócio no Brasil (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). Geralmente, têm sido empregadas como fontes de resistência à antracnose, linhagens introduzidas de outros países, normalmente não adaptadas, o que atrasa o processo de melhoramento. No entanto, a principal limitação para o desenvolvimento de resistência durável em cultivares de feijão é a alta variabilidade patogênica do

*C. lindemuthianum* (ISHIKAWA et al., 2008; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007), tornando a vida útil das cultivares efêmera. Devido esta alta variabilidade, o monitoramento constante do fungo no campo é essencial para auxiliar os melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes (PEREIRA et al., 2010).

#### **2.4 A variabilidade em *C. lindemuthianum* e sua origem**

A ocorrência de diversas raças, assim como de numerosas características morfológicas, fisiológicas e culturais tem demonstrado a variabilidade genética de *C. lindemuthianum*. Dentre esses caracteres, podem ser avaliados a morfologia da colônia, o índice de velocidade do crescimento micelial, o diâmetro colonial, a porcentagem de germinação dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características (PINTO et al., 2012; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Além disso, diferenças na virulência são facilmente observadas.

A organização e diversidade genética de *C. lindemuthianum* é muito semelhante a populações de fungos que apresentam reprodução sexuada (CAMARGO JÚNIOR, 2008; SOUZA, CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2012). Embora tal evidência constitua um forte indício de que a reprodução sexual possa ocorrer naturalmente em campo, há uma grande incerteza quanto a esse aspecto. Além da recombinação sexual, outros mecanismos que permitem a transferência de material genético têm sido descritos na literatura para este patógeno, como o ciclo parassexual e a recombinação assexuada através da fusão dos tubos de anastomoses entre conídios (CATs) (ROCA et al., 2004; ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2008; ISHIKAWA et al., 2012). Roca (1997) confirmou a ocorrência do ciclo parassexual em *C. lindemuthianum* e sugeriu que o diploide formado nesse mecanismo seria instável ao constatar evidências



citológicas de anastomoses entre conídios e variações no número de cromossomos. Um estudo citogenético durante a reprodução sexual em *C. lindemuthianum* confirmou esta variação cromossômica, sendo observados desde dois a 18 cromossomos (ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003).

Uma alta variabilidade em populações de *C. lindemuthianum* foi demonstrada por Pinto et al. (2012), em todas as características avaliadas, sendo estes caracteres patogênicos, morfológicos, fisiológicos e moleculares. Neste estudo, observou-se que a fusão de CATs é comum para a maioria (94,6%) dos isolados analisados. Considerando-se que os CATs têm um papel importante na dinâmica populacional do patógeno, uma alta frequência deste mecanismo pode influenciar significativamente a variabilidade das populações.

## 2.5 Cariotipagem em fungos

A caracterização do conjunto cromossômico de fungos fitopatogênicos é essencial, não somente por fornecer informações sobre o genoma dos patógenos, como também, para a identificação de variações no genoma de diferentes isolados/linhagens/raças. Esse conhecimento é importante para o manejo e controle das doenças.

A determinação do cariótipo de fungos filamentosos tem sido realizada em diversos estudos, contribuindo para a compreensão da existência de polimorfismos entre linhagens de cada espécie, das alternativas de sobrevivência dos fungos e do seu metabolismo (DEAN et al., 2005; GALAGAN et al., 2003). No entanto, apesar do estudo avançado, a natureza dos cromossomos de fungos é pouco conhecida e limita a compreensão da estrutura e organização de seu genoma (WIELOCH, 2006).

A pioneira no estudo do cariótipo de fungos filamentosos, Barbara McClintock, trabalhou com o fungo *Neurospora crassa*, observando os

cromossomos por microscopia de luz com o emprego de corantes adequados para a coloração do DNA e estimou um número de  $n=7$  (MCCLINTOCK, 1945). Entretanto, a estimativa precisa do número cromossômico era comprometida pela falta de resolução das imagens da microscopia de luz associada às pequenas dimensões dos cromossomos.

Para contornar estas dificuldades, os métodos mais eficazes e empregados para o estudo de fungos fitopatogênicos se utilizam basicamente de duas técnicas, o PFGE (Pulsed Field Gel Eletrophoresis) e o GTBM (Germ Tube Burst Method). Essas técnicas têm sido propostas para a identificação de polimorfismos no tamanho e número de cromossomos, além da localização *in situ* de genes nos mesmos. O PFGE é utilizado com eficiência na determinação do comprimento cromossômico e polimorfismo em número de cromossomos, sendo muito utilizado no estudo do cariótipo de fungos filamentosos e leveduras. A observação dos cromossomos é feita em gel de agarose. No entanto, há limitações relacionadas com as bandas obtidas. Além disso, a técnica do PFGE não revela características morfológicas e estruturais dos cromossomos. Portanto, estas limitações podem ser superadas pela utilização do método do GTBM, que tem se destacado pela sua eficiência na determinação do número cromossômico e na hibridização *in situ*, apesar de não determinar com eficiência o comprimento cromossômico (WIELOCH, 2006).

O PFGE é uma técnica de eletroforese diferenciada e adequada para a separação de grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados (MAGALHÃES et al., 2005). Essa técnica permite a separação de moléculas grandes de DNA, com tamanhos variando de 50 a 10.000 Kb (10 Mb). Campos elétricos pulsados em diferentes direções são aplicados em um gel de agarose, sendo possível analisar, de forma mais rápida, várias amostras de diferentes isolados/linhagens/raças de uma

mesma espécie de uma só vez, facilitando a identificação de polimorfismos (JOHNSTON, 1994).

A presença de minicromossomos, utilizando-se o PFGE, foi observada em várias espécies do gênero *Colletotrichum*, tais como *C. gloesporioides*, *C. crassipes*, *C. dematum* e *C. truncatum*, com tamanhos variando de 200 a 1200 Kb. No entanto, minicromossomos não foram encontrados em isolados de *C. musae*, *C. lindemuthianum* e *C. trifolli* (MASEL et al., 1993). Os mesmos autores dividiram os isolados de *C. gloesporioides* em duas classes, a primeira com menos de seis minicromossomos, com tamanhos inferiores a 1,3Mb e a segunda com mais de seis, com tamanhos superiores a 1,3Mb. Em outro trabalho com *C. gloesporioides*, He et al. (1995) observaram que a presença de um minicromossomo de 1,3 Mb não estava diretamente associada à raça, o que torna discutível a origem e a função de cromossomos dispensáveis nesta espécie.

Em *C. lindemuthianum*, O' Sullivan et al. (1998) observaram duas classes de cromossomos de tamanhos distintos. A primeira apresentou um número variável de dois a seis cromossomos, com tamanhos variando de 0,7 a 2 Mb, os chamados minicromossomos, contrapondo com os resultados encontrados por Masel et al. (1993). A segunda classe apresentou um número de cromossomos variando de seis a nove com tamanhos variando de 3 a 7 Mb. Para este estudo, foram utilizadas 18 linhagens de *C. lindemuthianum* pertencentes às seis raças 0, 1, 6, 7, 21 e 29. Apesar da constatação do polimorfismo cromossômico em *C. lindemuthianum*, ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos que efetivamente levariam a essa variação do genoma nesta espécie de reprodução assexuada.

Vários trabalhos com fungos foram realizados a fim de obter o número e tamanho cromossômico, e conseqüentemente, o tamanho total do genoma da espécie. Em isolados de *Colletotrichum acutatum* foram determinadas seis a nove bandas cromossômicas, coincidentes com os resultados obtidos por meio

de sondas teloméricas, e o tamanho total do genoma foi estimado de 29 a 36 Mb. Neste estudo, os padrões de cariótipo e análises de *southern-blot* demonstraram um alto nível de polimorfismo a nível molecular entre os diferentes isolados (GARRIDO et al., 2009).

No fungo *Metarhizium anisopliae* foi realizada a cariotipagem de oito isolados selvagens do fungo. O tamanho médio do genoma foi de 29,7 Mb e os cromossomos variaram de 7,7 a 0,9 Mb, permitindo separá-los em três grupos. O Grupo I mostrou duas a três bandas correspondentes a moléculas entre 0,9 e 2,8 Mb; o Grupo II teve três bandas correspondentes a moléculas entre 3,6 e 4,9 Mb e o Grupo III tinha de duas a três bandas correspondentes às moléculas com tamanhos entre 6,0 e 7,7 Mb (KAVA-CORDEIRO et al., 2005).

Em *Mycosphaerella graminicola* foram usados 3 isolados diferentes, IPO323 e IPO94241 e IPO94269, detectando um total de 20, 19 e 18 cromossomos respectivamente. Desse total, 7-9 cromossomos foram contados na faixa de tamanho 0,3-0,8 Mb, enquanto que o tamanho dos cromossomos restantes foram estimados em 1,15-6 Mb. O tamanho do genoma total variou de 31-40 Mb (MEHRABI; TAGA; KEMA, 2007).

Estudando 10 espécies de *Fusarium*, Min, Jung & Choi (1998) observaram que o número de cromossomos variou de 5 a 13 e os tamanhos de 0,78 a 7,20 Mb, variando o tamanho total do genoma de 18,32 a 48,20 Mb. Em outro estudo, foi verificado que as espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. solani* possuem cromossomos linhagem-específicos (LS) que são distintos no que diz respeito à sequências repetitivas e genes envolvidos na patogenicidade, indicando que os cromossomos LS pode ter uma origem evolutiva distinta (MA et al., 2010). Ensaio de patogenicidade demonstraram que as linhagens não patogênicas tornaram-se patogênicas em plantas de tomate por meio da aquisição do cromossomo 14 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (MA et al., 2010). Num estudo com *Nectria haematococca*, Coleman et al.

(2009), ao avaliarem a contribuição de minicromossomos (ou supernumerários) na expansão gênica de uma espécie, demonstraram a natureza dispensável de três cromossomos (14, 15 e 17), por meio da ausência dos mesmos em alguns isolados, em experimentos com o PFGE. Neste estudo, relacionou-se a presença destes cromossomos à habilidade dos isolados dessa espécie de colonizarem habitats específicos e/ou diferentes nichos.

Alternativamente ao método do PFGE, o método do GTBM foi desenvolvido inicialmente por Shirane, Masuko e Hayashi em 1988 com o objetivo de espalhar os cromossomos mitóticos metafásicos do fungo fitopatogênico *Botryotinia fuckeliana* e então, visualizá-los com o auxílio de corantes. Apesar de ter sido introduzido primeiramente em *B. fuckeliana*, o GTBM foi modificado e desenvolvido com sucesso para várias outras espécies de fungos nas últimas décadas, como *Alternaria alternata* (TAGA; MURATA 1994), *Botrytis cinerea* (TAGA; MURATA 1994), *Cochliobolus* spp. (TSCHUYA; TAGA, 2001), *Fusarium graminearum* (GALE et al., 2005), *Colletotrichum kahawae* (PIRES et al., 2015), *Nectria haematococca* (TAGA; MURATA; SAITO, 1998) e *Pyrenophora teres* f. *teres* (ELLWOOD, 2010). Estes estudos indicam que o método é bastante útil para visualizar e enumerar cromossomos de fungos em metáfase mitótica independente do seu tamanho, podendo em alguns casos fornecer informações sobre a morfologia cromossômica (MEHRABI et al., 2012). Mehrabi, Taga e Kema (2007) trabalharam com isolados de *Mycosphaella graminicola*, comparando resultados do PFGE com o GTBM, e observaram uma estimativa precisa do cariótipo (n=18-20).

Taga et al. (2012) estudaram oito espécies do gênero *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. higginsianum*, *C. graminicola*, *C. orbiculare*, *C. malvarum*, *C. trifolii* e *C. lindemuthianum*). O método foi extremamente útil na comparação dos cariótipos das espécies do gênero, e no

estudo de filogenia, demonstrando um maior distanciamento do *C. lindemuthianum* em relação às outras espécies, pela diferença no número de cromossomos estabelecidos entre elas. As estimativas do número cromossômico foram de  $n=10+1B$  para *C. gloeosporioides*, *C. truncatum* e *C. trifolii*;  $n=10+2B$  para *C. higginsianum*;  $n=10+3B$  (2B) para *C. graminicola*;  $n=10$  para *C. orbiculare* e *C. malvarum*; e  $n=7$  para *C. lindemuthianum*. Mais recentemente, Taga et al. (2015) confirmaram seus estudos prévios em *Colletotrichum* ao realizarem a cariotipagem por meio de observação citológica das espécies *C. orbiculare*, *C. graminicola*, e *C. higginsianum* por meio de microscopia de fluorescência e compararam os resultados com os respectivos projetos genoma de cada espécie. O número cromossômico de *C. orbiculare* foi determinado pela primeira vez, sendo de  $n = 10$  com a ausência de minicromossomos no genoma. Em *C. graminicola* e *C. higginsianum* os resultados foram consistentes com os projetos genoma ( $n=10$ ), incluindo o número de minicromossomos observados, 3B e 2B, respectivamente. Além disso, o método do GTBM permitiu a realização de uma caracterização cromossômica, sendo que em *C. orbiculare*, por exemplo, cada cromossomo foi dividido em uma região pericentromérica altamente rica em AT e as regiões restantes altamente ricas em GC, sendo a região pericentromérica considerada heterocromatina constitutiva.

Em *Fusarium graminearum*, a observação citológica de cromossomos mitóticos utilizando o método do GTBM confirmou a presença de quatro cromossomos na espécie (GALE et al., 2005). Pires et al. (2015) ao realizar uma caracterização citogenômica de uma coleção de isolados de *Colletotrichum kahawae*, utilizaram o método na identificação de minicromossomos na espécie. Os resultados demonstraram a presença de dois a cinco minicromossomos, sugerindo uma relação positiva entre o número de cromossomos e o nível de agressividade dos diferentes isolados analisados. No entanto, não houve

correlação entre a agressividade e o tamanho total do genoma, que foi determinado por meio de citometria de fluxo. Os resultados encontrados foram confirmados pelo método do PFGE.

Em *Pyrenophora teres* f. *teres*, diferentes fases mitóticas puderam ser observadas por meio do método do GTBM. Ellwood et al. (2010) relatam que a grande maioria dos núcleos observados (cerca de 90%) estavam em intérfase, fase na qual os cromossomos estão na forma de cromatina e delimitados por uma membrana nuclear. Entre os 10% restantes, a maior parte dos cromossomos puderam ser observados tanto em prometáfase ou totalmente emaranhados e aglutinados, dificultando a distinção dos diferentes cromossomos. Em apenas alguns núcleos, a visualização dos cromossomos metafásicos condensados permitiu a contagem, que foi de nove cromossomos. Este resultado foi confirmado pelo método do PFGE, no qual polimorfismos cromossômicos também foram identificados entre os isolados.

Uma vez que o GTBM consiste em uma técnica complementar para análises da genômica estrutural de fungos, sua aplicação permite a utilização de métodos de localização de genes nos cromossomos, combinando técnicas citogenéticas e de biologia molecular, como por exemplo, a hibridização *in situ* (MEHRABI et al., 2012).

Com isso, PFGE e GTBM são métodos complementares na cariotipagem molecular e citológica de várias espécies de fungos, que tem promovido conhecimento na genômica estrutural de fungos incluindo a identificação de transferência horizontal de cromossomos entre espécies de fungos relacionadas (TAGA; MURATA; SAITO, 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolados

Todas as linhagens foram coletadas a partir de lesões de antracnose em vagens, folhas e pecíolos no feijoeiro-comum naturalmente infectado em campo. As coletas foram feitas previamente em diferentes áreas experimentais nas cidades de Lavras e Lambari, situadas no Sul do Estado de Minas Gerais (Tabela 1). Não foram necessárias permissões específicas para a coleta nesses locais e os estudos não envolveram espécies protegidas, ou em vias de extinção. As linhagens estão armazenadas na micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Os estudos foram conduzidos nos Departamentos de Biologia (Setores de Genética e Microbiologia) e Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, e no Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública da Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha. As linhagens foram multiplicadas a partir da Micoteca, conservadas pelo método de secagem em papel filtro, previamente multiplicadas por pequenos pedaços de tecido infectado e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura M3S e papel-filtro. As linhagens foram selecionadas de acordo com a diversidade de características morfológicas, moleculares e patogênicas (BARCELOS et al., 2014; BARCELOS et al., 2011; MOTA et al., 2015). Foram utilizadas oito linhagens das raças 65, 73, 81, 89 e 2047 de *C. lindemuthianum* (65/LV134, 65/LV145, 65/LV238, 65/LV1614, 73, 81, 89 e 2047) e cinco de *Glomerella* spp. (G8-1, G43-2, G73-4, G85-1 e G89-1). Na Tabela 1 estão presentes as características mais relevantes desses dois grupos de linhagens.



Tabela 1 – Origem, morfologia de conídios, anastomoses entre conídios (%), e taxas de esporulação ( $\times 10^6$  esporos/ml) e germinação (%) de linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro (MOTA et al., 2016).

Nº.	Linhagem	Raça	Origem	Espécie	Conídio	% de CATs	Taxa de esporulação (15 dias)	Taxa de germinação (48 horas)
1	LV134	65	Lambari	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	$28.5 \pm 7.78$	$0.275 \pm 0.035$	$75.0 \pm 2.82$
2	LV145	65	Lambari	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	$11.0 \pm 0.00$	$0.150 \pm 0.000$	$37.5 \pm 2.12$
3	LV238	65	Lavras	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	$13.0 \pm 4.24$	$0.238 \pm 0.053$	$25.5 \pm 2.12$
4	LV1614	65	Lavras	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	-	-	-
5	LV1143	73	Lambari	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	-	-	-
6	LV153	81	Lambari	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	$1.5 \pm 0.71$	$0.575 \pm 0.212$	$75.5 \pm 3.53$
7	LV228	89	Lavras	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	$12.5 \pm 2.12$	$0.238 \pm 0.053$	$32.0 \pm 4.24$
8	-	2047	Porto Rico	<i>C. lindemuthanum</i>	Cilíndrico	-	-	-
9	G8-1	0	Lavras	<i>Glomerella</i> sp I	Falcado	$Nf \pm 0.00$	$0.12 \pm 0.04$	$75.0 \pm 9.89$
10	G43-2	0	Lambari	<i>Glomerella</i> sp I	Falcado	$Nf \pm 0.00$	$0.14 \pm 0.05$	$87.5 \pm 6.36$
11	G73-4	0	Lavras	<i>Glomerella</i> sp I	Falcado	-	-	-
12	G85-1	-	Lavras	<i>Glomerella</i> sp II	Cilíndrico	$67.0 \pm 9.90$	$26.23 \pm 16.79$	$92.0 \pm 5.66$
13	G89-1	-	Lavras	<i>Glomerella</i> sp II	Cilíndrico	$10.0 \pm 5.65$	$11.58 \pm 2.02$	$86.0 \pm 1.41$

### 3.2 Método de Rompimento de Tubos Germinativos (GTBM)

A metodologia utilizada foi proposta por Tsuchiya e Taga (2001). No entanto, algumas otimizações foram feitas para uma melhor obtenção dos cromossomos metafásicos das linhagens utilizadas, como descrito a seguir. A presente técnica foi conduzida no Departamento de Biologia (Setor de Genética) da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, e no Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública da Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha. As linhagens de *C. lindemuthianum* foram multiplicadas em vagens de feijão em tubos de ensaio previamente esterilizados, enquanto as linhagens de *Glomerella* spp. foram repicadas em placas de Petri contendo meio BDA sólido, e ambas crescidas sob condições apropriadas para a produção de esporos, ou seja, câmara de crescimento a 22°C por cerca de 10 a 15 dias para *C. lindemuthianum* e 6 a 10 dias para *Glomerella* spp.. Os conídios foram coletados a partir dos tubos e placas de Petri e filtrados em miracloth estéril. A suspensão de esporos foi transferida para microtubos (tipo Eppendorf) de 2 ml, e os esporos recolhidos por centrifugação a 6.800 rpm durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet duas vezes com água estéril. Os esporos foram ressuspensos em meio líquido nutritivo (caldo de batata dextrosado) e a concentração de conídios ajustada para  $2,5 \times 10^5$  conídios/ml.

Previamente, as lâminas foram limpas e revestidas com poli-L-lisina. Para a limpeza, as lâminas foram mergulhadas em cubetas contendo HCl 5N overnight, lavadas em água corrente por 10 minutos e armazenadas em geladeira em álcool 70%. Posteriormente, foram secas em estufa a 85°C por 2 horas. Após o esfriamento, pipetou-se 7 µl de solução de poli-L-lisina 0,01% e espalhou-se a solução sobre a lâmina. Em seguida, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. Nestas lâminas foram feitas molduras retangulares com

adesivo para PVC flexível, de modo a armazenar 300 µl de suspensão de esporos durante a incubação.

Após a adição da suspensão, as lâminas foram mantidas em câmara úmida e incubadas à temperatura de 22°C no escuro. A germinação foi monitorada com o auxílio de um microscópio de luz, sendo o tempo de germinação variável de acordo com o isolado. Ocorrida a germinação, retirou-se a suspensão cuidadosamente para evitar a secagem da lâmina. Em seguida, pipetou-se gentilmente a mesma alíquota (300 µl) de solução do mesmo meio líquido nutritivo utilizado na germinação acrescido de tiabendazole (TBZ) a uma concentração final equivalente a 100 µg/ml.

As lâminas foram novamente incubadas por 3 horas a 22°C. Após a incubação, retirou-se a solução com TBZ pipetando-a gentilmente, e então, a cola foi removida com uma pinça de ponta fina. As lâminas foram gentilmente mergulhadas em água estéril miliQ por poucos segundos para lavar a solução de TBZ. Limpou-se o excesso de água com toalha de papel, tomando-se o cuidado para deixar os tubos germinativos úmidos. As lâminas foram, então, incubadas em solução fixadora (metanol: ácido acético glacial 9:1 (v/v)) por 35 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram secas passando-as rapidamente, e por poucas vezes, acima da chama do Bico de Bunsen, tomando-se o devido cuidado para evitar o ressecamento ou superaquecimento das mesmas. Em seguida foram mantidas na câmara de fluxo por alguns minutos para secagem completa e finalmente, armazenadas à temperatura ambiente até o momento da avaliação.

### **3.3 Coloração por fluorescência e observação em microscopia de fluorescência**

Para a coloração e observação, deve-se tomar o cuidado de realizar estas etapas em escuro. Transferiu-se uma alíquota de 15 µl de Iodeto de Propídeo

(PI) a 1 µg/ml e as lâminas foram então deixadas descansando por 15 minutos. As lâminas foram imersas em água miliQ, secas e coradas sequencialmente com 15µl de DAPI a 1 µg/ml em meio de montagem Vectashield® (coloração DAPI/PI). Com cuidado, colocou-se uma lamínula sobre a lâmina, e posteriormente a mesma foi mantida novamente em escuro, por 15 minutos. A lamínula foi então, selada com esmalte de unha comum. Finalmente, os cromossomos puderam ser observados por excitação com luz ultravioleta em microscópio de epifluorescência. Foram utilizados os microscópios de fluorescência Nikon Eclipse E400, equipado com uma objetiva de imersão a óleo de 100x, do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras; microscópio de fluorescência invertido com sistema apotome e preparação para laser confocal Carl Zeiss, equipado com uma objetiva de imersão a óleo de 63x, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras e o microscópio de epifluorescência Zeiss Axioskop 2 plus, equipado com uma objetiva de imersão a óleo de 100x do Laboratório de Genética do Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública da Universidad de Cádiz. Todos os microscópios são equipados com câmeras digitais monocromáticas para a captura de imagens.

### **3.4 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)**

Esta técnica foi conduzida no Laboratório de Microbiología do Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública da Universidad de Cádiz. Pequenos discos de micélio foram cortados a partir de placas de Petri com meio de cultura M3S sólido para cada linhagem e incubados à 22°C por 48 horas em 200 mL de meio M3S líquido em agitador rotativo a 180 rpm. Após o

crescimento, o micélio foi filtrado com filtro de Nylon de 100  $\mu\text{m}$ , e em seguida, lavado com água bidestilada estéril.

Uma amostra de 1g de micélio foi pesada, tratada com 10 ml de tampão KC (KCl 0,6 M,  $\text{CaCl}_2$  66 mM em água) com 30 mg/ml de enzima Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), e novamente incubada em agitador rotativo à 28°C e 90 rpm por 2-3 horas, para que ocorresse a liberação dos protoplastos. A suspensão contendo os protoplastos foi então filtrada em filtro de Nylon de 40  $\mu\text{m}$  e transferida para tubos Falcon de 50 ml. A suspensão foi centrifugada a 3500 rpm e lavada duas vezes com tampão KC. O pellet final foi ressuspenso em tampão TCE (KCl 0,6M, EDTA 50 mM pH 8,0) e a suspensão ajustada para a concentração final de  $4 \times 10^8$  protoplastos/mL. Os plugs de agarose foram preparados dissolvendo-se a agarose *low melting* em tampão TCE a uma concentração de 1,6% e em seguida, adicionando-se a mesma alíquota da suspensão de protoplastos, obtendo-se uma suspensão final contendo  $2 \times 10^8$  protoplastos/ml e a agarose a uma concentração final de 0,8%. Para isso, o mesmo volume das suspensões de agarose e de protoplastos foram mescladas, e após homogeneizada, foi rapidamente adicionada aos moldes, esperando sua completa polimerização. Foram distribuídos 5 plugs por tubo (tipo eppendorf) de 2 ml e tratados em 1,5 ml de LET (Tris 10mM, 2-mercaptoetanol 7.5% em EDTA 0,5M pH 9,0) à 37°C por 24 horas. Após o tratamento, a solução foi descartada e os plugs foram realocados em um novo tubo (tipo eppendorf) de 2 ml. Os plugs foram lavados três vezes com EDTA (50 mM pH 8,0) por 10 minutos à cada lavagem. A seguir, os plugs foram tratados em solução ESP (0,5M EDTA pH 9,0; 1% laurilsarcosina; 1mg/ml proteinase K) a 50°C por 50 horas e posteriormente lavados e estocados em EDTA 50 mM pH 8,0 como comentado no passo anterior.

O gel de agarose (Pulsed-field Certified Grade Agar, Bio-Rad, Hercules, CA) foi preparado a 0,8% em tampão TAE 1X ou TBE 0,5X, dependendo da condição de corrida, e após a polimerização, os plugs foram acoplados.

As eletroforeses foram realizadas no aparelho CHEF DR III - Pulsed Field Electrophoresis Systems utilizando-se de duas condições de corrida, corrida curta para a separação de cromossomos pequenos (0,6-2Mb), e corrida longa para a separação de cromossomos grandes (2-7Mb). Para a corrida curta foi utilizado gel de agarose PFC (Pulsed Field Certified™ Agarose) a 0,8% (PFC) em tampão TBE 0,5X e as condições foram: pulso inicial de 50s, pulso final de 60s, corrente de 8v/cm, ângulo de 120°, e temperatura de 14°C por 21 horas. Para a corrida longa foi utilizada uma agarose especial para a separação de cromossomos maiores, chamada Certified Megabase Agarose a 0,8% em tampão TAE 1x. A corrida é separada em três blocos: o bloco 1 com pulsos inicial e final de 1200s, 2v/cm, ângulo de 96° por 24 horas; o bloco 2 com pulsos inicial e final de 1500s, 2v/cm, ângulo de 100° por 24 horas e o bloco 3 com pulsos inicial e final de 1800s, 2v/cm, ângulo de 106° por 24 horas e temperatura de 14°C. Foram utilizados marcadores de tamanho de DNA cromossomal de *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula wingei* e *Saccharomyces cerevisiae* da Bio-Rad para calcular os tamanhos cromossômicos. As linhagens foram comparadas para o tamanho e número de cromossomos. O software BioNumerics Seven (Applied Maths) foi utilizado para fazer uma análise de agrupamento pelo método do UPGMA sob os cálculos de uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente Dice.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de linhagens de *C. lindemuthianum*

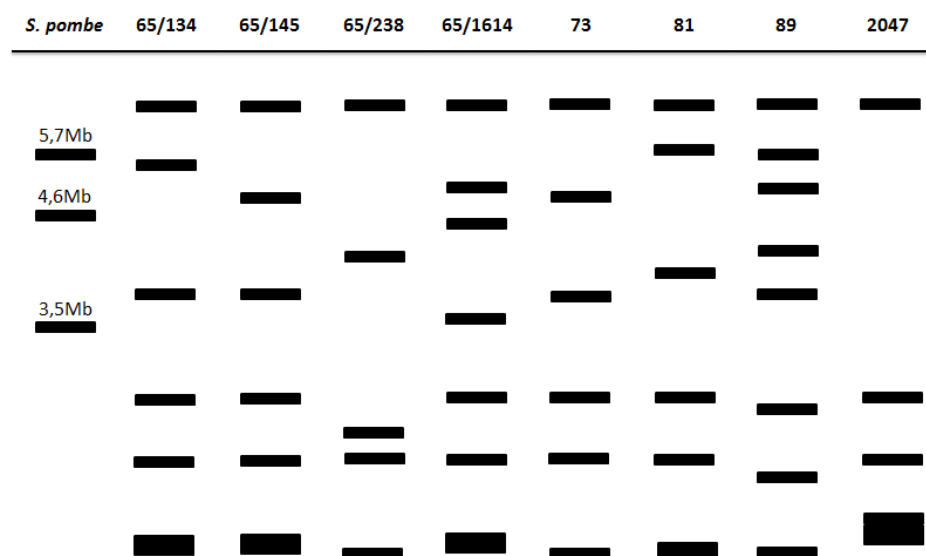
Diferentes condições de eletroforese foram utilizadas, visando à uma completa elucidação dos perfis de cromossomos de cada linhagem. Uma boa proporção do genoma foi resolvido, para todas as linhagens, em bandas separadas por tamanho cromossômico, sendo menores que 7 Mb. Um grupo de cromossomos pequenos variando de 0,2 a 1,2 Mb foi também descoberto, dependendo da linhagem. No presente estudo, diferentemente do observado na literatura (MEHRABI et al., 2007; PIRES et al., 2015; O'SULLIVAN et al., 1998), foram realizadas várias repetições para cada isolado, com a finalidade de se obter perfis confiáveis, bem como, para uma possível observação da ocorrência de polimorfismo dentro de cada linhagem, utilizando-se plugs de diferentes gerações da mesma linhagem. Foram realizadas três repetições para a linhagem 65/1614, seis para a linhagem G43-2, sete para as linhagens 65/134, G73-4 e G89-1, oito para as linhagens 85-1, nove para a linhagem 73, 10 para as linhagens 65/145, 65/238, 89, 2047 e 12 para a linhagem G8-1.

Na Figura 1 são apresentados os perfis de bandas obtidos dos cromossomos das linhagens de *C. lindemuthianum*. Os perfis apresentados foram obtidos na condição de corrida longa, ou seja, para a separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe* da Bio-Rad. Observa-se que houve uma completa separação dos cromossomos para todas as linhagens avaliadas, sendo que o número de cromossomos variou de cinco (linhagem 65/238) a oito (linhagens 65/1614 e 89). Foi observada uma banda comum (> 5,7 Mb) em todas as linhagens de *C. lindemuthianum*, que corresponde ao maior cromossomo identificado pelo padrão de bandas. A linhagem 2047 apresentou seis cromossomos, apresentando



um perfil diferente das demais. Esta linhagem é oriunda de Porto Rico (YOUNG et al., 1998), enquanto as demais são todas linhagens oriundas do Brasil. Verifica-se um maior polimorfismo entre todas as linhagens nas bandas entre 5,7 e 3,5 Mb. A linhagem 2047 apresentou-se como uma exceção para essa situação geral, não apresentando nenhum cromossomo intermediário, e por consequência, nenhuma banda neste intervalo.

Figura 1 - Perfis de bandas obtidos para *C. lindemuthianum* na condição de corrida longa para separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe*.



Um perfil similar entre todas as linhagens pode ser observado para os cromossomos menores que 3,5 Mb, sendo que o número de cromossomos variou de três (linhagem 65/238) a cinco (linhagem 2047). O cromossomo de menor tamanho apresentou um alto polimorfismo quanto ao número de bandas entre todas as linhagens. Neste caso, visualiza-se somente uma banda para as linhagens 65/238, 73 e 81, duas para as linhagens 65/134, 65/145, 65/1614 e 81,

e três para a 2047. É importante enfatizar que, na condição de corrida longa, a separação dos cromossomos pequenos não é perfeita, podendo ser observadas na parte inferior dos géis bandas mais fortes e algumas vezes de tamanho duplicado e triplicado. Isso se deve ao fato de os cromossomos pequenos ficarem comprimidos devido à não separação completa dos mesmos. Por isso, a condição de corrida curta deve ser utilizada para melhor separação e assim, é possível a resolução de perfis mais confiáveis de cada linhagem. Esses cromossomos pequenos (<1Mb) passarão a ser chamados de minicromossomos.

Os minicromossomos das linhagens de *C. lindemuthianum* foram separados por PFGE. As condições de corrida foram otimizadas para separar bandas menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisiae* da Bio-Rad. Na Figura 2 são apresentados os perfis de bandas obtidos na condição de corrida curta para cromossomos menores que 2,2 Mb. Houve separação completa dos cromossomos para as linhagens avaliadas, exceto para as linhagens 65/238 e 65/1614. Polimorfismo foi observado entre as linhagens, exceto para as linhagens 65/145, 81 e 89 que apresentaram um perfil similar. O número de cromossomos variou de três (linhagens 65/145, 81 e 89) a sete (linhagem 73), mas considerando apenas aqueles menores que 1Mb este número foi de um (linhagens 65/145, 81 e 89), dois (linhagens 65/134 e 2047) ou quatro (linhagem 73).

Com base nos resultados em ambas as condições de corrida, o número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem é apresentado na Tabela 2. É importante mencionar que nas bandas mais fortes e de tamanho duplicado e/ou triplicado foi considerada a presença de dois ou três cromossomos.

Figura 2 - Perfis de bandas obtidos para *C. lindemuthianum* na condição de corrida curta para separação de cromossomos menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisiae*.

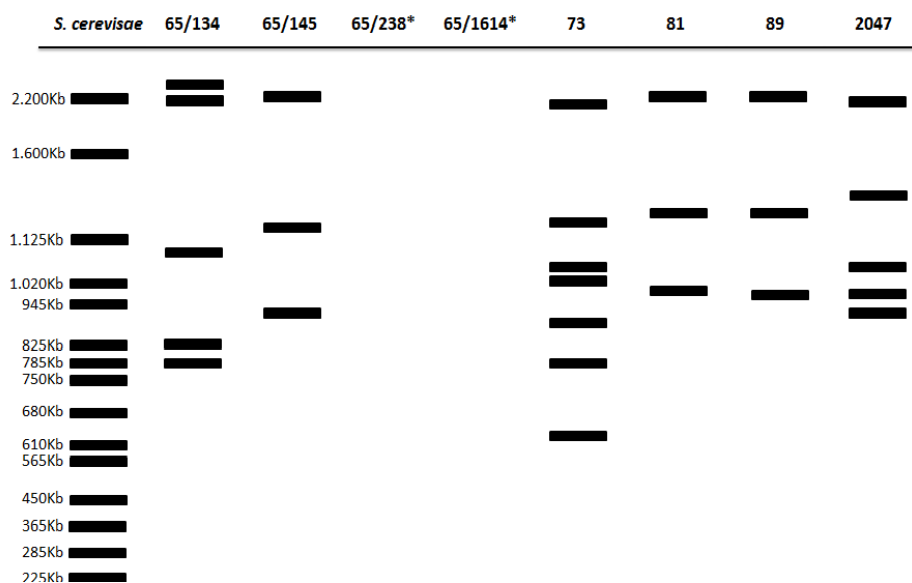


Tabela 2 – Número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem de *C. lindemuthianum*.

Linhagem	Número de cromossomos / tamanho				Total
	> 5,7 Mb	3,5-5,7 Mb	1-3,5 Mb	< 1 Mb	
65/134	1	2	3	2	8
65/145	1	2	2	1	6
65/238	1	1	3	-	5
65/1614	1	3	4	-	8
73	1	2	4	3	10
81	2	1	2	1	6
89	1	4	2	1	8
2047	1	-	3	2	6

#### 4.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de linhagens de *Glomerella* spp.

Os perfis de bandas obtidos dos cromossomos das linhagens de *Glomerella* spp são apresentados na Figura 3. Os perfis exibidos foram obtidos na condição de corrida longa, ou seja, para a separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe* da Bio-Rad.. Observa-se que houve uma completa separação dos cromossomos para todas as linhagens avaliadas, sendo que o número de cromossomos variou de seis (linhagens G73-4 e G85-1) a oito (linhagem G43-2). Como observado em *C. lindemuthianum*, todas as linhagens de *Glomerella* spp. apresentaram uma banda comum (> 5,7 Mb), que corresponde ao maior cromossomo identificado pelo padrão de bandas. Os perfis foram similares entre as linhagens, exceto para a G85-1. Verifica-se um maior polimorfismo entre todas as linhagens nas bandas < 3,5 Mb, sendo que o número de cromossomos variou de dois (linhagem G73-4) a quatro (linhagem G85-1).

Na Figura 4 são apresentados os perfis de bandas obtidos na condição de corrida curta para cromossomos menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisiae* da Bio-Rad. Houve separação completa dos cromossomos para todas as linhagens avaliadas, e foi observado polimorfismo entre todas elas. Um cromossomo de 1,6 Mb foi observado em todas as linhagens. O número de cromossomos variou de dois (linhagens G8-1 e G43-2) a sete (linhagem G85-1), mas considerando apenas aqueles menores que 1Mb este número foi de um (linhagens G8-1 e G43-2), três (linhagens G73-4 e G89-1) ou seis (linhagem G85-1).

Com base nos resultados em ambas as condições de corrida, o número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem é apresentado na Tabela 3.

Figura 3 - Perfis de bandas obtidos para *Glomerella* spp. na condição de corrida longa para a separação de cromossomos de 1-7 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. pombe*.

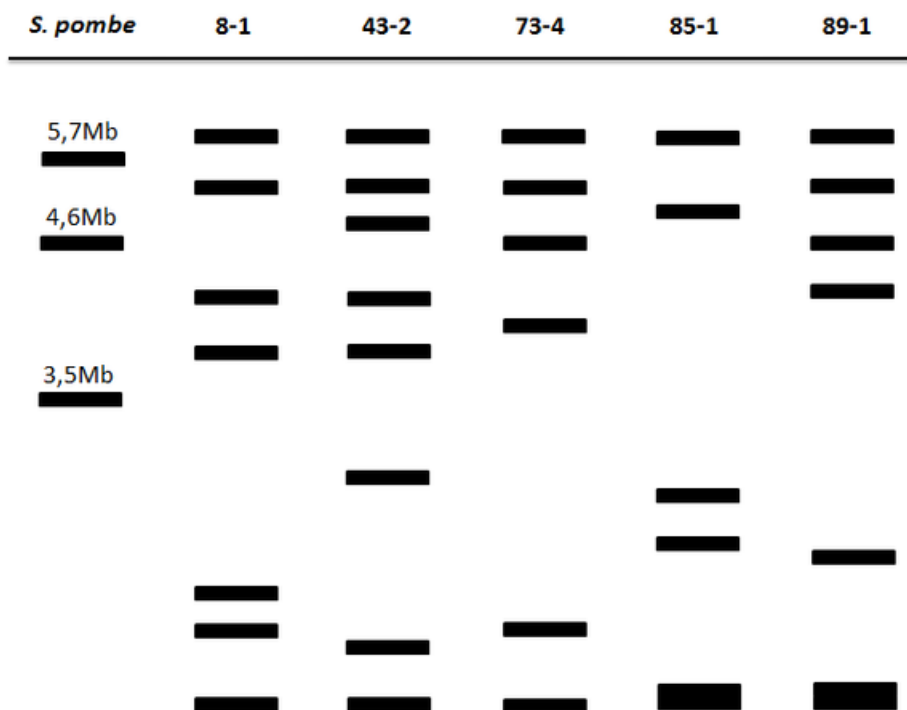
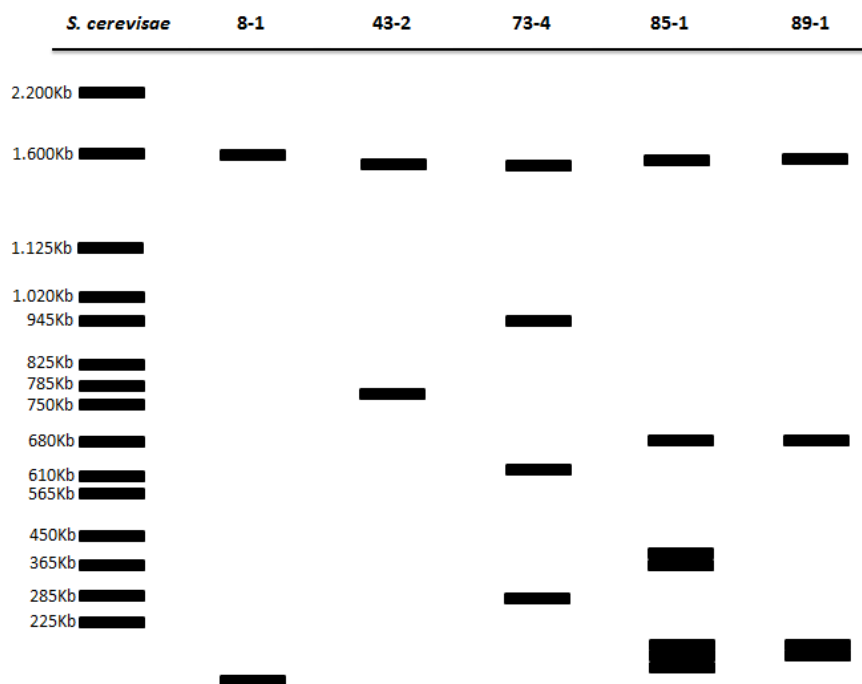


Tabela 3 – Número estimado de cromossomos de acordo com o tamanho (em Mb) de cada linhagem de *Glomerella* spp..

Linhagem	Número de cromossomos / tamanho				Total
	> 5,7 Mb	3,5-5,7 Mb	1-3,5 Mb	< 1 Mb	
G8-1	1	3	1	1	6
G43-2	1	4	1	1	7
G73-4	1	3	1	3	8
G85-1	1	1	1	6	9
G89-1	1	3	1	3	8

Figura 4 - Perfis de bandas obtidos para *Glomerella* spp. na condição de corrida curta para a separação de cromossomos menores que 2,2 Mb, utilizando o marcador de tamanho cromossômico de *S. cerevisiae*.



#### 4.3 Análise de agrupamento dos cariótipos das linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp.

De acordo com o perfil de bandas obtido para cada linhagem nas duas condições de corrida, foram realizadas análises de agrupamento e os dendrogramas são apresentados nas Figuras 5 e 6. Pode ser observado, de acordo com ambos os dendrogramas, que não houve separação entre as espécies de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. As linhagens G43-2 e G73-4 de *Glomerella* spp. apresentaram mais de 90% de similaridade, no entanto, em relação às demais linhagens de *Glomerella*, o coeficiente foi inferior a 55%. No entanto, houve maior similaridade entre algumas linhagens de *C. lindemuthianum* com

*Glomerella* spp, como exemplo, entre as linhagens 65/134 e G89-1 que apresentaram aproximadamente 90% de similaridade (Figura 6). Não foi observada alta similaridade entre as linhagens da raça 65.

Figura 5 - Dendrograma de similaridade genética utilizando o perfil de bandas obtido para cada linhagem na condição de corrida longa.

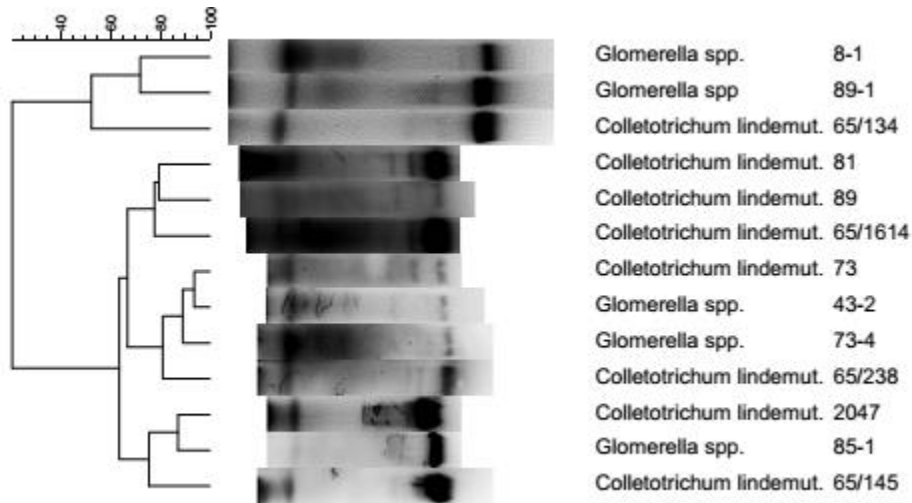
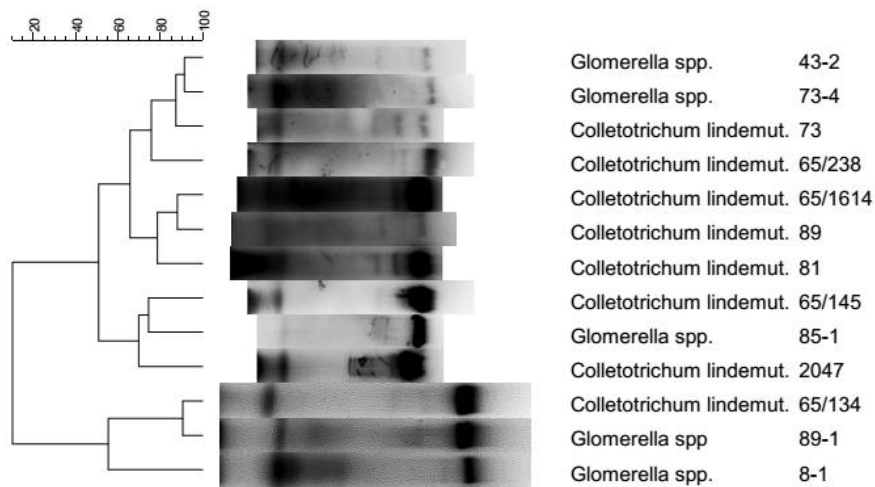


Figura 6 - Dendrograma de similaridade genética utilizando o perfil de bandas obtido para cada linhagem nas condições de corrida longa e curta.



#### 4.4 Cariótipo de linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. pelo método GTBM

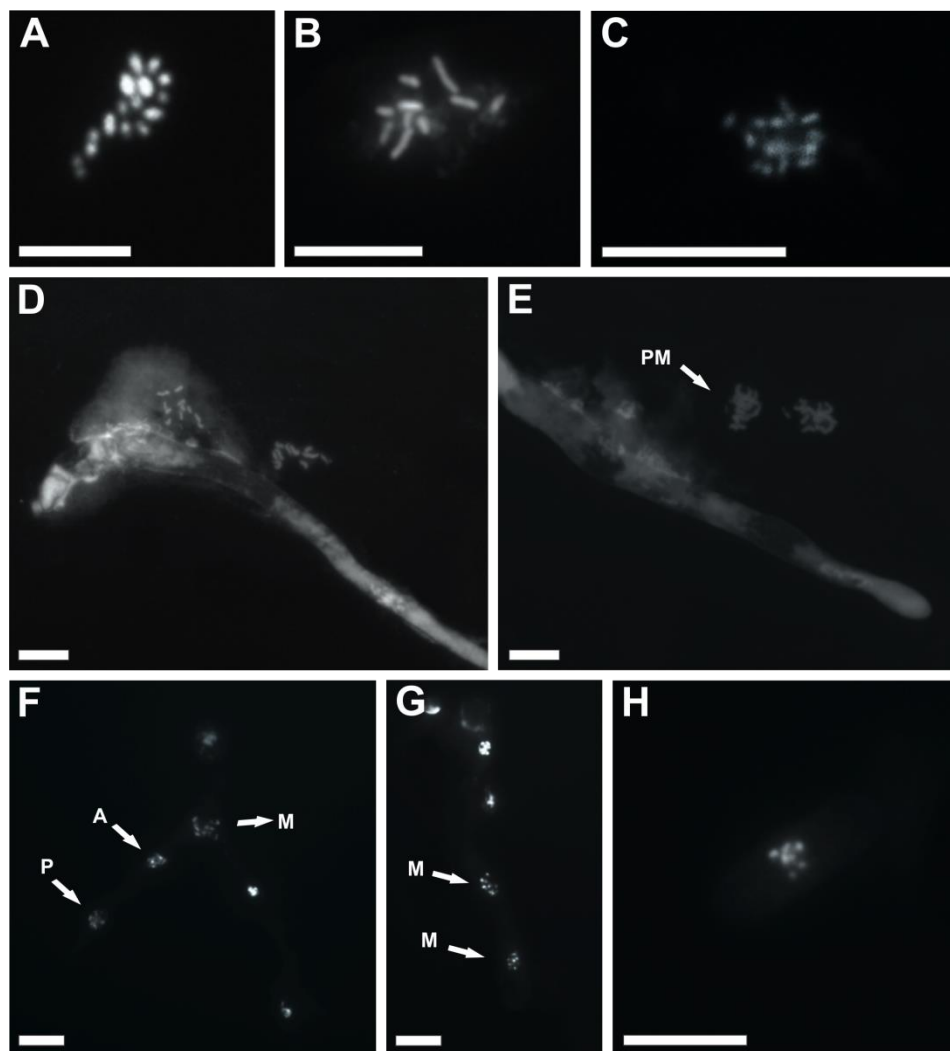
O método do GTBM foi otimizado para a obtenção do cariótipo citológico, o qual foi obtido com sucesso para as linhagens 65/238, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e G43-2 e G85-1 de *Glomerella* spp. (Figuras 7 e 8).

O tratamento com tiabendazol foi bem-sucedido na obtenção de cromossomos metafásicos totalmente condensados, o que permitiu uma contagem cromossômica confiável. No entanto, diferentes fases da mitose foram observadas, tanto em diferentes células da hifa, como também externamente à célula rompida (Figuras 7E, 7F e 7G). Na Figura 7E observam-se cromossomos mais distendidos, possivelmente na prometáfase. Na figura 7F é possível visualizar cromossomos na prometáfase, metáfase e anáfase, em cada septo da hifa. Esse fato seria esperado ao passo que, no momento de adição do antimitótico, diferentes células estão em fases distintas da divisão celular, podendo estar em processo inicial ou mais avançado. Na Figura 7D podem ser visualizados os cromossomos dispersos, que foram liberados pelo rompimento do núcleo, e próximos à hifa. Cromossomos em metáfase em diferentes células do tubo germinativo intacto podem ser observados na Figura 7G. O número de cromossomos foi estimado de sete (linhagem 81, Figura 7H) a 14 (linhagem 65/145, Figura 7A). Foram observados 10 cromossomos nas linhagens 65/238 (Figura 7D; 7F) e 73 (Figura 7B). Em todas as linhagens, dentro de cada metáfase obtida o tamanho relativo dos cromossomos variou, incluindo a presença de cromossomos pequenos em forma de ponto. Isso pode potencialmente corresponder a minicromossomos detectados nos perfis eletroforéticos.

As linhagens de *Glomerella* spp., diferente do observado para as linhagens de *C. lindemuthianum*, apresentaram uma menor variação no número de cromossomos. Na linhagem 85-1, o número de cromossomos foi estimado de



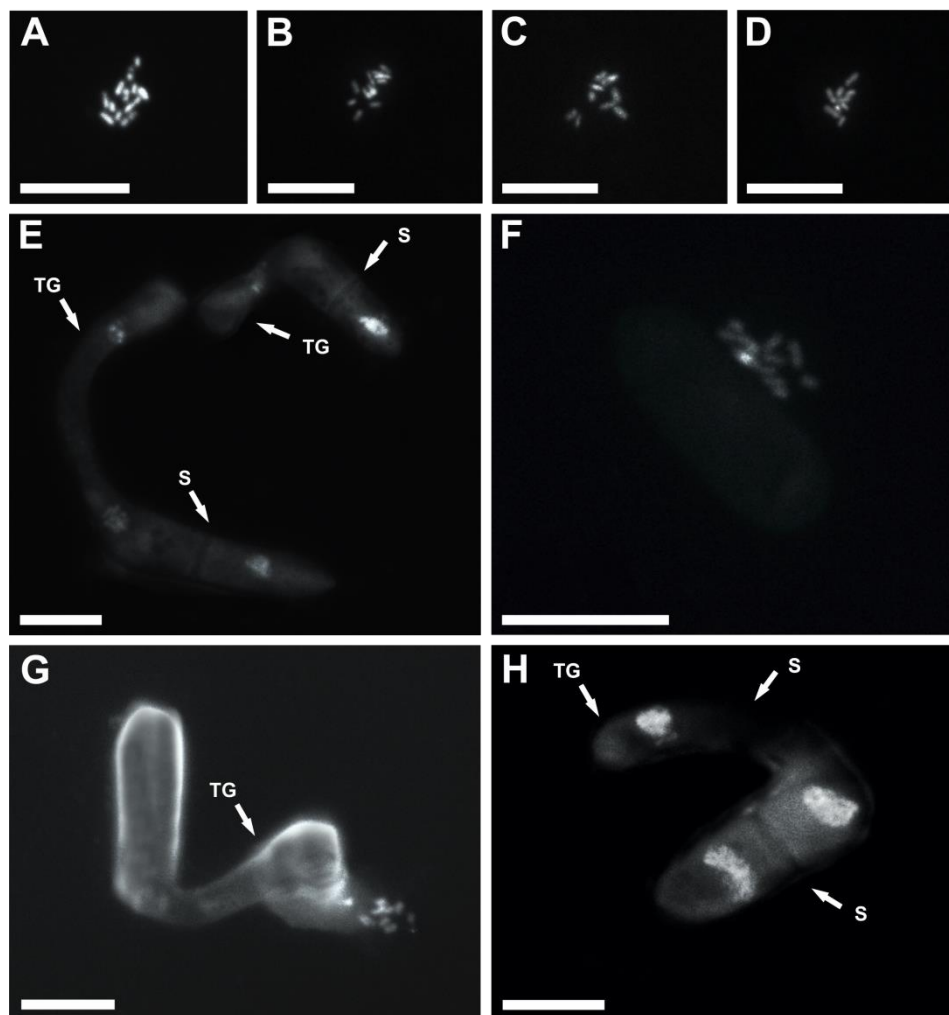
Figura 7 – Cariótipos de linhagens de *C. lindemuthianum*. Linhagens: (A) 65/145. (B) 73. (C) 81 (D) 65/238. (E) 65/238. (F) 73. (G) 81. (H) 81. P – Prófase; PM – Prómétáfase; M – Metáfase; A – Anáfase. Barra = 5  $\mu$ m.



nove (Figura 8C; 8D) a 11 cromossomos (Figura Figura 8B; 8F), enquanto na linhagem G73-4, estimou-se um total de 12 cromossomos (Figura 8A). Na Figura 8F é possível observar os cromossomos dispersos bem próximos ao

conídio. O rompimento do tubo germinativo, e a liberação dos cromossomos metafásicos estão muito bem evidenciados na Figura 7G, enquanto nas Figuras 7E e 7H é possível observar núcleos interfásicos e em diferentes fases da mitose dentro dos septos e dos tubos germinativos intactos.

Figura 8 - Cariótipo de *Glomerella* spp. Linhagens: (A) 43-2. (B) 85-1. (C) 85-1. (D) 85-1. (E) 85-1. (F) 85-1. G- 85-1. H-85-1. TG – tubo germinativo; S – septo. Barra = 5  $\mu$ m.



Na Tabela 4, observa-se o número de cromossomos estimado em cada técnica de cariotipagem utilizada. É importante mencionar que os resultados foram coincidentes para a linhagem 73 de *C. lindemuthianum* e para a linhagem G85-1 de *Glomerella* spp. As demais linhagens apresentaram números diferentes e/ou não foram obtidas metáfases que permitissem a contagem para fins de comparação.

Tabela 4 – Número de cromossomos estimado de acordo com a técnica utilizada (PFGE ou GTBM) de cada linhagem de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp..

Linhagens	Número de cromossomos		Linhagens	Número de cromossomos	
	PFGE	GTBM		PFGE	GTBM
65/134	8	-	G8-1	6	-
65/145	6	-	G43-2	7	-
65/238	5	10	G73-4	8	12
65/1614	8	-	G85-1	9	9-11
73	10	10	G89-1	8	-
81	6	7-14			
89	8	-			
2047	6	-			

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a combinação de duas técnicas foi realizada na investigação dos genomas de linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. Ainda que sejam técnicas amplamente aplicadas no estudo da genômica estrutural de fungos filamentosos em todo o mundo (COLEMAN et al., 2009; CROLL; ZALA; MCDONALD, 2013; GARRIDO et al., 2009; PIRES et al., 2015), as mesmas não têm sido utilizadas no estudo dessas espécies e de outros fitopatógenos no Brasil. A literatura tem relatado sucesso na prática dessas técnicas para a caracterização de espécies do gênero *Colletotrichum* (TAGA et al., 2015), e/ou na diferenciação e identificação de polimorfismos entre as linhagens, para a aplicação em estudos filogenéticos (O'SULLIVAN et al., 1998; PIRES et al., 2015; TAGA et al.; 2012). Este é o primeiro relato de cariotipagem de linhagens de *Glomerella* com estes métodos.

Entre as diferentes linhagens de ambas as espécies, o número cromossômico variou consideravelmente (Tabelas 2 e 3). O'Sullivan et al. (1998) ao estudarem diferentes linhagens coletadas de distintas partes do mundo, observou uma variação de nove a doze cromossomos em *C. lindemuthianum*. No cariotipagem citológica, poucos trabalhos foram publicados até então, nos quais quatro cromossomos meióticos foram observados utilizando-se da microscopia de luz convencional (LUCAS, 1946; ROCA et al., 2003), enquanto Taga et al. (2012) demonstraram a ocorrência de sete cromossomos na análise citológica do cariótipo de um isolado de *C. lindemuthianum*. Já para linhagens de *C. orbiculare*, bem como de outras espécies do gênero, foram observados 10 cromossomos mitóticos pela técnica do GTBM (TAGA et al., 2015). No entanto, algumas dessas estimativas, como as de tamanho e número cromossômico, podem apresentar imprecisões ou falhas, como relatado por Mehrabi et al. (2007), pois as técnicas podem ter seus resultados confundidos pela comigração de cromossomos ou separação imperfeita por dificuldades na obtenção de uma

condição de corrida ideal no caso do PFGE. E também, pela dificuldade de aplicação de metodologias que comprovem os resultados obtidos em técnicas citológicas como o GTBM. Visando diminuir essas imprecisões, o número de géis que foram realizados para se ter maior repetibilidade das bandas foi superior ao que normalmente tem sido relatado na literatura, cujo número médio é de três (MEHRABI et al., 2007; PIRES et al., 2015; O'SULLIVAN et al., 1998). Portanto, há confiabilidade das bandas obtidas e utilizadas em todas as análises no presente trabalho.

Os dados obtidos sugerem a ocorrência de rearranjos genômicos, já demonstrados por O'Sullivan et al. (1998), que atribui essa variação não só ao embaralhamento de complementos gênicos, como a processos citológicos envolvidos no balanço genômico das espécies, explicando a variação no número cromossômico. O fato de essa variação ser detectada dentro de linhagens da mesma espécie não é surpreendente. Ainda que algumas das linhagens tenham sido coletadas nos mesmos campos de produção, enquanto outras apresentem certa distância geográfica, um grande polimorfismo cromossômico seria esperado, uma vez que uma grande variação fenotípica é observada entre as linhagens avaliadas, seja de características morfológicas, citológicas e patogênicas (Tabela 1) (BARCELOS et al., 2014; BARCELOS et al., 2011; COSTA, 2015; MOTA et al., 2015; PINTO et al., 2012). O'Sullivan et al. (1998) relatam em seu estudo com grupos de isolados de todo o mundo, que mesmo em um grupo de isolados intimamente relacionados coletados na Tanzânia, esses mecanismos de variabilidade estão ativos, mesmo que em uma escala evolutiva espaço-temporal muito reduzida. Essa variabilidade é refletida principalmente na separação de cromossomos medianos e pequenos (Figuras 2 e 4), revelando partes dos genomas de *C. lindemuthianum* e de *Glomerella* que parecem ser hipervariáveis. A amplitude de variação no número de minicromossomos (1 a 6) foi maior que a observada para os cromossomos

maiores. De acordo com O'Sullivan (1998), a hipótese mais simples que poderia explicar estes resultados seria o fungo tolerar um certo grau de aneuploidia.

Cromossomos inteiros ou regiões genômicas duplicadas, como relatado previamente em *F. oxysporum* (KISTLER et al., 1995), decorrentes de erros na segregação cromossômica, podem posteriormente serem perdidos sem afetar a adaptação geral do organismo, dando origem a um fluxo no número de cromossomos, que é refletido no tamanho do genoma. Com isso, o mecanismo de geração desse polimorfismo em fungos assexuais torna-se uma questão intrigante. No entanto, em *C. lindemuthianum*, por exemplo, é conhecida a sua capacidade de formar tubos de anastomoses entre conídios (CATs), um mecanismo potencial de transferência de genes/cromossomos (ISHIKAWA et al., 2012; MEHRABI et al., 2011; ROCA et al., 2003). Nesta espécie, a formação de CATs é comum e tem sido observada em diferentes linhagens (Tabela 1) (ISHIKAWA et al., 2010; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012), e entre linhagens de diferentes raças (ISHIKAWA et al., 2012).

A variação presente nos minicromossomos é um fenômeno amplamente relatado em fitopatógenos. Em espécies em que foram identificados grupos distintos de minicromossomos, eles parecem ser mais polimórficos do que os cromossomos grandes (COLEMAN et al., 2009; CROLL; ZALA; MCDONALD, 2013; MEHRABI et al., 2007). Croll e McDonald (2012) destacam a presença de regiões altamente variáveis que podem ser “linhagens-específicas” (restritas a alguns isolados), as quais podem ser cromossomos inteiros, os chamados minicromossomos, e ainda destacam a sofisticação desses elementos genômicos acessórios, e relacionam sua presença à patogenicidade, uma vez que ocorrem com grande frequência em fungos fitopatogênicos. Estudos em *Nectria haematococca* e em *Fusarium oxysporum* (f. sp. *lycopersici*) (COLEMAN et al., 2012; MA et al., 2010), por exemplo, elucidaram a presença de minicromossomos com uma alta especificidade a linhagens virulentas,

portanto, provavelmente associados à virulência. Ademais, demonstraram diferenças surpreendentes quando comparados a cromossomos do genoma central, evidenciando haver baixa homologia entre os genes presentes nos dois tipos de cromossomos. Essas particularidades envolvem uma maior presença de elementos transponíveis, duplicações gênicas e genes relacionados à secreção de proteínas e fatores de virulência. Ma et al. (2010) ainda demonstraram a ausência de similaridade desses genes com espécies relacionadas, e análises filogenéticas dos mesmos os têm relacionado à espécies de clados mais distantes de *F. oxysporum*, apontando a transferência horizontal como provável origem. Estes autores evidenciam a troca de cromossomos acessórios entre isolados dessa espécie, apesar da ausência de recombinação sexual.

No presente trabalho, foram avaliadas diferentes linhagens da raça 65 de *C. lindemuthianum*, que é uma das raças mais frequentes no Brasil (PINTO et al., 2012; SILVA et al., 2007). Essas linhagens apresentaram diferenças no número de minicromossomos e, apesar de pertencerem à mesma raça, têm apresentado diferenças na virulência quando inoculadas num conjunto adicional de diferenciadoras (COSTA, 2015; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011). A resistência no feijoeiro a estas linhagens da raça 65 é específica e é conferida por diferentes genes duplicados (COSTA, 2015). Além disso, essas linhagens formam CATs (Tabela 1), o que evidencia a possibilidade de transferência horizontal de genes/cromossomos. Os benefícios de um genoma acessório, como a potencial aquisição de novos fatores de virulência que podem expandir a variedade de hospedeiros, têm sido comentados por Croll e McDonald (2012).

Nas linhagens de *Glomerella* spp. também foi observada a presença de minicromossomos, ainda que em menor número e com menor resolução quando comparadas com as linhagens de *C. lindemuthianum*, o que está de acordo com a hipótese de manutenção meiótica de Kistler e Miao (1992). O número total de cromossomos obtido na análise citológica foi superior ao encontrado no PFGE

(Tabela 3 e Figura 8). Essa discrepância pode ter ocorrido em função da não separação de bandas no PFGE. Além disso, o maior número de cromossomos observado na análise do GTBM pode ter ocorrido devido à quebras de cromossomos maiores, seja devido ao processo de fixação durante a montagem das lâminas, ou mesmo a rearranjos cromossômicos na meiose (CROLL; ZALA; MCDONALD, 2013). As linhagens que mais evidenciaram a presença de minicromossomos foram as linhagens G85-1 e G89-1, que são heterotáticas e conidiais, e foram caracterizadas por Barcelos et al. (2014) como parte do grupo II apresentando sintomas brandos de antracnose, e em alguns casos, sintomas de sarna, quando re-inoculados em cultivares de feijão suscetíveis à antracnose (MOTA et al., 2016). Em contrapartida, as linhagens G8-1, G-43-2 e G73-4, que são homotáticas e peritécias, e que foram descritas como pertencentes ao Grupo I e reconhecidas por não produzirem sintomas, apresentaram menor número de minicromossomos.

As linhagens de *Glomerella* spp., em especial aquelas pertencentes ao grupo I, caracterizadas por produzirem peritécios, onde sabidamente são produzidos ascósporos resultantes de um processo de cariogamia e meiose, a variação no número cromossômico pode ser explicada por erros decorrentes do processo de meiose, como duplicações gênicas ou segmentais. Processos como estes levam a rearranjos cromossômicos, dando origem ao polimorfismo observado, matéria-prima necessária para a evolução de um cariótipo (CROLL; ZALA; MCDONALD, 2013). Além disso, as fusões cromossômicas podem gerar ciclos de quebra-fusão-ponte (QFP). Com isso, novos cromossomos vão sendo gerados, e um aspecto inexplorado é a capacidade de movimentação meiótica desses minicromossomos, com uma maior taxa de transmissão que o esperado sob segregação Mendeliana (CROLL; MCDONALD, 2013;).

Assim como observado por Croll, Zala e McDonald (2013) em *Z. tritici*, o complemento cromossômico em *Glomerella* é altamente plástico, com



variação tanto no número de cromossomos acessórios carregados por cada isolado, bem como, uma variação no conteúdo gênico, sendo que a meiose pode ser o mecanismo responsável na remodelagem dos complementos dos cromossomos acessórios.

Os dendrogramas obtidos a partir das análises de agrupamento demonstraram uma média a alta similaridade entre os perfis das linhagens, variando de 50 a 90%. Portanto, não houve separação entre as espécies de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. As similaridades observadas não foram coincidentes entre as linhagens da mesma espécie e até mesmo dentro de raças, como no caso de *C. lindemuthianum*, como também não confirmaram a diferenciação de grupos nas linhagens de *Glomerella* spp. No entanto, como já mencionado, houve alta similaridade entre linhagens das duas espécies, indicando que elas têm complementos cromossômicos em comum.

A formação de CATs entre linhagens de *Glomerella* e *C. lindemuthianum* tem sido observada (dados não publicados). Todas as linhagens avaliadas são oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro e essa grande plasticidade do genoma indica a possibilidade de rápida evolução nesse patossistema. Além disso, reforça a hipótese de que um complexo de espécies de *Colletotrichum* coabitem lesões de antracnose apresentando diferentes estilos de vida, ou seja, de saprófitas a patógenos. O feijoeiro é cultivado em três épocas por ano no Brasil, em diferentes condições ambientais, resultando em um sistema biológico complexo e favorecendo uma rápida evolução de novas espécies associadas ao feijoeiro (BARCELOS et al., 2014). Portanto, a estrutura dinâmica do genoma observado no presente trabalho, provavelmente conferida por esse complexo de espécies, deve favorecer o aumento da variabilidade genética por meio da transferência horizontal, via CATs, uma vez que todas as linhagens conidiais de ambas as espécies apresentam esse mecanismo. Além disso, as linhagens homotáticas de *Glomerella* podem utilizar dos mecanismos,

já mencionados na meiose, para gerar polimorfismo cromossômico. Os resultados obtidos forneceram novas perspectivas sobre a arquitetura do genoma de *Colletotrichum/Glomerella* e sua diversidade, bem como, auxiliar nas estratégias para controle de doenças emergentes no feijoeiro, como por exemplo, a sarna.



## 6 CONCLUSÕES

- As técnicas PFGE e GTBM foram eficientes na cariotipagem das linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp;
- Há polimorfismo cromossômico entre e dentro das linhagens avaliadas;
- O número cromossômico variou de cinco a 14 para as linhagens de *C. lindemuthianum* e de seis a 12 para as linhagens de *Glomerella* spp..



## REFERÊNCIAS

- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International/British Society for Plant Pathology, 1992.
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.
- BERGMANN, C.W. et al. Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors, and fungal infection. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 25–34, 1994.
- BioNumerics version Seven created by Applied Maths NV. Available from <http://www.applied-maths.com>.
- CAMARGO JÚNIOR, O. A. **Potencial da Reprodução Sexual na Diversidade Genética em Populações de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli***. 2008. 132 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CAMARGO JÚNIOR, O. A. et al. Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *Phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 607-615, 2007.
- CARBONELL, S. A. M. et al. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 60-65, 1999.
- CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H.F.; GÁLVEZ, G.E. **Problemas de produccion del fríjol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p.37-53.
- COLEMAN, J. J. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 8, p. e1000618, 2009.

COSTA, L. C. et al. Different genes conferring resistance to race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE 2015. BIENAL MEETING, 2015. Niagara Falls, Canadá. **Anais**. Niagara Falls, Canadá: 2015. p. 28.

CROLL, D.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A. Breakage-fusion-bridge Cycles and Large Insertions Contribute to the Rapid Evolution of Accessory Chromosomes in a Fungal Pathogen. **PLoS Genetics**, v. 9 n. 6, 2013.

CROLL, D.; MCDONALD, B. A. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

DEAN, R. A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, p. 980–986, 2005.

ELLWOOD, S. R. et al. A first genome assembly of the barley fungal pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres*. **Genome Biology**, v. 11, 2010.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, p. 859–868, 2003.

GALE, L. R. et al. Chromosome complement of the fungal pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. **Genetics**, v. 171, p. 985–1001, 2005.

GARRIDO, C. et al. Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 3, p. 397–411, 2009.

HE, C. et al. Distribution and relationship of chromosome-specific dispensable DNA sequences in diverse isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, v. 99, n. 11, p. 1325–1333, 1995.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility Is Suppressed Following Conidial Anastomosis Tube Fusion in a Fungal Plant Pathogen. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31175, 2012.

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

ISHIKAWA, F. H. et al. Symptoms and Prepenetration Events Associated with the Infection of Common Bean by the Anamorph and Teleomorph of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 270–277, 2010.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, v. 63, p. 156–161, 2008.

JOHNSTON, J.R. Pulsed field gel electrophoresis. In: JOHNSTON, J.R. (ed) **Molecular Genetics of Yeast**. Oxford: Oxford University Press, 1994. p. 83-96.

KAVA-CORDEIRO, V. et al. Pulsed Field Gel Electrophoresis Reveals Chromosome Length and Number Differences in Brazilian Strains of *Metarhizium Anisopliae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 1-6, 2005.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

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*. In: ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”, 1970, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: v. 27 p. 411-437.

KISTLER, H. C. et al. Genetic duplication in *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, v. 28 p. 173–176, 1995.

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

LIU, F. et al. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. **Micology**, Wageningen, 2013.

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

MA, L. -J. et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 367-73, 2010.



MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituição Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MASEL, A.W.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Mini-chromosomes of *Colletotrichum* spp. infecting several host species in various countries. **Mycological Research**, v. 97, n. 7, p. 852-856, 1993.

MCCLINTOCK, B. *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. **American Journal of Botany**, p. 671-678, 1945.

MEHRABI, R. et al. Karyotyping Methods for Fungi. In: Bolton, M.D.; Thomma, B.P.H.J, editors. **Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols**. New York: Springer Science, 2012. p. 591-601.

MEHRABI, R. et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 3, p. 542-54, 2011.

MEHRABI, R.; TAGA, M. A.; KEMA, G. H. J. Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. **Mycologia**, v. 99, n. 6, p. 868-876, 2007.

MIN, B. R.; JUNG, J. S.; CHOI, Y. K. Electrophoretic Karyotyping by PFGE in the Genus *Fusarium*. **The Korean Journal of Mycology**, v. 26, p. 135-143, 1998.

MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.

NICHOLSON, R.L. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and sorghum. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CAB International, UK, p. 186–202, 1992.

O'CONNELL, R. J. et al. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microscopy**, v. 181, n. 2, p. 204-212, 1996.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum*

*lindemuthianum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 27, p. 75-98, 1985.

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

PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J. C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, A. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104. 1994

PAULA JÚNIOR, T. J.; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata, 2012.

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

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2, p. 186-198, 1999.

PINTO, J. M. A. **Variabilidade fenotípica de isolados sexuais e assexuais de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2012. 94p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PINTO, J. M. et al. Investigating Phenotypic Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490-497, 2012.

PIRES, H. G. et al. Cytogenomic characterization of *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of coffee berry disease, reveals diversity in minichromosome profiles and genome size expansion. **Plant Pathology**, v. 65, n. 6, p. 968-977, 2015.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycology Research**, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, 2004.

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

ROCA, M. G. et al. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 367-373, 2003.

ROCA, M. G. **Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenck f. sp. *Phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sac & Man) Scriber)**. 1997. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S.. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.), **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CABI, 1992. p. 47–66.

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.

SHIRANE, N.; MASUKO, M.; HAYASHI, Y. Light microscopic observation on nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species. **Phytopathology**, v. 79, p. 728–730, 1989.

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

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

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

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology, and control**. Wallingford: CAB International/British Society for Plant Pathology, 1992. p. 1-26.

TAGA et al. Cytological analyses of the karyotypes and chromosomes of three *Colletotrichum* species, *C. orbiculare*, *C. graminicola* and *C. higginsianum*.

**Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 238–250, 2015.

TAGA, M. et al. Cytological observation of mitotic chromosomes in *Colletotrichum* spp. And its implications for chromosome analysis, genome Project and phylogenetics. In: 11<sup>TH</sup> EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS, 2012, Marburg, Germany. **Anais**. Marburg, Germany, 2012

TAGA, M.; MURATA, M.; SAITO, H. Comparison of different karyotyping methods in filamentous ascomycetes – a case study of *Nectria haematococca*. **Mycological Research**, v. 102, p. 1355-1364, 1998.

TAGA, M.; MURATA, M. Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. **Chromosoma**, v. 103, p. 408-413, 1994.

TSUCHIYA, D.; TAGA, M. Cytological karyotyping of three *Cochliobolus* spp. by the germ tube burst method. **Phytopathology**, v. 91 p. 354–360, 2001.

VAILLANCOURT, L.J. et al. Genetic analysis of cross fertility between two self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. **Mycologia**, v.92: p. 430-435, 2000.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E. de S. Melhoramento de feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 301-392.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. p. 231.

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

WIELOCH, W. Chromosome visualisation in filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 1-8, 2006.

YOUNG, R. A. et al. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G 2333. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96 p. 87-94, 1998.