

BRUNO PEREIRA BALBI

**VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Pseudocercospora griseola E AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA
DO FEIJOEIRO À MANCHA ANGULAR**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B172v
2009

Balbi, Bruno Pereira, 1983-

Variabilidade fisiológica e molecular de isolados de
Pseudocercospora griseola e avaliação de fontes de
resistência do feijoeiro à mancha angular / Bruno Pereira
Balbi. – Viçosa, MG, 2009.

xiii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Pseudocercospora griseola*. 2. Mancha-angular.
3. Feijão - Resistência a *Pseudocercospora griseola*.
4. Feijão - Doenças e pragas. 5. Biologia molecular.
6. Marcadores genéticos. 7. Feijão - Melhoramento
genético. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.55

BRUNO PEREIRA BALBI

**VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Pseudocercospora griseola E AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA
DO FEIJOEIRO À MANCHA ANGULAR**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 31 de julho de 2009.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-orientador)

Dr. Newton Deniz Piovesan

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

"Qualquer um pode contar as sementes em uma maçã, mas só Deus pode contar o número de maçãs em uma semente."

ROBERT H. SCHULLER

"As pessoas podem tornar-se aquilo que imaginam ser. Quem se julga insignificante só poderá ser insignificante. Quem tem a convicção "Hei de ser um grande personagem" tornar-se-á realmente um grande personagem. Mas nada adianta ter essa convicção se levar uma vida ociosa. É preciso esforçar-se concretamente para alcançar o objetivo".

MASAHARU TANIGUCHI

"As oportunidades parecem vir repentinamente de fora, mas, na realidade, somos nós quem as criamos e as fazemos acontecer. Existe um ditado antigo: "Ocorrem situações auspiciosas na casa onde há virtudes acumuladas". Quem sempre dedica amor ao próximo e trabalha para dar alegria aos semelhantes terá naturalmente oportunidades que lhe trarão muita alegria".

MASAHARU TANIGUCHI

Àqueles que eu tanto amo: Deus, minha mãe Teresinha, meu pai César, meu irmão Mateus e minha namorada Camila. Sem vocês eu não chegaria até aqui. E também àqueles que não acreditaram em minha capacidade. Isto tudo me fez crescer cada dia mais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, todo poderoso, que por sua grandeza e presença abriu e cuidou dos meus caminhos para que eu conseguisse mais esta vitória.

Aos meus pais César e Teresinha, pelo apoio, incentivo, orações, pela confiança depositada em mim e também por me acolherem nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Mateus, meus avós, tios e primos que perceberam a minha luta e sempre me incentivaram.

A minha namorada e companheira de longos anos Camila, por seu amor, carinho, compreensão, apoio e por tantos momentos felizes que jamais esquecerei.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL) pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação, ensinamentos, conselhos, disponibilidade, confiança e amizade, exercidos desde a minha graduação, além de ser um exemplo de caráter e ética, manifesto minha gratidão especial.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, por tantas sugestões, ensinamentos e força concedidos a mim ao longo de quase cinco anos. E também por sua dedicada co-orientação no Mestrado.

À Professora Karla Suemy Clemente Yotoko, pela disponibilidade, amizade e pela ajuda na interpretação dos dados moleculares.

Aos Professores Robert Weingart Barreto e Olinto Liparini Pereira, pelos ensinamentos, confiança e por terem possibilitado a realização de parte deste trabalho na Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV.

A todos os membros da banca, por dedicarem o seu tempo visando à melhoria deste trabalho.

Ao Professor Geraldo Antônio de Andrade Araújo e ao Engenheiro Marco Antônio Giacoia, por tantas "caronas" de Ubá-Viçosa e de Viçosa-Ubá, nestes meus bons anos de UFV, serei para sempre grato.

Ao pesquisador da EMBRAPA Aloísio Sartorato pela disponibilização de sementes da série diferenciadora da mancha angular.

Ao amigo Demerson Arruda Sanglard, pela ajuda e incentivo durante o desenvolvimento dos trabalhos no laboratório BIOMOL.

Aos amigos Márcia Regina Costa, Kléver Antunes Arruda e Newton Deniz Piovesan, que juntamente com Demerson, viajaram por longos dias, coletando o material necessário para que eu desenvolvesse este trabalho, muito obrigado a todos. E também a amiga Danielle Durso, pela ajuda nos experimentos moleculares.

Aos outros amigos de laboratório: Janaína, Suelen, Valéria, Ricardo, Alberto, Carlos Alexandre, Eduardo, Giselle, Fernanda, Josiane, Josie, Jeziel, Marcelo, Leonardo, Julierme, Lucas, Gabriela, Dodora, Márcia, Mateus, Carlos Lázaro, Thiago, Glauco, Márcia Flores, José Eduardo, Álisson, Pedro Ivo, Fábio, Marcos, Lorêta, Jorge e outras pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão desta etapa.

Ao amigo Cássio, pela disponibilidade, companheirismo e cumprimento correto de suas funções, o que contribuiu para este trabalho ser realizado.

Ao amigo Luckas Sabioni Lopes pela ajuda e consideração.

Aos funcionários, Reginaldo, Senhor Pintinho, José Carlos, José Fausto, Gláucia e Marlene. Cada um, na sua tarefa e pela amizade, contribuiu para esta conquista.

Aos professores que ministraram as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, e aos colegas de curso, em especial André Pereira Leão, pela amizade e longos dias de estudo.

Aos meus amigos e amigas de Ubá, Visconde do Rio Branco, Juiz de Fora e Viçosa e também aos amigos de república, sou grato.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, indispensável à condução deste trabalho.

E a todos que torceram por esta vitória, serei eternamente grato a todos vocês.

BIOGRAFIA

BRUNO PEREIRA BALBI, filho de César Augusto Silveira Balbi e Teresinha Inês Pereira Balbi, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, no dia 28 de Outubro de 1983.

Residente em Ubá, Minas Gerais, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Sagrado Coração de Maria e o Ensino Médio no Colégio Anglo em 2001.

Em Março de 2003, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas (definindo como ênfase a área de Genética e Biologia Molecular) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo-o em agosto de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, na área de Genética Molecular de Plantas e de Microorganismos, concentrando seus estudos na caracterização da variabilidade fisiológica e molecular de *Pseudocercospora griseola*, o agente causal da mancha angular do feijoeiro, e em avaliação de fontes de resistência do feijoeiro ao patógeno.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1. O feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	7
3.1.1. Importância da cultura	7
3.1.2. Origem, domesticação e organização da diversidade genética.....	9
3.2. A mancha angular [<i>Pseudocercospora griseola</i> (Sacc.) Crous & U. Braun]	11
3.2.1. Aspectos gerais	11
3.2.2. Aspectos etiológicos e fisiológicos.....	13
3.2.3. Alterações na nomenclatura	16
3.2.4. Variabilidade patogênica.....	17
3.2.5. Formas de controle da mancha angular	24
3.2.6. Fontes de resistência utilizadas no Brasil	25
3.3. Co-evolução planta-patógeno	28
3.4. Região ITS (espaçadores internos transcritos)	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 1	44
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PATÓTIPOS DE <i>Pseudocercospora griseola</i> ORIUNDOS DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE MINAS GÉRIAS E AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO	44
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Locais de condução dos experimentos	47
2.2. Locais de coleta das folhas sintomáticas	47
2.3. Obtenção de culturas monospóricas.....	48
2.4. Preparo do inóculo	50
2.5. Inoculação, avaliação de sintomas e caracterização em patótipos.....	50

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO 2	65
CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATÓTIPOS DE <i>Pseudocercospora</i> <i>griseola</i> COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO ITS DO rDNA NUCLEAR	65
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. Obtenção de micélio para extração de DNA	68
2.2. Extração de DNA genômico	69
2.3. Quantificação do DNA genômico total	70
2.4. Amplificação da região ITS do rDNA.....	71
2.5. Sequenciamento da região ITS.....	71
2.6. Captura de sequências no GenBank	72
2.7. Edição das sequências	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4. CONCLUSÕES	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

RESUMO

BALBI, Bruno Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009.
Variabilidade fisiológica e molecular de isolados de *Pseudocercospora griseola* e avaliação de fontes de resistência do feijoeiro à mancha angular. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Olinto Liparini Pereira.

A mancha angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun é uma das principais doenças que acometem a cultura do feijoeiro, podendo ser encontrada em todas as regiões produtoras, principalmente quando a cultura é submetida à condição de temperaturas amenas em cultivos irrigados. Esta condição aliada ao uso de cultivares suscetíveis favorece a ocorrência da doença ocasionando perdas na produção que atingem 80%. Uma opção de controle da enfermidade é o uso de cultivares resistentes. No entanto, a eficiência no uso da resistência depende do conhecimento sobre a variabilidade patogênica e distribuição geográfica do patógeno. Diversos trabalhos têm mostrado a ampla variabilidade patogênica de *P. griseola* e a sua co-evolução com os *pools* gênicos Andino e Mesoamericano do feijoeiro. Pelo processo de co-evolução, populações de *P. griseola* também podem ser divididas em dois *pools* gênicos: Andino (*P. griseola* formae *griseola*) que tiveram evolução paralela com variedades de feijão de origem Andina, sendo capazes de incitar a doença apenas em feijões Andinos; e Mesoamericano (*P. griseola* formae *mesoamericana*) que tiveram evolução com variedades de feijão de origem Mesoamericana, sendo capazes de incitar a doença em feijões Mesoamericanos e também em alguns feijões Andinos. Os principais objetivos deste estudo foram: caracterizar isolados de *P. griseola*, provenientes de nove cidades de três regiões do Estado de Minas Gerais - Brasil, utilizando as variedades diferenciadoras da mancha angular; avaliar fontes de resistência ao patógeno utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV frente a estes isolados; e através da região ITS (ITS1-5,8S-ITS2) do *cluster* gênico do rDNA caracterizar a diversidade genética de 48 isolados de *P. griseola*, utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4. Com o auxílio das variedades diferenciadoras, foram

caracterizados 31 isolados monospóricos de *P. griseola*, obtendo-se 15 patótipos distintos, o que demonstra a alta variabilidade deste patógeno. O patótipo 63-63 foi o mais frequente com 12 dos 31 isolados caracterizados e foi detectado em sete das nove cidades visitadas. O patótipo 63-23 ocorreu em três cidades com a frequência de três isolados; os patótipos 63-7, 47-39 e 15-7 ocorreram em duas cidades cada um, com a frequência de dois isolados e os demais patótipos ocorreram em uma única cidade com a frequência de um isolado. A constatação de que vários isolados foram caracterizados como patótipo 63-63, ou seja, apresentam reação de compatibilidade com todas as variedades diferenciadoras, sugere que a série diferenciadora necessita ser revista, possivelmente, com a inclusão de novas variedades e/ou exclusão de determinadas variedades, visando melhor discriminação em patótipos. Todos os isolados apresentaram reação de compatibilidade com as variedades Andinas e Mesoamericanas, o que os classifica como pertencentes ao grupo Mesoamericano. As variedades México 54, BAT 332, Cornell 49-242, AND 277 e MAR-2, utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, foram resistentes, respectivamente, a 11, 10, 11, 10 e 8 dos 15 patótipos caracterizados. Apesar disso, nenhuma das fontes utilizadas foi resistente ao patótipo 63-63 caracterizado a partir dos isolados identificados como A₁8, A₂12, AJ 12, B₁ 46, B₇ 50, C₁1, SM 17, SM 20 e SM₂11 evidenciando a necessidade de se buscar novos acessos que ofereçam resistência à mancha angular. Outra constatação é que alguns isolados caracterizados como um mesmo patótipo proporcionaram reações diferenciadas quando inoculados nas fontes de resistência, mostrando que existem diferenças em relação à patogenicidade. As análises das inoculações na série diferenciadora ainda evidenciaram que as variedades Don Timóteo, G11796 e Bolón Bayo não estão sendo relevantes na discriminação dos patótipos. Estas duas constatações oferecem, mais uma vez, suporte para a proposta de revisão dos genótipos utilizados na série diferenciadora da mancha angular. A variabilidade genética de *P. griseola* tem sido examinada também através de diversos outros tipos de análises envolvendo caracteres morfológicos e moleculares. Neste trabalho, através de análises da região ITS (ITS1-5,8S-ITS2) do rDNA, utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4, realizou-se um estudo acerca da diversidade

genética de isolados de *P. griseola*, obtidos no Estado de Minas Gerais (Brasil) e em outras localidades do mundo, evidenciando a eficiência da região ITS para este propósito. Verificou-se a existência de cinco haplótipos distintos, agrupados pela existência de cinco mutações entre as sequências estudadas. Estes haplótipos formaram dois haplogrupos: um constituído por todos os isolados de origem Mesoamericana (três haplótipos) e outro constituído por isolados de origem Andina e por isolados que não possuem informações acerca do *pool* gênico (dois haplótipos). Este resultado indica que os isolados que não possuem o *pool* gênico definido, possivelmente, pertencem ao acervo Andino de *P. griseola*. A constatação de que todos os isolados obtidos no Estado de Minas Gerais pertencem ao *pool* gênico Mesoamericano comprova a existência de co-evolução entre *Phaseolus vulgaris* e *Pseudocercospora griseola*, já que no Brasil predomina o cultivo de feijão do *pool* gênico Mesoamericano.

ABSTRACT

BALBI, Bruno Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009.
Physiological and molecular variability of isolates of *Pseudocercospora griseola* and evaluation of sources of resistance to angular leaf spot of bean. Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Olinto Liparini Pereira.

The angular leaf spot, incited by the fungus *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun is one of the major diseases that affect the culture of the bean, can be found in all producing regions, especially when the culture is subjected to condition of mild temperatures in irrigated crops. This condition coupled with the use of susceptible cultivars favors the occurrence of the disease causes losses in production reaching 80%. An option to control the disease is the use of resistant cultivars. However, the efficiency in the use of resistance depends on knowledge of pathogenic variability and geographical distribution of the pathogen. Several studies have shown the extensive pathogenic variability of *P. griseola* and their co-evolution with the Andean and Mesoamerican gene pools of common bean. By the process of co-evolution, populations of *P. griseola* can also be divided into two gene pools: Andean (*P. griseola* formae *griseola*) that had parallel evolution with varieties of Andean origin beans, being able to bring the disease only in Andean beans; and Mesoamerican (*P. griseola* formae *mesoamericana*) that had parallel evolution with varieties of Mesoamerican origin beans, being able of inciting disease in Mesoamerican beans and also in some Andean beans. The main objectives of this study were characterized isolates of *P. griseola*, from nine cities in three regions of Minas Gerais State - Brazil, using the differential varieties; evaluate sources of resistance to the pathogen used by the Beans Improvement Program of BIOAGRO/UFV against these isolates; and, through the ITS region (ITS1-5,8S-ITS2) of the rDNA gene cluster, to characterize the genetic diversity of 48 isolates of *P. griseola*, using the universal primers ITS1 and ITS4. With the support of differential varieties were characterized 31 isolates monosporic of *P. griseola*, obtaining 15 distinct pathotypes, which demonstrates the high

variability of this pathogen. The pathotype 63-63 was the most frequent with 12 of the 31 isolates characterized and was detected in seven of the nine cities visited. The pathotype 63-23 occurred in three cities with the frequency of three isolates, the pathotypes 63-7, 15-7 and 47-39 occurred in two cities each with a frequency of two isolates and the other occurred in a single city with the frequency of one isolate. The fact that several isolates were characterized as pathotype 63-63, in other words, which present reaction of compatibility with all differential varieties, suggests that the differential series needs to be revised, possibly with the inclusion of new varieties and/or exclusion of certain varieties, in order to better discrimination in pathotypes. All isolates showed reaction compatibility with the of Andean and Mesoamerican varieties, which classifies them as belonging to the Mesoamerican group. Varieties Mexico 54, BAT 332, Cornell 49-242, AND 277 and MAR-2, used by the Beans Improvement Program of BIOAGRO/UFV, were resistant, respectively, 11, 10, 11, 10 and 8 of the 15 pathotypes characterized. Nevertheless, none of the sources used was resistant to pathotype 63-63 characterized from isolates identified as A₁8, A₂12, AJ12, B₁46, B₇50, C₁1, SM17, SM20 and SM₂11 showing the need to seek new access that offer resistance to angular leaf spot. Another finding is that some isolates characterized as the same pathotype provided differing responses when inoculated into sources of resistance, showing that there are differences in relation to pathogenicity. The analysis of the inoculations in this differential series also showed that the varieties Don Timoteo, G11796 and Bolón Bayo are not relevant in discrimination of pathotypes. These two findings provide, once again, support for the proposed revision of the genotypes used in the differential series of angular leaf spot. The genetic variability of *P. griseola* is also examined through several other types of analysis involving morphological and molecular characters. In this work, through analysis of the ITS region (ITS1-5,8S-ITS2) of rDNA, using the universal primers ITS1 and ITS4, held a study on the genetic diversity of isolates of *P. griseola*, obtained in the State of Minas Gerais (Brazil) and elsewhere in the world, showing the efficiency of the ITS region for this purpose. It was found that there are five different haplotypes, grouped by the existence of five mutations among the sequences studied. These haplotypes formed two haplogroups: one consisting by all isolates of

Mesoamerican origin (three haplotypes) and other consisting by isolates of Andean origin and isolates that do not have information about the gene pool (two haplotypes). This result indicates that the isolates that lack the gene pool defined, possibly belonging to the collection of Andean *P. griseola*. The finding that all isolates obtained in State of Minas Gerais belong to the Mesoamerican gene pool proves the existence of co-evolution between *Phaseolus vulgaris* and *Pseudocercospora griseola*, since in Brazil predominate the cultivation of beans Mesoamerican gene pool.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das mais importantes leguminosas consumidas de forma direta no mundo. O Brasil é o maior produtor mundial (FAO, 2008) e também o maior consumidor dessa leguminosa. O feijão é reconhecidamente uma excelente fonte de proteínas, vitaminas (folatos) e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn), especialmente em países em desenvolvimento (MIKLAS *et al.*, 2006). Além da grande importância na dieta do brasileiro, o feijão é um produto agrícola de relevância econômica e social, por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que utilizam alta tecnologia. No entanto, a produtividade brasileira ainda é pouco expressiva estando em torno de 882 kg/ha (CONAB, 2009).

Dentre os diversos fatores que contribuem para a baixa produtividade da cultura, verifica-se o grande número de doenças fúngicas que acometem a parte aérea, com destaque para a antracnose, incitada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., a ferrugem, incitada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger e a mancha angular, incitada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. Estes patógenos apresentam um grande número de patótipos o que dificulta o controle das doenças (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 2006).

A mancha angular do feijoeiro é uma doença que tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores, devido aos surtos cada vez mais precoces e intensos nos últimos anos. Atualmente, é a principal doença da parte aérea desta cultura no Brasil, sendo encontrada em todas as regiões em que a leguminosa é cultivada (RAVA, 2002). Os prejuízos na produtividade são maiores, quanto mais precoce for o aparecimento da doença na cultura, podendo comprometer até 80% da produção (MAHUKU *et al.*, 2002), dependendo da suscetibilidade dos cultivares, das condições ambientais e da agressividade dos isolados.

A associação de boas práticas de manejo e uso de cultivares resistentes é uma das estratégias mais eficientes no controle da mancha angular, pois, além de diminuir o custo de produção, reduz os impactos negativos ao

ambiente ocasionados pelo uso de defensivos agrícolas. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro é objetivo constante dos programas de melhoramento. Assim, em 1992, houve o início do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Em trabalhos realizados, foram identificadas várias fontes de resistência à mancha angular, com destaque para México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e BAT 332. A partir destas fontes, isolinhas foram obtidas e utilizadas em estratégias de melhoramento pelo mesmo Programa (CAIXETA *et al.*, 2002; CAIXETA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANGLARD *et al.*, 2007).

No entanto, a eficácia no uso desta resistência depende do conhecimento prévio da variabilidade do patógeno e da distribuição geográfica de patótipos de *P. griseola*. Ao longo das últimas décadas, diversos estudos comprovam a ampla variabilidade de *P. griseola* (SARTORATO & RAVA, 1984; RIBEIRO *et al.*, 1993; PASTOR-CORRALES & JARA, 1995; GUZMÁN *et al.*, 1995; SARTORATO, 2002; PASTOR CORRALES *et al.*, 1998; STENGLEIN *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2006; VITAL, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

O estudo da variabilidade patogênica entre isolados de *P. griseola* tem sido realizado mediante a reação de um conjunto de 12 variedades diferenciadoras pertencentes aos dois *pools* gênicos do feijão comum, Andino e Mesoamericano. Estas variedades foram estabelecidas no *International Workshop on the Angular Leaf Spot of Common Beans*, realizado no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em 1995. Dentre os benefícios desta padronização destacam-se o intercâmbio de germoplasma e de informações sobre a distribuição dos patótipos entre pesquisadores de diversas partes do mundo, o que pode contribuir para a eficácia dos programas de melhoramento visando resistência à mancha angular.

Experimentos acerca da diversidade genética de *P. griseola* e de sua co-evolução com o feijoeiro na América Latina confirmaram a separação dos fenótipos de virulência em dois *pools* gênicos: o primeiro, denominado Andino (*P. griseola* formae *griseola*), que apresenta reação de compatibilidade unicamente com variedades de feijoeiro de origem Andina e, o segundo, denominado Mesoamericano (*P. griseola* formae *mesoamericana*), que apresenta reação de compatibilidade principalmente com variedades de

feijoeiro de origem Mesoamericana, apesar de ser virulento para algumas variedades Andinas. Os resultados destes estudos também comprovaram a existência do processo de co-evolução entre *P. griseola* e *P. vulgaris*, ou seja, isolados Andinos de *P. griseola* tiveram evolução paralela com variedades de feijão de origem Andina; enquanto que os isolados Mesoamericanos tiveram evolução com variedades de feijão de origem Mesoamericana, principalmente (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995). No Brasil, verifica-se que os patótipos pertencem ao *pool* gênico Mesoamericano, já que predomina o cultivo de feijão Mesoamericano, o que comprova a existência do processo de co-evolução.

A diversidade entre isolados de *P. griseola* tem sido examinada também através de análises de isoenzimas (CORREA-VICTORIA, 1988), de marcadores RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*) (GUZMÁN *et al.*, 1995; PASTOR-CORRALES & JARA, 1995), da gama de hospedeiros, de características culturais e morfológicas, além de análises de seqüências de DNA (CROUS *et al.*, 2006).

Uma das técnicas moleculares que vem sendo utilizada em análises genéticas de fungos é a amplificação de seqüências de nucleotídeos da região do *cluster* gênico do rDNA através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os genes que codificam RNAs ribossômicos estão organizados em unidades repetidas em *tandem* e separados por espaçadores internos, como as seqüências ITS1 e ITS2, apresentando-se em diversas cópias no genoma de eucariotos. A região dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) apresenta um nível intermediário de variação, o que torna essas seqüências apropriadas para o estudo em nível de gênero, de espécies próximas ou dentro de uma mesma espécie (KO *et al.*, 1993). No caso de *P. griseola*, a análise da região ITS1-5,8S-ITS2 pode ser utilizada para estudos de diversidade genética entre diferentes isolados obtidos.

Portanto, devido à crescente importância da mancha angular, estudos fenotípicos baseados em inoculações artificiais utilizando as variedades diferenciadoras e estudos genotípicos de seqüências de nucleotídeos, como a região ITS1-5,8S-ITS2 do gene de rDNA, fornecem resultados importantes acerca da distribuição geográfica, do *pool* gênico e da freqüência dos isolados obtidos. Estes resultados são importantes, pois permitem o monitoramento da

viabilidade de uso e da eficiência das fontes de resistência já utilizadas e a identificação de novos acessos portadores de genes que conferem resistência efetiva, ampla e estável à mancha angular.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar isolados de *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun provenientes de diversas localidades do Estado de Minas Gerais utilizando as variedades diferenciadoras; avaliar fontes de resistência ao patógeno utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV frente a estes isolados; e através da análise da região ITS (ITS1-5,8S-ITS2) do *cluster* gênico do rDNA de 48 isolados realizar um estudo acerca da diversidade genética do fungo *P. griseola*.

Para atingir estes objetivos, foram executadas as seguintes etapas:

- Coleta de folhas de feijoeiro que apresentavam sintomas de mancha angular nas seguintes localidades do Estado de Minas Gerais: Lagoa Formosa (Região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba); Paracatu e Unaí (Região Noroeste); Alto Jequitibá, Canaã, Coimbra, Manhumirim, São Miguel do Anta e Viçosa (Região da Zona da Mata);
- Obtenção de culturas monospóricas do fungo a partir de folhas coletadas apresentando sintomas da doença;
- Caracterização dos diferentes isolados em patótipos, utilizando as variedades diferenciadoras;
- Pelos resultados das regiões amostradas, inferir sobre a distribuição dos patótipos no Estado de Minas Gerais;
- Avaliação das fontes de resistência utilizadas pelo Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV: BAT 332, Cornell 49-242 e México 54 (pertencentes à série diferenciadora), além de AND 277 e MAR-2, frente aos isolados caracterizados.

- Obtenção de massa micelial de cada um dos isolados para extração de DNA genômico total;
- Amplificação da região ITS do cluster gênico do rDNA (via PCR) com os *primers* universais ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990);
- Sequenciamento de DNA da região amplificada;
- Captura de sequências da região ITS de isolados de *P. griseola* obtidos em diversas localidades do mundo. A captura será realizada no GenBank (*National Center for Biotechnology Information*);
- Alinhamento e análise das seqüências através de *softwares* especializados;
- Obtenção de haplótipos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

3.1.1. Importância da cultura

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma importante fonte de carboidratos (cerca de 60%) e de proteínas (20 a 30%) na dieta humana. Além disso, é excelente fonte de lipídios, vitaminas, fibras, compostos antioxidantes e sais minerais. O baixo teor de água nas sementes (10 a 15%) é o fator responsável pela concentração destes elementos nos grãos (VIEIRA *et al.*, 1998).

O feijão possui alta expressão econômica e social, sendo juntamente com o arroz, a base da alimentação do povo brasileiro (MOURA *et al.*, 1994). Além da sua importância na dieta, o feijão é uma das alternativas de exploração agrícola em pequenas propriedades, fornecendo ocupação para a mão-de-obra menos qualificada; também é cultivado em escala empresarial, utilizando toda tecnologia disponível para otimizar a produção (BORÉM & CARNEIRO, 1998). Entretanto, no Brasil, a produtividade média estimada é ainda muito baixa, estando em torno de 882 kg/ha (CONAB, 2009). Contudo, o potencial produtivo da cultura é bem mais alto, podendo chegar a 4000 Kg/ha, em condições favoráveis (VIEIRA *et al.*, 1999).

De acordo com os valores divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a estimativa da produção nacional de feijão para a safra de 2007/08 foi de 3,521 milhões de toneladas em uma área plantada de 3,993 milhões de hectares. O Estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor nacional, ficando atrás apenas do Estado do Paraná. A estimativa de produção na safra de 2007/08, para o Estado de Minas Gerais, foi de 566,1 mil toneladas, que corresponde a 16,08% da produção nacional (CONAB, 2009).

O Brasil é o maior produtor e o maior consumidor mundial de feijão, seguido pela Índia e pela China (FAO, 2008). Quanto ao consumo, existem preferências de acordo com a região. O feijão preto é consumido,

principalmente, no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio de Janeiro. Já nas demais regiões do país, o consumo é quase exclusivo do feijão tipo “carioca”, ou seja, feijão de cor creme com rajas marrons. No caso do feijão vermelho, seu consumo é bastante restrito, ocorrendo apenas na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

O consumo *per capita* de feijão no país está em torno de 17 kg/ano (FAO, 2008). Porém, esse índice de consumo é bem inferior ao apresentado no início da década de 70, cerca de 25 kg/ano. As possíveis causas do menor consumo desta leguminosa, nas últimas décadas, foram o êxodo rural, com alteração dos padrões de consumo da população e a redução do preço de outras fontes protéicas (BORÉM & CARNEIRO, 2006).

Em relação às épocas de produção do feijoeiro no Brasil, tem-se que, diante da enorme diversidade fisiográfica e da ampla adaptação da cultura em diferentes condições de solo e clima, a semeadura é realizada em três períodos do ano: o chamado período das “águas”, nos meses de setembro a novembro, o período da “seca” ou safrinha, de janeiro a março e o de outono-inverno ou “terceira época”, nos meses de maio a julho. No plantio de outono-inverno ou “terceira época”, a lavoura, geralmente, necessita de irrigação. No período da “seca”, com a escassez de chuvas durante o ciclo da cultura, torna-se necessário, neste caso, complementar com irrigação (EMBRAPA, 2008). Embora esses períodos possam apresentar variações de ano a ano, pode-se constatar que há colheita praticamente o ano todo, existindo sobreposição de épocas em algumas regiões (FERREIRA *et al.*, 2002).

Apesar do aumento da produtividade observado nos últimos anos, a cultura do feijoeiro sofre inúmeras interferências que prejudicam a produtividade, como a alta incidência de doenças, o que dificulta muitas vezes, a obtenção de safras seguras. Mais de 45 diferentes doenças podem acometer a cultura do feijão no Brasil, dentre as quais, apenas dez, são de importância significativa (VIEIRA, 1983). Muitas doenças do feijoeiro podem causar, dependendo das condições de ambiente, perdas extremas na produção ou, então, dependendo do nível de infestação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Dentre as principais doenças do feijoeiro que ocorrem em Minas

Gerais, a mancha angular, incitada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun tem sido apontada como a mais importante da parte aérea.

3.1.2. Origem, domesticação e organização da diversidade genética

O feijão comum é a espécie mais amplamente distribuída e cultivada dentre aquelas do gênero *Phaseolus*, um gênero que compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco foram domesticadas e são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus* (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2007). Entre as cinco espécies domesticadas, *P. vulgaris* ocupa mais de 85% da área de produção de feijão mundial e é uma das leguminosas mais consumidas no mundo (SINGH, 2001).

A organização intra-específica da diversidade genética em *Phaseolus vulgaris* (tipos selvagens e domesticados) tem sido bastante estudada nos últimos anos. Através de diversas análises, descobriu-se que o feijão comum é uma espécie não-cêntrica, ou seja, possui origens múltiplas e apresenta centros de domesticação independentes (VIEIRA *et al.*, 2005). Existem diversas hipóteses para explicar a origem e domesticação do feijoeiro. Tipos selvagens, similares a variedades crioulas simpátricas, encontrados no México e a existência de tipos domesticados, datados de cerca de 7.000 a.C., na Mesoamérica, suportam a hipótese de que o feijoeiro teria sido domesticado na Mesoamérica e disseminado, posteriormente, na América do Sul. Por outro lado, achados arqueológicos mais antigos, cerca de 10.000 a.C., de feijões domesticados na América do Sul, mais especificamente na região dos Andes (sítio de Guitarrero, no Peru), são indícios de que o feijoeiro teria sido domesticado nesta região e disseminado para a região Mesoamericana (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2007). Deste modo, verifica-se a existência de dois *pools* gênicos principais do feijão comum, denominados Andino e Mesoamericano, que foram os primeiros a serem conhecidos e identificados.

As evidências que levaram às conclusões sobre a existência destes dois *pools* gênicos foram embasadas em análises eletroforéticas da proteína

faseolina, presente nas sementes (GEPTS *et al.*, 1986), de isoenzimas (SINGH *et al.*, 1991a), de características morfológicas (SINGH *et al.*, 1991b), em análises de marcadores de DNA (BECERRA VELÁSQUEZ & GEPTS, 1994) e de RFLPs de DNA mitocondrial (KHAIRALLAH *et al.*, 1990) e pela fragilidade ocasional em híbridos F₁ (GEPTS & BLISS 1985).

Através das análises de isoenzimas e da proteína faseolina de acessos de feijões, que não possuíam exemplares em bancos de germoplasma, foi descrito um terceiro *pool* gênico, denominado intermediário, localizado no norte da região dos Andes (Equador e Norte do Peru). Acredita-se, que este *pool* seja o núcleo da diversidade do feijoeiro e que foi a partir dele que os feijões selvagens se dispersaram para o norte e para o sul do continente americano, servindo como base para a formação dos dois *pools* gênicos principais: Andino, que inclui populações do Peru, Bolívia e Argentina e Mesoamericano, que inclui populações do México, América Central e Colômbia (GEPTS, 1998).

Embora o isolamento geográfico entre os dois *pools* gênicos ainda necessita ser corretamente datado, verifica-se que já ocorreu o processo de especiação, que pode ser demonstrado pela dificuldade de geração de híbridos F₁ férteis, quando se utiliza genitores de cada um dos *pools*, e por análises gênicas (GEPTS *et al.*, 1986). Em contraste, cruzamentos entre tipos selvagens e domesticados de feijão de um mesmo *pool* gênico são compatíveis, proporcionando híbridos F₁ viáveis (KOINANGE & GEPTS, 1992).

Os dois *pools* gênicos principais foram divididos em seis raças ecogeográficas: Mesoamérica, Durango e Jalisco (*pool* Mesoamericano) e Nueva Granada, Chile e Peru (*pool* Andino). Estas raças representam os exemplares selvagens de feijão e as diversas formas cultivadas que se desenvolveram em consequência da domesticação. A determinação destas raças foi baseada em análises do DNA, no tipo de proteína faseolina, na distribuição ecológica e geográfica, no hábito de crescimento, no tipo de semente, dentre outras características (SINGH *et al.*, 1991c).

Algumas destas raças foram levadas para outros países, como é o caso do Brasil, que possui altos níveis de cultivo e de consumo de feijões do tipo carioca (grãos de cor creme com rajas marrons), que se enquadram na raça Mesoamerica do *pool* gênico Mesoamericano (ACOSTA-GALLEGOS *et al.*,

2007). Com o cultivo em diversas regiões do mundo, observa-se que a produção de feijão é, atualmente, mais importante e expressiva fora dos centros de domesticação.

Investigações recentes têm mostrado a existência de fluxo gênico entre feijões selvagens e domesticados, apesar do feijão ser uma espécie predominantemente autógama, ou seja, reproduz-se por autofecundação (PAPA & GEPTS, 2003; PAPA *et al.*, 2005). Isto tem levado a uma alteração da distribuição da diversidade genética entre populações selvagens e domesticadas. O sentido do fluxo gênico é, em geral, de populações domesticadas para aquelas selvagens, levando a uma substancial introgressão de alelos domesticados em tipos selvagens.

Além disso, verificou-se que a taxa de fluxo gênico é três vezes maior no sentido de domesticados para selvagens (PAPA & GEPTS, 2003). Como consequência, a diversidade genética de populações selvagens e domesticadas, de muitos locais, é substancialmente deslocada, ocasionando alteração da variabilidade inerente (PAPA *et al.*, 2005), o que gera preocupações acerca do comportamento da espécie sob condições adversas e também em relação ao desenvolvimento de variedades melhoradas. Diante disso, verifica-se a necessidade de utilização do germosplasma dos dois *pools* gênicos no desenvolvimento de novas variedades dada a divergência genética entre eles. Assim, novas combinações gênicas poderiam ser obtidas e ampliadas com a recombinação (BECERRA-VELÁSQUEZ & GEPTS, 1994).

3.2. A mancha angular [*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun]

3.2.1. Aspectos gerais

Pseudocercospora griseola (Sacc.) Crous & U. Braun é um fungo mitospórico, pertencente ao grupo dos cercosporóides (BRAUN, 1995a). Com base em dados morfológicos e de filogenia molecular, *Pseudocercospora* é considerado gênero anamórfico de *Mycosphaerella* (CROUS *et al.*, 2001). Este

fungo foi descrito inicialmente como *Isariopsis griseola* por Saccardo, em 1878 (NIETSCHKE, 1997). Em 1909, Ferraris concluiu que o gênero *Isariopsis* era sinonímia do gênero *Phaeoisariopsis*, propondo então a denominação *Phaeoisariopsis griseola* para o patógeno (ZAUMEYER & THOMAS, 1957). Recentemente, BRAUN & CROUS (2006), propuseram a mudança do nome *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris para *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, o que foi acatado pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Esta espécie é subdividida em dois grupos ou *pools* gênicos distintos: *P. griseola* formae *griseola*, que co-evoluiu com genótipos de feijoeiro de origem Andina, sendo capaz de causar doença apenas em feijões Andinos e *P. griseola* formae *mesoamericana*, que co-evoluiu com genótipos de feijoeiro de origem Mesoamericana, mas que é capaz de causar doença em feijões Mesoamericanos e Andinos. Esses dois grupos e a nova denominação foram definidos com base na gama de hospedeiros, morfologia, características culturais e nas análises das sequências da região ITS dos genes de rRNA e dos genes que codificam para calmodulina e actina (CROUS *et al.*, 2006).

A mancha angular é uma das doenças mais importantes que acometem a parte aérea do feijoeiro, nas regiões tropical e subtropical, sendo responsável por grandes perdas na produtividade e acomete a cultura, em especial, na safra da "seca", quando são observadas temperaturas amenas e ocorrência de orvalho favorecendo o seu desenvolvimento. Até o final da década de 1980, a mancha angular era considerada uma doença de pouca gravidade para a cultura do feijoeiro (OLIVEIRA *et al.*, 1980; GOULART, 1988). Segundo VIEIRA (1994), a doença não causava danos apreciáveis, porque só era expressiva no final do ciclo da cultura, quando a produção já estava praticamente garantida. No entanto, nos últimos anos, a mancha angular vem ocasionando grandes perdas, com desfolhamento severo em determinados cultivares, sendo particularmente importante em regiões onde temperaturas moderadas são acompanhadas por períodos de alta umidade e presença de inóculo durante o ciclo da cultura (ITO, *et al.*, 2004; HEMP & MASSIGNA, 2004).

Atualmente, a mancha angular é a principal doença da cultura do feijoeiro no Brasil, sendo encontrada em todas as regiões em que esta leguminosa é cultivada (RAVA, 2002). A doença apresenta maior severidade

em locais onde não é feita a rotação de culturas, ou seja, onde ocorre semeadura sequencial do feijoeiro na mesma área, principalmente no sistema de plantio direto (SARTORATO *et al.*, 1996). Apesar de se observar maior severidade da doença na safra da "seca", em algumas regiões ela ocorre em todas as safras, devido às condições climáticas favoráveis (ITO, *et al.*, 2004).

Devido aos surtos cada vez mais precoces e intensos da doença, nos últimos anos, já foram observadas perdas de até 80% na produtividade (JESUS JR. *et al.*, 2001; MAHUKU *et al.*, 2002), em razão da desfolha precoce, ataque inicial às vagens e redução do tamanho do grão (CORREA-VICTORIA *et al.*, 1994). As perdas variam dependendo da suscetibilidade dos cultivares, da época do aparecimento dos sintomas da doença (quanto mais precoce, maiores são as perdas), das condições ambientais e da agressividade dos patótipos predominantes do fungo (SARTORATO & RAVA, 1994; RAVA, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004), além da utilização de sementes infectadas e de mutações do patógeno ao longo dos anos (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 1998).

3.2.2. Aspectos etiológicos e fisiológicos

O fungo *P. griseola* produz sinêmios na face abaxial das folhas, com 250 µm de comprimento e 20 µm a 40 µm de largura, compostos por conidióforos (de 8 a 40) paralelos e escuros formando tufo visíveis ao olho nu. Na parte superior dos conidióforos, formam-se os conídios. Os conídios são de cor cinza, cilíndricos a fusiformes, às vezes curvos, com 0 a 3 septos, medem de 50 µm a 60 µm de comprimento e 7 µm a 8 µm de largura (ZAUMEYER & THOMAS, 1957). Os conídios podem germinar sob condições de umidade elevada. A germinação bipolar é mais comum, embora a germinação lateral, com três a quatro tubos germinativos possa ocorrer. Os conídios infectam os tecidos foliares ao penetrar pelos estômatos através do desenvolvimento de uma estrutura semelhante a um apressório. A penetração se completa em dois dias, sob condições ótimas. O micélio se desenvolve na cavidade subestomatal, havendo a liberação de toxinas e, depois de quatro dias, ocorre a colonização do espaço entre as células do parênquima paliádico. Os

cloroplastos apresentam sinais de degradação três dias após a infecção, seguidos por necrose das células-guarda e das células do mesófilo adjacente, desintegração do parênquima paliádico e, por fim, a epiderme é destruída (LIEBENBERG & PRETORIUS, 1997; MONDA *et al.*, 2001).

A esporulação é favorecida por temperaturas entre 16 e 28°C e períodos de alta umidade relativa, sendo a temperatura de 24 °C ótima para o desenvolvimento da doença (SINDHAN & BOSE, 1980). Os conídios germinam em temperaturas entre 8° C a 32° C penetrando pelos estômatos, podendo colonizar o hospedeiro (CAMPOS & FUCIKOVSKY, 1980).

Plantas inoculadas mantidas em câmara-úmida, por no mínimo três horas, tornam-se infectadas. No entanto, um aumento na duração do período de acondicionamento em câmara-úmida para 24 horas proporciona um aumento considerável no número de lesões por planta (KULIK, 1984). Na Figura 1, são mostrados sintomas de mancha angular, com necroses do tecido foliar delimitado pelas nervuras, em uma planta do cultivar suscetível Pérola.



Figura 1. Sintoma foliar de mancha angular do feijoeiro, incitada por *Pseudocercospora griseola*, no cultivar suscetível Pérola.

A produção dos conídios se intensifica sob alta umidade, mas também ocorre em períodos de seca. Estes podem ser disseminados a longas

distâncias pelo vento e pela chuva. Sementes infectadas e partículas de solo também podem transmitir o patógeno, o qual pode sobreviver por longos períodos, como o de uma safra para a outra.

O patógeno produz lesões em folhas, caules, ramos, pecíolos e vagens (ZAUMEYER & THOMAS, 1957) afetando toda a parte aérea da planta. As lesões foliares são as mais características, sendo que nas folhas primárias são mais ou menos circulares, com halos concêntricos, de cor castanho-escuro e nas folhas trifoliadas, as lesões têm formato angular pelo desenvolvimento do patógeno pelas regiões foliares delimitadas pelas nervuras, característica que deu o nome à doença. Sob condições de infecção severa, as lesões coalescem, causando o amarelecimento e o desfolhamento prematuro. Nos caules e ramos, as lesões são alongadas, de coloração castanho-escuro. Nas vagens, as lesões são inicialmente superficiais, quase circulares, de coloração castanho-avermelhada e com bordos escuros (FERRAZ, 1980; ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; SARTORATO & RAVA, 1985). Estas lesões são de tamanho variável e, quando numerosas, cobrem toda a largura da vagem e contaminam os grãos.

A visualização das lesões pode ser realizada a partir de 8 a 12 dias após a infecção pelo patógeno. Cerca de nove dias após a infecção, tem início o processo de necrose e as lesões assumem formato angular (HALL, 1991). Dependendo do patótipo e do tipo de cultivar infectado, as lesões podem não se apresentar com o formato típico, ou seja, o formato angular (SARTORATO *et al.*, 1996).

Vale ressaltar que tanto as condições climáticas variáveis quanto a temperatura amena, a elevada umidade relativa do ar e a constante luminosidade, geralmente favorecem a doença em condições de campo (CORREA-VICTORIA *et al.*, 1989). Apesar de a mancha angular ocorrer nas folhas primárias do feijoeiro, de modo geral, ela tem se apresentado como uma doença de ocorrência no final do ciclo da cultura (HEMP & MASSIGNA, 2004). No entanto, a doença pode ocorrer desde a emergência da plântula, sendo que a cultura tem se mostrado mais vulnerável ao desenvolvimento da doença na fase reprodutiva. Dependendo da severidade da doença e da época de infecção, a mancha angular pode causar redução da área foliar sadia e

queda precoce das folhas, antes do desenvolvimento completo dos grãos, ocasionando menor peso e, conseqüentemente, queda na produtividade (KULIK, 1984).

3.2.3. Alterações na nomenclatura

O status taxonômico do agente etiológico da mancha angular do feijoeiro tem sido, há bastante tempo, fonte de controvérsia entre diferentes especialistas. Diversos nomes já foram dados por diversos autores para o referido agente etiológico.

No passado, foram utilizados a estrutura do conidioma e o tipo de cicatriz conidiogênica no *loci* conidiogênico e no hilo do conídio para separar *Phaeoisariopsis* dos demais gêneros anamórficos de *Mycosphaerella* (BRAUN 1992; 1995a; 1995b). VON ARX (1983) reconhecia o gênero *Phaeoisariopsis* como hifomicetos sinematosos similares a *Cercospora*. Já DEIGHTON (1990) limitou *Phaeoisariopsis* a poucas espécies similares a *Phaeoisariopsis griseola*, tendo células conidiogênicas não-geniculadas com cicatrizes conspícuas e achatadas e transferiu as espécies sinematosas com células conidiogênicas geniculadas e cicatrizes escuras e espessas para o gênero *Passalora* Fr. As espécies sinematosas com *loci* conidiogênico inconspícuos foram transferidas para *Pseudocercospora*. BRAUN (1992; 1995a; 1995b) manteve a estrutura sinematosa do conidioma como importante característica para *Phaeoisariopsis*, além do fato de possuir também *loci* conidiogênico conspícuos. Entretanto, estudos morfológicos e moleculares revelaram que a estrutura do conidioma não sustenta a separação de gêneros para os anamorfos de *Mycosphaerella* (CROUS *et al.*, 2001).

Recentemente, CROUS *et al.* (2006), analisando a sequência do DNA que codifica a subunidade menor do ribossomo, revelaram que não é possível distinguir *Phaeoisariopsis* de outros dois gêneros de hifomicetos anamórficos de *Mycosphaerella*: *Pseudocercospora* e *Stigmina*. Para reforçar os dados moleculares, os autores ainda reexaminaram a cicatriz conidiogênica e o hilo do conídio de *Phaeoisariopsis griseola*, baseados em ampla amostragem de

diferentes materiais, incluindo os tipos de *Isariopsis griseola*, *Cylindrosporium phaseoli*, *Cercospora columnaris* e *Cercospora solimanii*, e concluíram que a mesma é pouco inconspícua a subconspícua. Em algumas coleções, a cicatriz é completamente inconspícua, como nos tipos examinados de *I. griseola* e *C. solimanii*.

Já que os três gêneros são anamorfos de *Mycosphaerella* e formam um clado filogenético comum, havia a necessidade de se decidir qual nome escolher para os anamorfos dematiáceos de *Mycosphaerella* com cicatriz conidiogênica e hilo inconspícuo a subconspícuo. O gênero *Stigmina* foi proposto em 1808, com 161 espécies. Em 1909 foi proposto o gênero *Phaeoisariopsis*, com 65 espécies e, em 1910 foi proposto o gênero *Pseudocercospora*, com 1171 espécies. Considerando-se o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, o nome *Stigmina* seria utilizado por ser mais antigo. Entretanto, *Stigmina* é um gênero muito heterogêneo e taxonomicamente confuso, suportando a proposição de conservação de nome do gênero mais comumente utilizado e amplamente difundido, *Pseudocercospora* foi o adotado. Apesar de *Phaeoisariopsis* ser um nome que antecede *Pseudocercospora*, *Phaeoisariopsis* foi reduzido à espécie tipo, com a maioria das outras espécies de hifomicetos transferidas para *Passalora* ou *Pseudocercospora*, reforçando ainda mais a conservação do nome *Pseudocercospora* (BRAUN & CROUS, 2006).

3.2.4. Variabilidade patogênica

As primeiras evidências de variabilidade entre isolados de *P. griseola* foram reportadas no início dos anos 1950 (BROCK, 1951). Posteriormente, diversos estudos comprovaram que o fungo apresenta uma ampla variabilidade patogênica (SARTORATO & RAVA, 1984; RIBEIRO *et al.*, 1993; PASTOR-CORRALES & JARA, 1995; GUZMÁN *et al.*, 1995; PASTOR CORRALES *et al.*, 1998; SARTORATO, 2002; STENGLEIN *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2006; VITAL, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

Trabalhando com materiais que se apresentavam resistentes à mancha angular na Colômbia, SARTORATO & RAVA (1984) verificaram que os mesmos eram suscetíveis no Brasil. No intuito de determinar a especialização fisiológica de *P. griseola*, os autores selecionaram 14 cultivares, os quais foram inoculados com cinco isolados oriundos de diferentes estados brasileiros. Por fim, verificaram que os cinco isolados causaram reações diferentes nos cultivares selecionados e foram classificados como “raças fisiológicas” ou patótipos.

Em estudos de análise isoenzimática CORREA-VICTORIA (1987) avaliou 55 isolados de *P. griseola* provenientes dos Estados Unidos, da América Latina e da África, dividindo-os em dois grupos. Todos isolados africanos apresentaram padrão 1 para cada isoenzima, enquanto os isolados dos Estados Unidos e da América Latina exibiam padrão 1 ou 2. Os isolados de padrão 1 foram associados com cultivares de feijão de sementes grandes, originados da região dos Andes, enquanto os isolados de padrão 2 foram associados aos cultivares de sementes pequenas das Américas Central e do Norte.

SARTORATO *et al.* (1991) estudaram a variabilidade fisiológica de 24 isolados de *P. griseola* com o objetivo de identificar cultivares a serem usados como diferenciadores. Os isolados mostraram ampla diferença quanto à patogenicidade, sendo classificados em seis diferentes patótipos. Neste trabalho, Cornell 49-242, RG 1342 CH 60, México 279 e México 54 foram considerados como diferenciadores. Utilizando a mesma série diferenciadora, LACERDA *et al.* (1994) estudaram a variabilidade fisiológica de 14 isolados de *P. griseola* do Estado de Pernambuco, encontrando cinco diferentes patótipos.

PASTOR-CORRALES & JARA (1995) realizaram experimentos acerca da diversidade genética de *P. griseola* e de sua co-evolução com o feijoeiro na América Latina. Os resultados confirmaram a separação dos fenótipos de virulência em dois *pools* gênicos: o primeiro, denominado Andino, que apresenta reação de compatibilidade unicamente com cultivares de feijoeiro de origem Andina e, o segundo, denominado Mesoamericano, que apresenta reação de compatibilidade principalmente com cultivares de origem Mesoamericana, apesar de serem virulentos para algumas variedades Andinas.

Os resultados indicaram ainda, que os isolados Andinos de *P. griseola*, denominados *P. griseola* formae *griseola* (CROUS *et al.*, 2006), tiveram evolução paralela com variedades de feijão de origem Andina; enquanto os isolados Mesoamericanos, denominados *P. griseola* formae *mesoamericana* (CROUS *et al.*, 2006), tiveram evolução com variedades de origem Mesoamericana.

Diante destes fatos, no *International Workshop on the Angular Leaf Spot of Common Beans*, realizado no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em 1995, decidiu-se pela padronização de um conjunto de variedades diferenciadoras e uma nova nomenclatura para os patótipos do patógeno (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995). Até então, não existia um grupo padrão de variedades diferenciadoras, definido e adotado internacionalmente, o que dificultava a comparação entre os patótipos que eram encontrados.

A nomenclatura preconizada é baseada em um sistema binário proposto por HABGOOD (1970). São utilizados 12 variedades diferenciadoras de feijão, sendo seis de origem Andina (d_i) e seis de origem Mesoamericana (d_j) (Figura 2), devido à existência dos dois *pools* gênicos do fungo e da co-evolução com o feijoeiro. As seis variedades de cada grupo são identificadas ordenadamente pelos números de 1 a 6. A designação de um determinado patótipo é feita empregando-se dois números separados por um traço. O primeiro número corresponde à soma dos valores binários para as variedades Andinas (2^{d_i-1}) e o segundo relaciona-se às variedades Mesoamericanas (2^{d_j-1}) e são obtidos pela soma dos valores numéricos de cada variedade diferenciadora que é suscetível a esse isolado (Tabela 1). Por exemplo, se um isolado ataca as variedades diferenciadoras A (grupo Andino, valor binário 1), B (grupo Andino, valor binário 2), C (grupo Andino, valor binário 4), D (grupo Andino, valor binário 8), E (grupo Andino, valor binário 16), F (grupo Andino, valor binário 32), G (grupo Mesoamericano, valor binário 1), H (grupo Mesoamericano, valor binário 2), I (grupo Mesoamericano, valor binário 4) e K (grupo Mesoamericano, valor binário 16), o patótipo denomina-se 63-23. Obtém-se a designação do patótipo, somando-se seus valores binários para cada diferenciadora, no caso de reação de compatibilidade entre o patógeno e as variedades suscetíveis. Este sistema, combinado com as duas classes de resposta à infecção pelo patógeno

(resistência ou suscetibilidade), permite classificar um total de $2^d = 2^{12} = 4096$ patótipos, em que “d” é o número de variedades diferenciadoras.

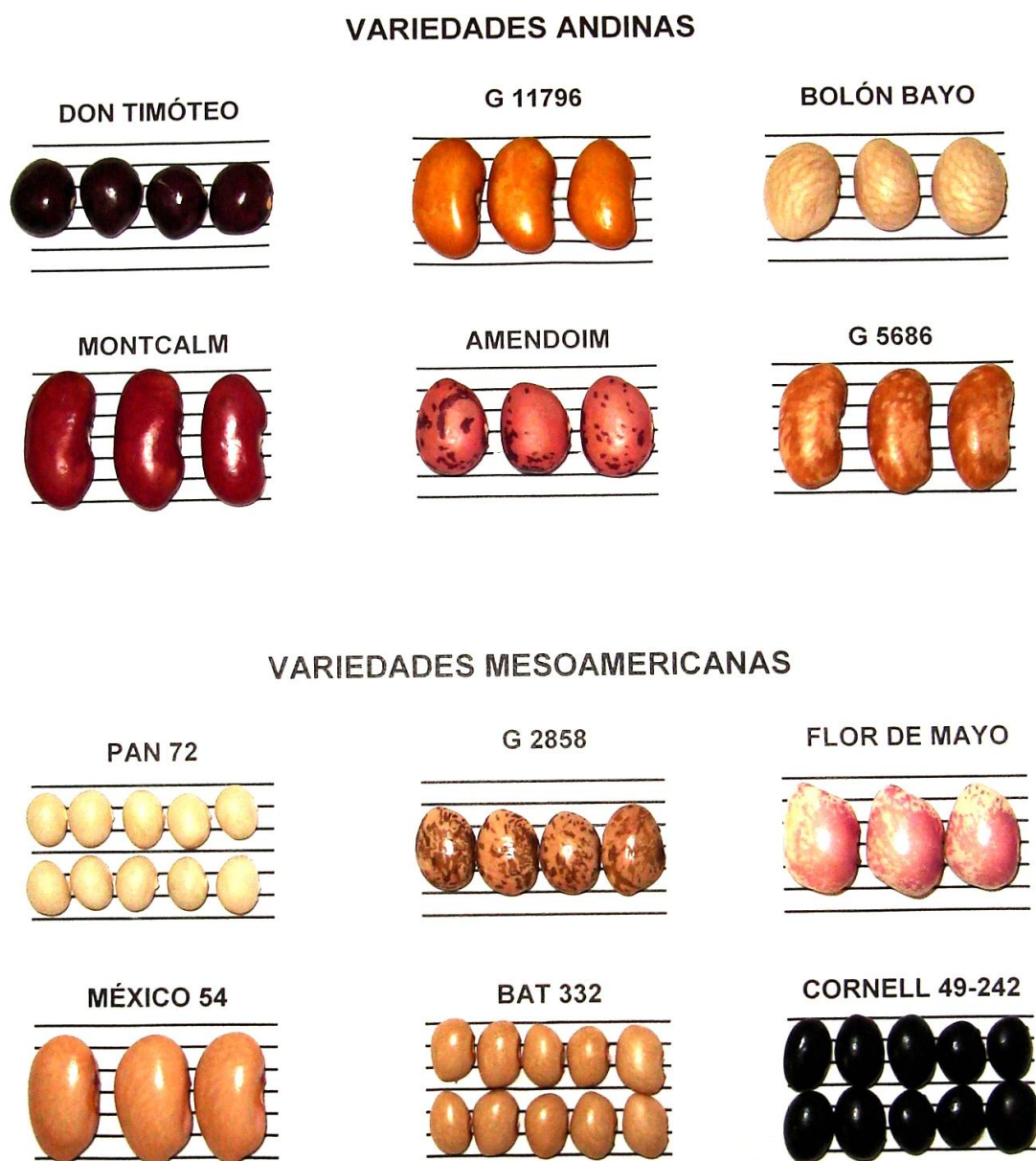


Figura 2. Série diferenciadora utilizada para a caracterização de patótipos de *Pseudocercospora griseola*, constituída de 12 variedades de feijão: seis Andinas e seis Mesoamericanas.

O uso desta metodologia, internacionalmente reconhecida, tem contribuído consideravelmente para a eficácia dos programas de melhoramento visando resistência à mancha angular. Entre os benefícios, destacam-se o intercâmbio de germoplasma e de informações entre pesquisadores de diversas partes do mundo.

Tabela 1. Variedades de feijão utilizadas como diferenciadoras para caracterização de isolados de *Pseudocercospora griseola*

Variedades diferenciadoras	Acervo genético	Valor binário¹ quando suscetível
Don Timóteo	Andino	1
G 11796	Andino	2
Bolón Bayo	Andino	4
Montcalm	Andino	8
Amendoim	Andino	16
G 5686	Andino	32
PAN 72	Mesoamericano	1
G 2858	Mesoamericano	2
Flor de Mayo	Mesoamericano	4
México 54	Mesoamericano	8
BAT 332	Mesoamericano	16
Cornell 49-242	Mesoamericano	32

¹/ Valor binário para nomear em patótipos os isolados de *P. griseola*.

PASTOR-CORRALES & PAULA JR. (1996) avaliaram 27 isolados monospóricos provenientes de quatro estados brasileiros, detectando 21 diferentes patótipos. Os principais patótipos encontrados foram 7-39, 15-23, 15-39, 31-49 e 63-31 o que indicou uma ampla diversidade genética. Eles sugeriram ainda que, embora haja extensa diversidade genética de *P. griseola* no Brasil, todos os isolados caracterizados pertencem ao acervo genético Mesoamericano, como os isolados da América Central, devido ao cultivo preferencial de cultivares de feijão de origem Mesoamericana no Brasil.

Diversos outros trabalhos de caracterização de isolados de *P. griseola* foram realizados, apresentando evidências mais conclusivas acerca da

variabilidade relacionada à patogenicidade. No trabalho realizado por NIETSCHE (1997), a autora demonstrou a existência da elevada variabilidade de *P. griseola* no Estado brasileiro de Minas Gerais e que um dos patótipos mais frequentes foi o 63-23, dentre os 13 encontrados. A variedade México 54 foi identificada como uma possível fonte de resistência para o Estado de Minas Gerais. APARÍCIO *et al.* (1998), avaliando 66 isolados monospóricos de diferentes regiões do Brasil concluíram sobre a ocorrência de 30 diferentes patótipos, sendo que os mais freqüentes foram 15-39, 31-23, 63-31, 63-23 e 31-39.

SARTORATO (2002) estudou a variabilidade fisiológica de *P. griseola* nos Estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná e Santa Catarina. Foram feitas análises de 51 isolados do patógeno, encontrando-se sete patótipos (31-23, 55-31, 63-15, 63-23, 63-31, 63-39 e 63-63) e os mais frequentes foram 63-31 e 63-63. NIETSCHE *et al.* (2002), identificaram 26 patótipos de *P. griseola* em 71 isolados coletados nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Santa Catarina, além de um isolado colombiano. Os patótipos mais frequentes foram: 63-31, 63-23, 63-55, 63-39 e 63-47.

Ao analisar a variabilidade patogênica de isolados de *P. griseola*, nos municípios de Inhumas e Damolândia (Goiás), SARTORATO (2004) verificou a ocorrência de 13 patótipos diferentes, entre os 96 isolados estudados. O patótipo mais frequente foi o 63-31, seguido por 63-63, 63-15 e 63-23. Verificou-se também que as variedades Cornell 49-242 (Mesoamericana) e AND 277 (Andina) foram as mais resistentes e podem ser de grande importância para o desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha angular.

SARTORATO & ALZATE-MARIN (2004) mostraram, através de um levantamento feito na literatura sobre a variabilidade patogênica do fungo *P. griseola*, que no período de 1996 a 2002 foram identificados 51 patótipos no Brasil. Ainda segundo este levantamento, os patótipos mais frequentes e amplamente distribuídos no território nacional, neste período, foram: 31-39, 63-23, 63-31, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63.

Em trabalhos mais recentes, GARCIA *et al.* (2006) estudaram 96 isolados de *P. griseola* obtidos no Estado de Goiás e verificaram a ocorrência de sete patótipos diferentes (31-55, 63-23, 63-31, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63); os mais frequentes foram o 63-55 e o 63-63, ocorrendo 25 e 39 vezes, respectivamente. Além disso, foi verificada a ocorrência de mais de um patótipo em uma mesma lesão, processo denominado infecção múltipla.

No mesmo ano, VITAL (2006) identificou seis patótipos de *P. griseola* a partir de sete isolados obtidos do Estado de São Paulo e testados nas variedades diferenciadoras da mancha angular. Os patótipos encontrados foram 16-4, 31-15, 31-47, 39-63, 63-15 e 63-47. Em Minas Gerais, SILVA *et al.* (2008) verificaram a ocorrência de dez patótipos distintos (55-15, 63-7, 63-15, 63-23, 63-25, 63-27, 63-31, 63-47, 63-55 e 63-63) em um total de 48 isolados analisados. Os patótipos identificados em maior frequência foram o 63-31 e o 63-63, ocorrendo 12 e 23 vezes, respectivamente. Com isso, outros nove patótipos foram identificados e somados àqueles constatados no levantamento realizado por SARTORATO & ALZATE-MARIN (2004), e assim, verifica-se que foram identificados, pelo menos, 60 patótipos distintos no Brasil, entre os anos de 1996 e 2004.

OROZCO e ARAYA (2005) demonstraram que em locais onde são cultivados exclusivamente feijões do tipo mesoamericano, ocorre uma pressão de seleção sobre as populações de *P. griseola* prevalecentes, que conduz ao incremento de patótipos correspondentes ao acervo genético do hospedeiro, como ocorre no Brasil.

Pelo exposto, um dos principais problemas enfrentados na cultura do feijoeiro está diretamente relacionado à variabilidade que o fungo *P. griseola* apresenta. O monitoramento da variabilidade do patógeno fornece informações úteis aos programas de melhoramento contribuindo na identificação de potenciais doadores de genes.

3.2.5. Formas de controle da mancha angular

Duas alternativas para o controle da mancha angular é a integração de práticas culturais e o emprego de fungicidas no tratamento da semente e da parte aérea. Entre as práticas culturais, recomenda-se a utilização de sementes de boa qualidade, tratadas, livres do patógeno (visando conter a introdução de novos patótipos) e produzidas em regiões onde se pratica a rotação de culturas com gramíneas e preparo do solo com a incorporação profunda de restos de cultura. O tratamento químico pode ser realizado tanto nas sementes como em pulverizações foliares, de forma preventiva e com os fungicidas recomendados (DHINGRA & KUSHALAPPA, 1980; SARTORATO & THUNG, 2004).

No Brasil, o controle químico da mancha angular tem sido realizado, principalmente, por grandes produtores, devido aos altos custos despendidos por esta prática. Todavia, a maior parte da produção de feijão vem de pequenos e médios produtores que não fazem o uso deste tipo de controle.

Contudo, a maneira mais eficiente de controle da mancha angular, de menor custo e de menores riscos ambientais é a utilização de cultivares resistentes ao patógeno, associada às boas práticas de manejo, especialmente no contexto da agricultura familiar, a qual não possui condições econômicas de sustentar um programa de controle químico.

Porém, o desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido dificultado devida à grande variabilidade de *P. griseola*, havendo, portanto, a necessidade de identificação e de monitoramento dos diferentes patótipos, principalmente, nos maiores centros de produção e seus arredores. Com esse propósito, desde a metade da década de 90, foi intensificada a avaliação de diferentes fontes de resistência e a identificação de potenciais doadores de genes de resistência (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1998; ARAYA & ARAYA, 2000). Assim, dado que as populações de *P. griseola* são mitóticas (reprodução assexuada), a piramidação ou a associação de genes de resistência em variedades comerciais bem adaptadas pode ser uma estratégia para o uso de genes específicos, com o propósito de alcançar uma resistência durável e de amplo espectro (OROZCO & ARAYA, 2005; SANGULARD *et al.*, 2006). Contudo, para

a utilização dessa estratégia é necessária a identificação de possíveis fontes de resistência, bem como o conhecimento do seu controle genético.

3.2.6. Fontes de resistência utilizadas no Brasil

Em relação à mancha angular, as fontes de resistência conhecidas não conferem resistência a todos os patótipos identificados. Entretanto, a combinação de genes de resistência presentes em diferentes fontes pode vir a ser efetiva no controle parcial ou total dos patótipos identificados.

De acordo com os estudos da variabilidade patogênica de isolados de *P. griseola* coletados em diversas regiões do Brasil, as variedades diferenciadoras Mesoamericanas: México 54, Cornell 49-242 e BAT 332, com reação de incompatibilidade (resistência) a 40, 31 e 31 patótipos, respectivamente; e a fonte Andina: G 5686, com resistência a 34 patótipos, de um total de 60, são as principais fontes de resistência usadas no Brasil (SARTORATO & ALZATE-MARIN, 2004; GARCIA *et al.*, 2006; VITAL, 2006; SILVA *et al.*, 2008). Considerando estes estudos, a associação dos genes de resistência presentes nas variedades México 54, Cornell 49-242 e BAT 332 (Figura 3) pode conferir resistência a todos os patótipos identificados, exceto ao patótipo 63-63. Isso demonstra a necessidade de identificação e caracterização de novas fontes de resistência à mancha angular, haja vista que o patótipo 63-63 é um dos mais frequentes e amplamente distribuídos no território brasileiro. Além das citadas anteriormente, as variedades AND 277, MAR-2 (Figura 3) e também Ouro Negro têm se mostrado como importantes fontes de resistência à mancha angular considerando os patótipos caracterizados no Brasil.

Heranças dos tipos dominantes e monogênicas foram inicialmente observadas em trabalhos de identificação de marcadores moleculares, em que se utilizou o cultivar suscetível Rudá cruzado com as fontes de resistência citadas. CARVALHO *et al.* (1998), trabalhando com o cultivar AND 277, relataram que o marcador OPH13₄₉₀ está ligado em fase de acoplamento ao gene de resistência ao patótipo 63-23 de *P. griseola*, a uma distância de 5,5 cM. Os marcadores RAPD OPN02₈₉₀, OPAC14₂₄₀₀, e OPE04₆₅₀ estão ligados

em acoplamento, respectivamente, a 5,9; 6,6 e 11,8 cM de distância do gene de resistência ao patótipo 63-19 de *P. griseola* presente em México 54 (SARTORATO *et al.*, 1999). Os marcadores SCAR N02₈₉₀ e OPE04₆₅₀, também estão ligados ao gene de resistência presente em Cornell 49-242 a uma distância de 3,2 e 12,5 cM, respectivamente (NIETSCHE *et al.*, 2000b). O marcador OPE04₅₀₀, também em fase de acoplamento, está ligado ao gene de resistência ao patótipo 63-39 de *P. griseola*, presente em MAR-2, a uma distância de 5,8 cM (FERREIRA *et al.*, 2000). CAIXETA *et al.* (2003) relataram que os marcadores OPA012₉₅₀ e OPAA07₉₅₀ estão ligados a 5,83 e 5,10 cM, respectivamente, do gene de resistência ao patótipo 61-41 de *P. griseola* do cultivar BAT 332. Também neste caso, a maioria dos marcadores RAPD foram convertidos em marcadores do tipo SCAR (CORREA *et al.*, 2000; NIETSCHE *et al.*, 2000b; QUEIROZ *et al.*, 2004a; QUEIROZ *et al.*, 2004b; SOUZA *et al.*, 2004) e várias isolinhas contendo genes separadamente foram intercruzadas, visando à piramidação.

NIETSCHE *et al.* (2000a), utilizando diversos patótipos de *P. griseola*, relataram diferentes espectros de resistência com relação a diversas fontes, indicando que esses genótipos deveriam possuir diferentes genes de resistência. Posteriormente, trabalhando com cinco fontes de resistência à mancha angular, AND 277, MAR-2, México 54, Cornell 49-242 e BAT 332, CAIXETA *et al.*, (2002; 2005) realizaram estudos de alelismo. O objetivo foi obter uma análise conjunta visando melhor entendimento da relação de independência desses genes. A utilização de diferentes cruzamentos e diferentes patótipos demonstrou uma maior complexidade que a relatada anteriormente na caracterização da herança da resistência desses genótipos.

Na Tabela 2 são apresentadas as fontes resistência à mancha angular utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV e seus respectivos genes (alelos) caracterizados.

FONTES DE RESISTÊNCIA

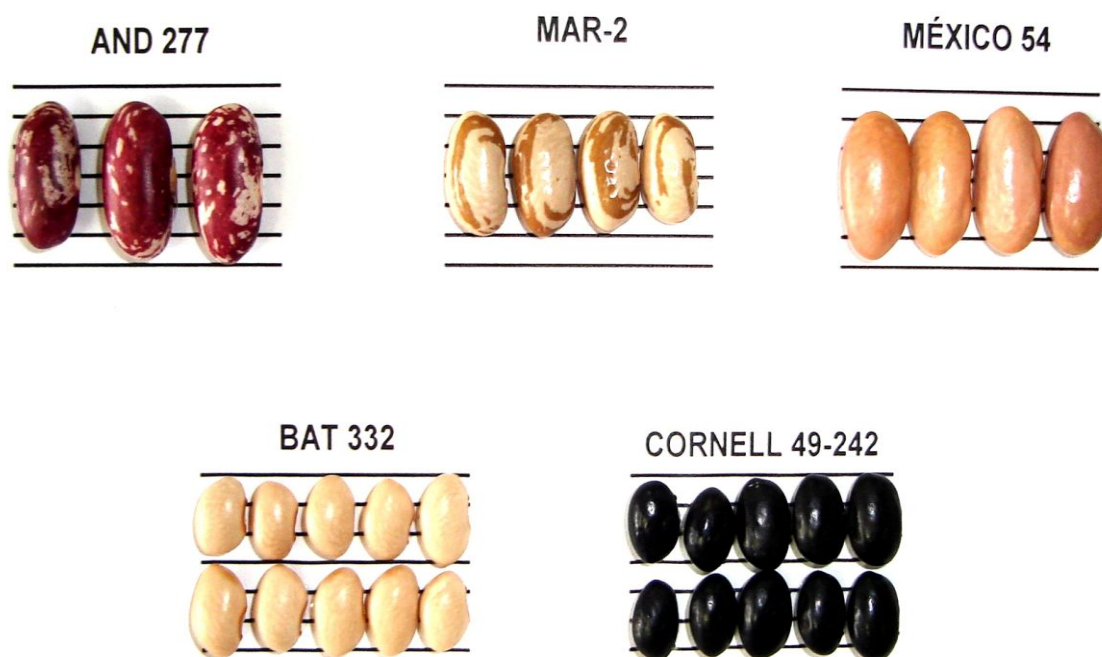


Figura 3. Fontes de resistência à mancha angular utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

Tabela 2. Fontes de resistência à mancha angular com seus respectivos genes determinados por testes de alelismo

Fonte de resistência	Genes (alelos)
AND 277	<i>Phg-1</i> ^a e/ou <i>Phg-2</i> ² , <i>Phg-3</i> ² , <i>Phg-4</i> ²
Cornell 49-242	<i>Phg-3</i>
México 54	<i>Phg-2</i> ^b , <i>Phg-5</i> , <i>Phg-6</i>
MAR-2	<i>Phg-4</i> , <i>Phg-5</i> ²
BAT 332	<i>Phg-6</i> ²

^aGene caracterizado por CARVALHO *et al.*, 1998; ^bGene caracterizado por SARTORATO *et al.*, 1999; os demais genes foram caracterizados por CAIXETA *et al.*, 2002; 2005.

Posteriormente, OLIVEIRA *et al.* (2005) selecionaram isolinhas com grãos tipo carioca que possuíam genes de resistência à mancha angular, derivados dos cultivares México 54, MAR-2 e BAT 332 em cruzamentos

utilizando *background* genético Rudá. Em seguida, de acordo com os estudos de alelismo realizados e as isolinhas disponíveis, foram estabelecidas as possíveis e melhores combinações visando à piramidação de genes de resistência à mancha angular (SANGLARD *et al.*, 2007).

Os materiais a serem obtidos ao final do processo de melhoramento iniciado nos trabalhos reportados, após serem testados quanto à resistência e ao desempenho agrônômico, poderão gerar novos cultivares e servir como coleção de trabalho visando à resistência à mancha angular.

Após estudos mais aprofundados, verificou-se que a resistência à *P. griseola* pode ser monogênica ou oligogênica. AMARO *et al.* (2007) sugerem que vários genes podem estar envolvidos no controle da resistência à mancha angular e ao avaliarem a variabilidade entre linhagens de feijão para resistência à mancha angular observaram graduação nos sintomas observados entre as linhagens consideradas resistentes e atribuíram este fato ao efeito ambiental, enfatizando a possível ocorrência de controle poligênico para o caráter.

3.3. Co-evolução planta-patógeno

A relação entre fungos e plantas desenvolveu-se em um primeiro estágio da evolução, dirigindo-se para o que se conhece hoje. Os fungos surgiram na Terra, possivelmente, há cerca de um bilhão de anos e as plantas, provavelmente, por volta de 700 milhões de anos atrás. E desde os primeiros momentos de coexistência, interações diversas entre estes dois reinos têm ocorrido (HECKMAN *et al.*, 2001). As interações entre as plantas e os fungos patogênicos são de extremo interesse para a humanidade, uma vez que grande parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais, as quais podem sofrer sérios danos em virtude do ataque de patógenos (BARBIERI & CARVALHO, 2001). Estas interações são controladas por genes de ambos os organismos. Se a interação existente entre hospedeiros e patógenos é compatível ou não, isso poderá afetar a probabilidade de sobrevivência de cada um deles e, então, levará à alteração da frequência de genes, particularmente, aqueles envolvidos na interação, de

modo que, torna-se possível, que interações incompatíveis planta-patógeno, onde a planta não desenvolve a doença, em um primeiro instante, evoluam para interações compatíveis, onde a planta passa a manifestar a doença (CHASAN, 1994).

No clássico trabalho desenvolvido por EHRLICH & RAVEN (1964) o conceito de co-evolução foi abordado pela primeira vez para designar adaptações recíprocas entre plantas e borboletas, no que se refere ao processo de polinização, levando a sua interdependência. Posteriormente, JANZEN (1980) definiu e propôs a padronização do termo co-evolução como sendo uma consequência da interação entre dois ou mais organismos, produzindo uma resposta evolutiva em cada um deles, através da alteração correlacionada em suas frequências gênicas.

Os fungos co-evoluem com representantes de todas as formas de vida com as quais interagem como as bactérias, outros fungos, plantas e animais. Neste processo de interação ocorrem invasões de células e tecidos em busca de nutrientes, de abrigo ou de transporte, estabelecendo uma relação de parasitismo ou de patogenicidade. Entretanto, eles também podem mediar a interface entre o hospedeiro e seu ambiente físico e biológico, em troca de mecanismos que lhes garantam a sobrevivência, deste modo, caracterizando uma relação mutualista ou simbiote (PIROZYNSKI & HAWKSWORTH, 1988). Porém, em sistemas patogênicos, denominados patossistemas, o benefício é unidirecional, onde o patógeno explora e se beneficia do hospedeiro. Não existe benefício mútuo, então a definição mutualística de co-evolução não se aplica a estes casos (BARBIERI & CARVALHO, 2001).

As populações naturais de plantas geralmente são polimórficas para a resistência à diversos fungos patogênicos. Como os patógenos também são polimórficos para a virulência, podendo vencer a resistência da planta, a efetividade desta resistência se torna limitada. Estes polimorfismos são mantidos por contínuos ciclos de co-evolução patógeno-hospedeiro nas populações, somado ao efeito de fluxo ocasional de novos genes de resistência e de virulência vindos de populações distantes (FRANK, 1992; ARAYA, 2003).

Com o desenvolvimento da agricultura e constante busca de genótipos com alto potencial de rendimento, houve uma tendência de uniformização das

culturas e este fator contribuiu para o aumento da pressão de seleção sobre as populações de patógenos, acelerando seu processo evolutivo, já que os patógenos deverão desenvolver especializações que os capacitem a parasitar um determinado tipo de cultura (MATIELLO *et al.*, 1997).

As forças evolutivas possibilitam o desenvolvimento de variabilidade tanto nas populações de fungos como nas populações de plantas, através do surgimento de novos alelos, por mutação, os quais sofrem seleção e aqueles mantidos são rearranjados graças à recombinação genética, havendo dispersão dos alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local a outro (ARAYA, 2003). A combinação de seleção, de deriva genética, de migração e de mutação define a estrutura genética e a diversidade de todas as populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores pode variar intensamente entre diferentes associações planta-patógeno, entre os estádios do ciclo epidemiológico e entre associações em ecossistemas naturais ou agrícolas (BURDON & SILK, 1997).

Para que a co-evolução possa acontecer deve haver ausência de isolamento geográfico entre as populações dos diferentes táxons envolvidos. Este processo de evolução mútua pode envolver mais do que dois táxons, desde que exista um determinado grau de similaridades físicas ou químicas entre eles, para possibilitar uma associação entre populações previamente separadas. A essência da co-evolução é uma mudança adaptativa em uma relação balanceada que provoca mudanças nas duas direções ou mais, dependendo do número de táxons envolvidos. Há uma maior probabilidade que ela ocorra dentro de comunidades de um ecossistema e entre hospedeiros relacionados bioquimicamente, devido ao maior grau de interação inerente desta relação (DICK, 1988).

Determinadas mudanças co-evolutivas podem ocorrer nos *pools* gênicos do hospedeiro e do patógeno quando cada uma das espécies envolvidas causa um grande impacto no valor adaptativo (a contribuição média de um genótipo para a próxima geração, comparada com aquela de outros genótipos) da outra, como no caso da interação entre *Pseudocercospora griseola* e *Phaseolus vulgaris*. As implicações genéticas da co-evolução em cada ambiente são que as populações do patógeno nativas ou emergentes possuem diferentes

mecanismos de patogenicidade (genes), enquanto que seus respectivos hospedeiros oferecem uma diversidade similar quanto a genes de resistência (ARAYA, 2003) e aqueles genótipos hospedeiros considerados raros serão mais resistentes aos patógenos quando comparados aos genótipos comuns.

3.4. Região ITS (espaçadores internos transcritos)

A utilização de sequências de nucleotídeos de DNA como fonte básica de variação é uma importante ferramenta para a resolução de diversas questões taxonômicas e filogenéticas. Conforme o nível taxonômico em estudo, várias sequências de genes específicos têm sido comumente utilizadas de acordo com o grau de conservação. Estudos comparativos de sequências do gene do DNA ribossomal (rDNA), gene que codifica o RNA ribossômico, e das regiões espaçadoras, permitem descrever a estrutura genética de populações e as relações filogenéticas entre e dentro de espécies (KING & SCHALL, 1989).

Os genes que codificam RNAs ribossômicos estão organizados em unidades repetidas em *tandem* e estão presentes em um número de cópias que varia de 100 a 200, em genomas eucariotos inferiores, até várias centenas ou milhares, em genomas eucariotos superiores. Estes arranjos se localizam principalmente em regiões especializadas dos cromossomos, associadas aos nucléolos, constituindo as chamadas regiões organizadoras nucleolares (FERREIRA, 2003).

Nos eucariotos, de um modo geral, cada unidade de rDNA é transcrita como um único precursor e é constituída por um espaçador externo transcrito ou ETS (*External Transcribed Spacer*), sequência que contém a extremidade 5' do pré-rRNA transcrito; uma região codificante responsável pela formação do rRNA 18S (a pequena subunidade gênica); a região do primeiro espaçador interno transcrito ou ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*); a região codificadora do gene do rRNA 5,8S; a região do segundo espaçador interno transcrito ou ITS2; a região responsável pela formação do rRNA 28S (a grande subunidade gênica); e a região do espaçador externo não-transcrito ou NTS (*Non Transcribed Spacer*) (Figura 4) (JORGENSEN & CLUSTER, 1988; ELDER &

TURNER, 1995). Em fungos, a maioria dos estudos filogenéticos fundamentados em sequências de DNA, tanto entre espécies como dentro de uma mesma espécie, é baseada nos genes do RNA ribossômico ou nas regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS) (KAUSERUD *et al.*, 2004).



Figura 4. Representação esquemática da unidade de repetição do *cluster* gênico do rDNA. ETS: espaçador externo transcrito; 18S: região que codifica para RNA ribossômico 18S; ITS1: região do primeiro espaçador interno transcrito; 5,8S: região que codifica para RNA ribossômico 5,8S; ITS2: região do segundo espaçador interno transcrito; 28S: região que codifica para RNA ribossômico 28S; NTS: espaçador externo não-transcrito. As setas pretas indicam a localização aproximada dos *primers* utilizados neste trabalho. O esquema não está em escala.

Os componentes da unidade repetitiva dos genes de rDNA têm sido estudados com um enfoque evolutivo e o que se verifica é que as diferentes regiões apresentam taxas de evolução diferenciadas, possibilitando o surgimento de dados informativos para análises (ÁLVAREZ & WENDEL, 2003). As regiões que codificam os RNAs ribossômicos não são geralmente úteis na análise de polimorfismos dentro de uma mesma espécie, porque essas regiões evoluem muito lentamente, apresentando poucas alterações nas sequências de bases e em seu comprimento, sendo, portanto, particularmente úteis para análises em classes taxonômicas mais elevadas, como famílias ou ordens. A região dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) apresenta um nível intermediário de variação, o que torna essas sequências apropriadas para o estudo em nível de gênero, de espécies próximas ou dentro de uma mesma espécie (KO *et al.*, 1993).

ÁLVAREZ & WENDEL (2003) fizeram um levantamento e verificaram o grande número de estudos relacionados com análises genéticas que utilizam os elementos dos genes de rRNA, em especial a região ITS. Neste trabalho, os

autores citam e explicam algumas vantagens da utilização da região ITS para estudos filogenéticos, dentre as quais se destacam:

- Universalidade: WHITE *et al.* (1990) descreveram um conjunto de *primers* úteis para a amplificação da região ITS do genoma de diversas espécies de plantas e de fungos. Esses *primers* universais possibilitam que sequências de ITS sejam prontamente obtidas em relação à outra marca nuclear que não possui *primers* previamente definidos para sua amplificação;
- Simplicidade: como os genes de rRNA se apresentam no genoma de eucariotos em várias cópias arranjadas em *tandem*, esta região é mais facilmente isolada do que genes que se apresentam em baixo número de cópias no genoma de um organismo e exige pouca especialização nos experimentos para se obter sucesso nas amplificações;
- Uniformidade Intragenômica: é certo que famílias multigênicas, em particular, as sequências da região ITS, estão sujeitas a um fenômeno denominado “evolução em concerto”, que é um mecanismo que promove a homogeneização das inúmeras cópias, tornando-as idênticas em um dado organismo em pouco tempo evolutivo. Este processo elimina variações das sequências dentro do genoma, de modo que as mudanças somente ocorrem em estado de espécies ou de classes taxonômicas superiores, sendo de grande utilidade para análises intraespecíficas;
- Variabilidade Intergenômica: através de diversos tipos de análises, verificou-se que os níveis de variação da região ITS são adequados para inferências filogenéticas em nível de espécie, gênero ou família;
- Baixa Pressão de Seleção: durante o processamento do transcrito primário, a região ITS é removida por *splicing* para o estabelecimento do transcrito final. Como ocorre a remoção da região ITS, admite-se que ela está sujeita a baixa pressão de seleção, oferecendo preponderância de sítios de nucleotídeos que poderão evoluir essencialmente de forma neutra.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-GALLEGOS, J. A., KELLY, J. D. & GEPTS, P. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. **Crop Science**, v. 47, p. 44-59. 2007.
- ALVAREZ, I. & WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 417-434. 2003.
- AMARO, G. B., ABREU, A. DE F. B., RAMALHO, M. A. P., & SILVA, F. B. Phenotypic recurrent selection in the common bean with Carioca-type grains for resistance to *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 3-584. 2007.
- APARÍCIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia**. Cali, Colombia: Universidad del Valle. 120p. Trabajo (Grado) – Universidad del Valle, 1998.
- ARAYA, C. M. & ARAYA, R. Avances en la selección de fuentes de resistencia a las principales enfermedades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Costa Rica. **Agronomía Mesoamericana**, v. 11, p. 25-29. 2000.
- ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 221-228. 2003.
- BABIERI, R. L. & CARVALHO, F. I. F. Coevolução de Plantas e Fungos Patógenos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas-RS, v. 7, n. 2, p. 79-83. 2001.
- BECERRA-VELÁSQUEZ, V. L. & GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. **Genome**, v. 37, p.256-263. 1994.
- BORÉM, A. & CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C., PAULA JR., T. J. & BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**, Viçosa: UFV, p. 13-17. 1998.
- BORÉM, A. & CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J. & BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**, 2ª ed, Viçosa: UFV, 600 p. 2006.
- BRAUN, U. & CROUS, P. W. Proposal to conserve the name *Pseudocercospora* against *Stigmina* and *Phaeoisariopsis*. **Taxon**, v. 55, p. 803. 2006.
- BRAUN, U. **A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)**, vol. 1, IHW-Verlag, Eching. 1995a.

- BRAUN, U. Miscellaneous notes on phytopathogenic hyphomycetes (II). **Mycotaxon**, v. 55, p. 223-241. 1995b.
- BRAUN, U. Taxonomic notes on some species of the *Cercospora* complex. **Nova Hedwigia**, v. 55, p. 211-221. 1992.
- BROCK, R. D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. **Journal of the Australian Institute of Agriculture Science**, v. 17, n. 1, p. 25-30. 1951.
- BURDON, J. J. & SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 87, p. 664-669. 1997.
- CAIXETA, E. T. **Caracterização da resistência genética à mancha angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A., Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v. 134, n. 3, p. 297-303. 2003.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 145, n. 3, p. 237-245. 2005.
- CAMPOS, J. A. & FUCIKOVSKY, L. Z. Estudo de algumas características de *Isariopsis griseola* Sacc. agente causal de la mancha angular del frijol. **Agrociencia**, v. 39, p. 41- 48. 1980.
- CARVALHO, G. A., PAULA JR., T. J., ALZATE-MARIN, A. L. NIETSCHE, S., BARROS, E.G. & MOREIRA M.A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 482-485. 1998.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Primer Taller Inernacional sobre la Mancha angular del Frijol Comum, 1995, Calli**. Calli: Colômbia. 1995.
- CHASAN, R. Plant-pathogen encounters in Edinburgh - Meeting report. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1332-1341. 1994.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Décimo Primeiro Levantamento de Avaliação da Safra Agrícola 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em maio de 2009.
- CORRÊA, R. X., COSTA, M. R., GOOD GOD, P. I., RAGAGNIN, V. A., FALEIRO, F. G., MOREIRA, M. A. & BARROS, E. G. Sequence characterized amplified

- regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, v. 40, p. 804-807. 2000.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** East Lansing: Michigan State University. 154p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Michigan State University, 1987.
- CORREA-VICTORIA, F. J., PASTOR-CORRALES, M. A. & SAETTLER, A. W. Mancha angular de la hoja. *In*: Pastor-Corrales, M. A. & Schwartz, H. F. (Eds.) **Problemas de producción de frijol en los trópicos**. Cali. CIAT, p. 67-86. 1994.
- CORREA-VICTORIA, F. J., PASTOR-CORRALES, M. A. & SAETTLER, A. W. Angular Leaf Spot. *In*: SCHWARTZ, H. F. & PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean Production Problems in the Tropics**. Cali. CIAT, cap. 4. p. 59-75. 1989.
- CROUS P. W., LIEBENBERG M. M., BRAUN, U. & GROENEWALD J. Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 163-173. 2006.
- CROUS, P. W.; KANG, J. C. & BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**, v.93, p. 1081-1101. 2001.
- DEIGHTON, F. C. Observations on *Phaeoisariopsis*. **Mycological Research**, v. 94, p. 1096-1102. 1990.
- DHINGRA, O. D. & KUSHALAPPA, A. C. No correlation between angular leaf spot intensity and seed infection in bean by *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 5, p. 149-152. 1980.
- DICK, M. W. Coevolution in the heterokont fungi (with emphasis on the downy mildews and their angiosperm hosts). *In*: PIROZINSKY, K. A.; HAWKSWORTH, D.L. **Coevolution of fungi with plants and animals**. London: Academic Press, p. 31-62. 1988.
- EHRLICH, P. R. & RAVEN, P. H. Butterflies and plants: A study in coevolution. **Evolution**, v. 18, p. 586-608. 1964.
- ELDER JR., J.F. & TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **Quarterly Reviews of Biology**, v. 70(3), p. 297–320. 1995.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. História do Feijão. 2007. Disponível em: <http://www.cnfap.embrapa.br/>. Acesso em julho/2009.

- EMBRAPA. **Sistemas de Produção Nº 2**. Versão eletrônica disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em dezembro de 2008.
- FERRAZ, S. La mancha angular. *In*: SCHWARTZ, H. P.; GALVEZ, G. E. (Eds). **Problemas de produccion del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali. CIAT, p. 55-64. 1980.
- FERREIRA, C. F., BORÉM, A., CARVALHO, G. A. NIETSCHE, S., PAULA JR., T. J., A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. **Crop Science**, v. 40, p. 1130-1133. 2000.
- FERREIRA, C. M., DEL PELOSO, M. J. & FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e feijão, (documentos/EMBRAPA Arroz e feijão, 135), 47 p. 2002.
- FERREIRA, H.B. Organização Gênica de Eucariotos. *In*: **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, cap. 4, p. 92-126. 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. 2008. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em novembro de 2008.
- FRANK, S. A. Models of plant pathogen co-evolution. **Trends in Genetics**, v. 8, p. 213–219. 1992.
- GARCIA, R. A. V., CARNEIRO, M. S. & SARTORATO, A. *Phaeoisariopsis griseola* virulence pattern and RAPD diversity. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 49, p. 209-210. 2006.
- GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. **Hortscience**, v. 33, p. 1124-1130. 1998.
- GEPTS, P. & BLISS, F. A. F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. **Journal of Heredity**, v. 76, p. 447-450. 1985.
- GEPTS, P., OSBORN, T. C., RASHKA, K. & BLISS, F. A. Electrophoretic analysis of phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean, *Phaseolus vulgaris*: Evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v. 40, p. 451-468. 1986.
- GOULART, A. C. P. Doenças do feijoeiro na região Norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.13. p. 230-232. 1988.
- GUZMAN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W. C., TEMPLE, S. R., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A. B. C. & GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 600-607. 1995.

- HABGOOD, R. M. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, London, v. 227, n. 19, p. 1268-1269. 1970.
- HALL, R. Compendium of bean diseases. Ontário. **The American Phytopathological Society**, p. 1-17. 1991.
- HECKMAN, D. S., GEISER, D. M., EIDELL, B. R., STAUFFER, R. L., KARDOS N.L. & HEDGES, S.B. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, v. 293, p. 1129-1133. 2001.
- HEMP, S. & MASSIGNA, A. M. **Considerações sobre a cultura do feijoeiro comum e a ocorrência de mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* Sacc.) no Estado de Santa Catarina - Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/negocios/ser_doc/doc_132/132_3.html>. Acesso em maio de 2009.
- ITO, M. F., CARBONELL, S. A. M., CASTRO, J. L. & DUDIENAS, C. **A cultura do feijoeiro comum e a mancha angular no Estado de São Paulo**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/negocios/ser_doc/doc_132/132_1.html>. Acesso em abril de 2009.
- JANZEN, D. H. When is it coevolution? **Evolution**, v. 34, p. 611-612. 1980.
- JESUS JR., W. C., DO VALE, F. X. R., COELHO, R. R., HAU, B., ZAMBOLIM, L., COSTA, L. C. & BERGAMIN FILHO, A. Effects of angular leaf spot and rust on yield losses of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 91, p. 1045-1053. 2001.
- JORGENSEN, R. A. & CLUSTER, P. D. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1238-1247. 1988.
- KAUSERUD, H., HÖGBERG, N., KNUDSEN, H., ELBORNE, S. A. & SCHUMACHER, T. Molecular phylogenetics suggest a North American link between the anthropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3137-3146. 2004.
- KHAIRALLAH, M. M., ADAMS, M. W. & SEARS, B. B. Mitochondrial DNA polymorphisms of Malawian bean lines: further evidence for two major gene pools. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 753-761. 1990.
- KING, L. M. & SCHAAL, B. A. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. **Evolution**, v. 43, p. 1117-1119. 1989.
- KO, S. C., O'KANE, S. L. & SCHAAL, B. A. Intraspecific taxonomy and comparisons of nrDNA ITS-2 sequences of *Arisaema ringens* (Araceae). **Rhodora**, v. 95(883/884), p. 254-260. 1993.

- KOINANGE, E. M. K. & GEPTS, P. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Heredity**, v. 83, p. 135–139. 1992.
- KULIK, M. M. Symptomatology and epidemiology of several green bean diseases incited by seed-borne fungi. **Seed Science and Technology**, v. 12, p. 841-850. 1984.
- LACERDA, J. T., COELHO, R. S. B., MARIANO, R. L. R. & MENEZES, M. Variabilidade fisiológica de *Isariopsis griseola* em feijoeiro no estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 93-96. 1994.
- LIEBENBERG, M. M. & PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, v. 3, p. 81-106. 1997.
- MAHUKU, G. S., JARA, C., CUASQUER, J. B. & CASTELLANOS, G. Genetic Variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its Implications for Resistance Breeding of Common Bean. **Plant Pathology**, v. 51, p. 94-604. 2002.
- MATIELLO, R. R., BARBIERI, R. L. & CARVALHO, F. I. F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 161-168. 1997.
- MIKLAS, P. N., KELLY, J. D., BEEBE, S. E. & BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, p. 105–131. 2006.
- MONDA, E. O., SANDERS, F. E. & HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 103-110. 2001.
- MOURA, P. A. M., PAIVA, B. M., RESENDE, L. M. A. Aspectos econômicos da cultura do feijão. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 178, p. 67-72. 1994.
- NIESTCHE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., ALZATE-MARIN, A. L., COSTA, M., ROCHA, R. C. & CAIXETA, E. T. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 331-335. 2002.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G. A. PAULA-JR, T. J., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 45, p. 567-571. 2000a.
- NIETSCHE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G. A., ROCHA, R. C., PAULA JR., T. J., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene

- conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Phytopathology**, v.148, p.117–121. 2000b.
- OLIVEIRA, A. C. S, FELÍCIO FILHO, A. & MOURA, P. A. M. **Diagnóstico da cultura do feijão em Minas Gerais**. Belo Horizonte, EPAMIG, 19p. 1980.
- OLIVEIRA, E. J., ALZATE-MARIN, A. L., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Molecular marker-assisted selection for development bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding**, v. 124, p. 572-575. 2005.
- OLIVEIRA, E. J., ALZATE-MARIN, A. L., BORÉM, A., MELO, C. L. P., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, p. 220-223, 2004.
- OROZCO, S. C. & ARAYA, C. M. F. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 589-593. 2005.
- PAPA, R. & P. GEPTS. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 239–250. 2003.
- PAPA, R., ACOSTA, J., DELGADO-SALINAS, A. & GEPTS, P. A genome wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1147–1158. 2005.
- PASTOR-CORRALES, M. A. & JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, p. 15-22. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A. & PAULA Jr., T. J. **Estudo da diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil**. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO FEIJÃO, 5, Goiânia. Anais, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP-APA. v. 1, p. 239-41. (Documentos, 69). 1996.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. & SINGH, S. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 103, p.161-171. 1998.
- PAULA JR., T. J. & ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA-JR, T. J. & BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa. Editora UFV, p. 375-433. 1998.
- PAULA JR., T. J. & ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA JR., T. J. & BORÉM, A. (Eds.). **Feijão**. 2^a ed., Viçosa, Editora UFV. p. 359-414. 2006.

- PIROZYNSKI, K. A. & HAWKSWORTH, D. L. Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. *In*: PIROZYNSKI, K. A. & HAWKSWORTH, D. L. **Coevolution of fungi with plants and animals**, London, Academic Press, p. 1-29. 1988.
- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. P. O., RAGAGNIN, V. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 237-238. 2004a.
- QUEIROZ, V. T., SOUSA, C. S., COSTA, M. R., SANGLARD, D. A., ARRUDA, K. M. A., SOUZA, T. L. P. O., RAGAGNIN, V. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 249-250. 2004b.
- RAVA, C. A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v.28, n. 1, p. 65-69. 2002.
- RIBEIRO, M. J., COELHO, R. S. B. & MENEZES, M. A. Fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à mancha angular do feijoeiro (*Isariopsis griseola* Sacc). **Caderno Ômega – Série Agronomia**, v. 1, p. 243–246. 1993.
- SANGLARD, D. A., DAMASCENO, J. D., BALBI, B. P., BARROS E. G. & MOREIRA, M. A. Introgression of Angular Leaf Spot Resistance Genes in Common Bean Isolines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 50, p. 101-102. 2007.
- SANGLARD, D. A., DAMASCENO, J. D., SOUZA, T. L. P. O., BALBI, B. P., MENDONÇA, M. A. C., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Pyramiding Angular Leaf Spot Resistance Genes in “Carioca-Type” Common Bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 49, p. 84-85. 2006.
- SARTORATO, A. & ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 235-236. 2004.
- SARTORATO, A. & RAVA, C. A. Especialização fisiológica de *Isariopsis griseola* Sacc. em *Phaseolus vulgaris* L. **Summa Phytopathologica**, v. 10, n. 1/2, p. 58-59. 1984.
- SARTORATO, A. & RAVA, C. A. Mancha angular. *In*: SARTORATO, A. & RAVA, C. A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, EMBRAPA, p. 41-68. 1994.

- SARTORATO, A. & RAVA, C. A. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 28, p. 5-6. 1985.
- SARTORATO, A. & THUNG, M. **Determinação da variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* e avaliação da mancha angular**. 2004. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/negocios/ser_doc_132/132_2.html>. Acesso em novembro de 2008.
- SARTORATO, A. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five States in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 78-81. 2002.
- SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the state of Goiás, Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 152, n. 7, p. 385-390. 2004.
- SARTORATO, A., NIETSCH, S., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 21-22. 1999.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A. & RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F. & ZIMMERMANN, M.J.O. (eds). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**, Piracicaba, POTAFOS, p. 669-700. 1996.
- SARTORATO, A., RAVA, C. A., MENTEN, J. O. M. & BERGAMIN FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p. 43-46. 1991.
- SILVA, K. J. D., SOUZA, E. A. de, SARTORATO, A. & FREIRE, C. N. de S. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, v. 156, p. 602-606. 2008.
- SINDHAN, G. S. & BOSE, S. K. Epidemiology of angular leaf spot of French bean caused de *Phaeoisariopsis griseola*. **Indian Phytopathology**, v.33, n.1, p.64-68. 1980.
- SINGH, S. P., NODARI, R. & GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. **Crop Science**, v. 31, p. 19-23. 1991a.
- SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, v. 4, n. 6, p.1659-1675. 2001.
- SINGH, S. P., GEPTS, P. & DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, p. 379-396. 1991c.

- SINGH, S. P., GUTIÉRREZ, J. A., MOLINA, A., URREA, C. & GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, p. 23-29. 1991b.
- SOUSA, C. S., QUEIROZ, V. T., RAGAGNIN, V. A., SANGLARD, D. A., COSTA, M. R., SOUZA, T. L. P. O., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Development of SCAR markers linked to different disease resistant genes of common bean. *In*: **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, Caxambu, MG. Brazil. (Resumo). 2004.
- STENGLEIN, S. A., FERMOSELLE, G. E. & BALLATI, P. A. Pathogenic and molecular studies of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 48, p. 92-93. 2005.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária. 231 p. 1983.
- VIEIRA, C. Principais doenças do feijoeiro no inverno. **Informativo Agropecuário**, v. 17, p. 5-8. 1994.
- VIEIRA, C., BORÉM, A. & RAMALHO, M. A. P. **Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa, MG, Editora UFV, p. 273-349, 1999.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M. A. P., CARNEIRO, J. E. de S. Melhoramento do feijão. *In*: **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2ª Ed., UFV, Viçosa, p. 301-391. 2005.
- VIEIRA, C., PAULA Jr., T. J. & BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**, Viçosa, Editora UFV. 596 p. 1998.
- VITAL, W. M. ***Phaeoisariopsis griseola*: Physiological characterization, resistance sources and reaction of dry bean**. Campinas. 49f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Pós-Graduação - IAC. 2006.
- VON ARX, J. A. *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v. 86, p.15-54. 1983.
- WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J. & WITHE, T.J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, New York, Academic Press, p. 315-322. 1990.
- ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G. M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, v. 4, n. 46, p. 50-63. 1978.
- ZAUMEYER, W. J. & THOMAS, H. R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington, D.C.: U.S.D.A. 151p. (Technical Bulletin 868). 1957.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PATÓTIPOS DE *Pseudocercospora griseola* ORIUNDOS DE ALGUMAS LOCALIDADES DO ESTADO DE MINAS GÉRIAS E AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. O Brasil é o maior produtor mundial (FAO, 2008) e também o maior consumidor dessa leguminosa, o que demonstra a grande importância econômica e social deste produto agrícola no país. É reconhecidamente uma excelente fonte de proteínas e micronutrientes essenciais, sendo consumido em todo o país. Na maioria das vezes, o feijão é cultivado como cultura de subsistência por pequenos agricultores. Porém, quando o plantio se dá em escala empresarial, utiliza-se toda tecnologia disponível para otimizar a produção (BORÉM & CARNEIRO, 1998).

A cultura apresenta uma ampla adaptação edafoclimática, o que permite o seu cultivo durante todos os meses do ano, possibilitando a oferta constante do produto no mercado. Apesar da grande importância da cultura para o Brasil, a produtividade média estimada é baixa comparada com o potencial produtivo da cultura em condições favoráveis (VIEIRA *et al.*, 1999).

Independentemente do sistema de manejo adotado, estresses bióticos e abióticos representam as principais limitações para a produtividade da cultura. Dentre os diversos fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro, verifica-se o grande número de doenças fúngicas que acometem a parte aérea, com destaque para a antracnose, a ferrugem e a mancha angular.

Muitos patógenos do feijoeiro apresentam ampla variabilidade fisiológica, possuindo grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas” ou patótipos. *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, Sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, patógeno que incita a

mancha angular do feijoeiro, também apresenta alta variabilidade, o que dificulta o seu controle.

A mancha angular foi uma das primeiras doenças do feijoeiro a ser estudada. Ela ocorre praticamente em todas as regiões onde o feijão é plantado e como, no Brasil, a maior parte do feijoeiro é cultivada sob condições climáticas de ventos moderados, temperaturas amenas, intensa formação de orvalho e grande amplitude diária de temperatura, com a ocorrência de noites frias, ocorre que estas condições associadas à presença generalizada de *P. griseola* e ao plantio de cultivares suscetíveis, favorecem o desenvolvimento da mancha angular, o que tem atraído atenção de produtores e pesquisadores.

Esta doença era considerada de final de ciclo, causando pouca ou nenhuma redução na produtividade. Entretanto, nos últimos anos, devido aos surtos cada vez mais precoces e intensos, passou a ser considerada a principal doença da parte aérea do feijoeiro, sendo responsável por grandes prejuízos na produção, dependendo das condições ambientais, da suscetibilidade dos cultivares e do estágio de desenvolvimento da cultura. Adicionalmente, são registradas perdas de qualidade das sementes e redução do valor de mercado e na disponibilidade do produto no comércio (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1998).

A eficiência no uso de resistência à mancha angular depende do conhecimento sobre a variabilidade patogênica e a distribuição geográfica do patógeno. A diversidade genética de *P. griseola* tem sido determinada mediante a reação de um grupo padrão de variedades diferenciadoras, que contém genótipos dos dois acervos genéticos principais do feijão: Andino e Mesoamericano (SARTORATO, 2002). A determinação de um sistema de nomenclatura padrão permitiu uma comparação consistente dos dados obtidos por diversos pesquisadores. Diante desta padronização, ficou demonstrado que populações do patógeno apresentam uma ampla variabilidade de patótipos e alta associação entre sua origem e o acervo genético do hospedeiro: Andino ou Mesoamericano (PASTOR-CORRALES e JARA, 1995; ARAYA e OROZCO, 2001; SARTORATO, 2002). Com a associação dos patótipos com os *pools* gênicos do feijoeiro, a espécie pôde ser subdividida em dois grupos distintos: *P. griseola* *formae griseola*, que co-evoluiu com genótipos de feijoeiro de

origem Andina, sendo capaz de incitar doenças apenas em feijões Andinos e *P. griseola* formae *mesoamericana*, que co-evoluiu, com genótipos de feijoeiro de origem Mesoamericana, mas é capaz de incitar doença em feijões dos dois *pools* gênicos, apesar de ser mais patogênico para os genótipos Mesoamericanos (CROUS *et al.*, 2006).

Através dos anos, o controle químico da mancha angular com fungicidas tem sido recomendado, no entanto, essa medida resulta em aumento dos custos, além de promover danos ao ambiente. Por outro lado, o uso de cultivares resistentes ao patógeno, associado às boas práticas de manejo, destaca-se como a melhor opção de controle da enfermidade, devido à praticidade e à economia. Com esse propósito, desde a metade da década de 1990, foi intensificada a avaliação de diferentes fontes de resistência e a identificação de potenciais doadores de genes (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1998; MAHUKU *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SARTORATO, 2006).

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, iniciado em 1992, foram identificadas várias fontes de resistência à mancha angular. NIETSCHE *et al.* (2000) avaliaram a reação de nove cultivares de feijoeiro a 25 patótipos de *P. griseola*, demonstrando que as variedades México 54, AND 277, MAR-2, Cornell 49-242 e BAT332, além de G5686, são importantes fontes de resistência a este patógeno. Posteriormente, foram obtidas isolinhas derivadas dessas fontes, as quais foram utilizadas em estratégias de melhoramento pelo mesmo Programa (CAIXETA *et al.*, 2002; CAIXETA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANGULARD *et al.*, 2007).

Análise periódica da variabilidade patogênica de *P. griseola* possibilita monitorar a viabilidade de uso das fontes de resistência já utilizadas e a identificação de novos acessos portadores de genes que conferem resistência efetiva, ampla e estável ao patógeno. Diante disso, este capítulo tem como objetivos: caracterizar isolados de *P. griseola* provenientes de algumas localidades do Estado de Minas Gerais utilizando as variedades da série diferenciadora; e avaliar as fontes de resistência utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV: BAT 332, Cornell 49-242, México 54, AND 277 e MAR-2, frente a estes isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais de condução dos experimentos

A obtenção de culturas monospóricas do fungo *P. griseola* foi realizada na Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e no Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL) situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV). O cultivo das plantas foi realizado em casas-de-vegetação. As inoculações foram conduzidas em uma casa-de-apoio, onde se encontram instaladas câmaras-de-nevoeiro para a incubação das plantas inoculadas. A avaliação dos sintomas ocorreu nas casas-de-vegetação, onde se encontravam as plantas que haviam sido inoculadas. Todos estes locais e as estruturas mencionadas anteriormente estão situados no Campus da UFV, em Viçosa - Minas Gerais, Brasil.

2.2. Locais de coleta das folhas sintomáticas

Para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas folhas de feijoeiro com sintomas de mancha angular em cidades de três importantes regiões produtoras de feijão do Estado de Minas Gerais: Triângulo/Alto Paranaíba (Lagoa Formosa), Noroeste (Paracatu e Unaí) e Zona da Mata (Alto Jequitibá, Canaã, Coimbra, Manhumirim, São Miguel do Anta e Viçosa) (Figura 1). A coleta foi realizada em diferentes pontos de cada área de cultivo selecionada em cada uma das cidades visitadas a fim de se obter uma melhor amostragem.

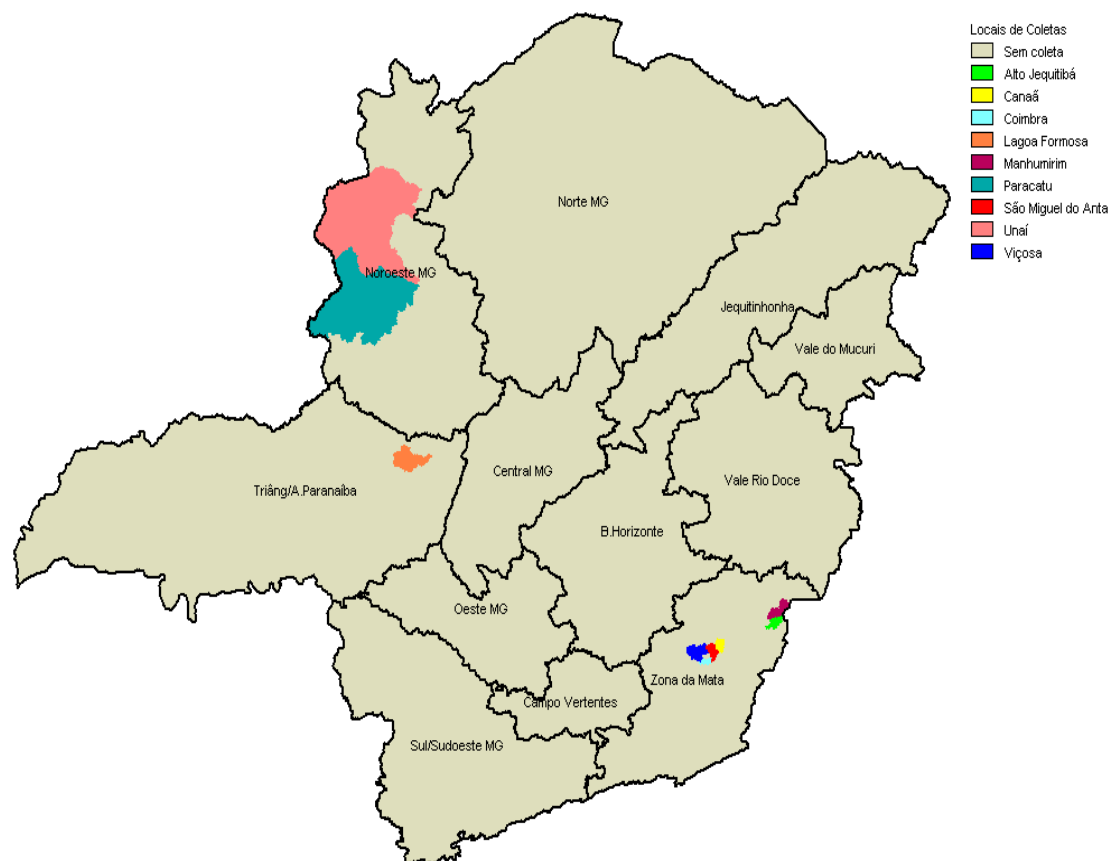


Figura 1. Cidades do estado de Minas Gerais onde ocorreram coletas de folhas de feijoeiro apresentando sintomas de mancha angular.

2.3. Obtenção de culturas monospóricas

Folhas apresentando sintomas de mancha angular em condições de campo foram coletadas e armazenadas em sacos de papel. Ao fim de cada coleta os sacos de papel eram colocados em sacos plásticos maiores e estes eram acondicionados em caixas de isopor contendo géis congeláveis para manutenção de baixa temperatura e para evitar a rápida deterioração das folhas coletadas. Posteriormente, parte das folhas coletadas era acondicionada em sacos de papel dentro de uma geladeira e outra parte das folhas eram mantidas em excicatas (processo de herborização), de modo que se mantinham vivas e sem sintomas de deterioração, ficando úteis para a realização do isolamento dos esporos do fungo *P. griseola*.

Para a obtenção de culturas monospóricas, seguiu-se uma adaptação da metodologia descrita por CORREA-VICTORIA (1987) e PYINDJI (1991), composta das seguintes etapas seqüenciais: (i) raspagem das extremidades de conidióforos nas lesões utilizando a ponta de uma agulha previamente esterilizada (flambagem) e embebida em água estéril; (ii) transferência de conídios aderidos à agulha para uma gota de água estéril na superfície de placas de Petri contendo meio ágar-água (etapa repetida de cinco a dez vezes por placa); (iii) espalhamento da suspensão sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente esterilizada (flambagem); (iv) após 24 horas, identificação, sob microscópio binocular estereoscópico, de conídios germinados e transferência individual para tubos de ensaio contendo meio a base de molho de tomate (Pomarola Tradicional, Knorr) [163,00 mL de Pomarola, 14,37 g de ágar, 2,16 g de carbonato de cálcio (CaCO_3), 575,00 mL de água e antibiótico (concentração dependente de qual antibiótico foi usado)].

Após 15 dias, os tubos que apresentavam o desenvolvimento de massa micelial (Figura 2) foram acondicionados em uma incubadora a 24°C.

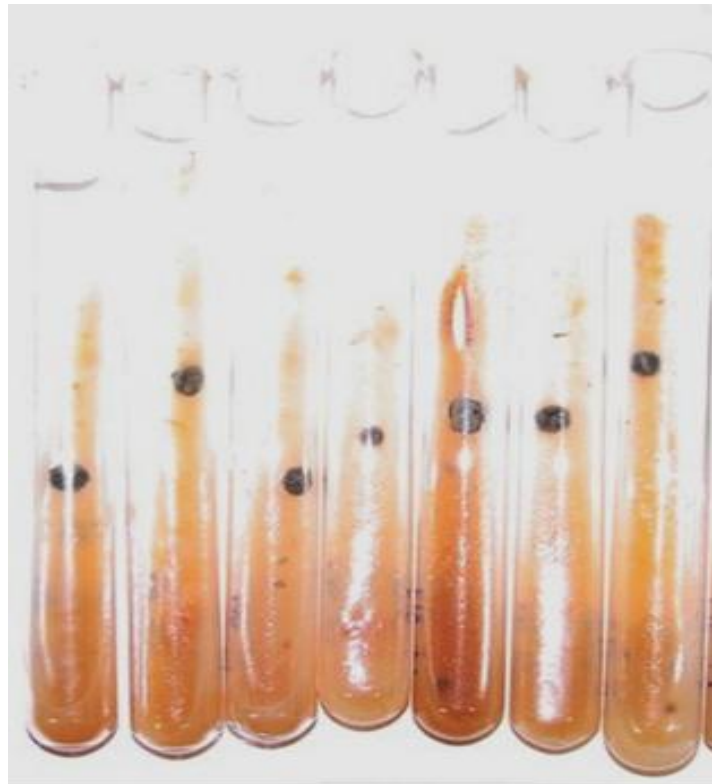


Figura 2. Tubos de ensaio apresentando sinais de crescimento a partir de um único conídio de *P. griseola*.

Quando as colônias atingiram o crescimento satisfatório (20-30 dias após o isolamento) foi realizada a transferência de parte do micélio para placas de Petri contendo o meio à base de molho de tomate citado anteriormente, através dos seguintes passos: (i) repicagem dos isolados em câmara asséptica de fluxo laminar; (ii) maceração do micélio, com palitos esterilizados, em tubos contendo 2 ml água estéril; (iii) deposição e espalhamento de 0,5 ml dessa suspensão no centro das placas de Petri, visando a multiplicação dos isolados; (iv) incubação por 12 dias a 24°C no escuro em incubadora.

2.4. Preparo do inóculo

Para cada isolado obtido, foi preparada uma suspensão de conídios e fragmentos do micélio a partir da adição de 2 a 5 ml de água estéril por placa de Petri. Com o auxílio de uma espátula, efetuou-se a raspagem superficial em colônias do fungo de 12 dias de idade, crescendo a 24°C sobre placas contendo uma mistura de água destilada, molho de tomate (Pomarola), ágar, carbonato de cálcio (CaCO_3) e estreptomicina (antibiótico). Essa suspensão foi filtrada em gaze e posteriormente ajustada para concentração final de $2,0 \times 10^4$ conídios/mL (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995) com o auxílio de uma câmara de Neubauer visualizada sob microscópio de luz.

2.5. Inoculação, avaliação de sintomas e caracterização em patótipos

Sementes das 12 variedades diferenciadoras e das fontes de resistência, AND 277 e MAR-2, além de México 54, Cornell 49-242 e BAT 332 (pertencentes à série diferenciadora), foram semeadas diretamente em vasos plásticos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg da formulação 4-14-8 por m^3 de substrato. Para cada isolado caracterizado, foram inoculadas em torno de 12 plantas de cada variedade e de cada fonte de resistência. No plantio, eram semeadas três sementes pré-germinadas por vaso.

As plantas foram inoculadas quando atingiram o estágio fenológico V3 (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). A descrição dos estádios fenológicos da cultura do feijoeiro, encontra-se na Tabela 1. As inoculações foram efetuadas nas faces abaxial e adaxial dos trifólios, utilizando um atomizador De Vilbiss nº 15 acionado por um compressor elétrico. Após as inoculações e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmaras-de-nevoeiro, sendo mantidas a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob foto-período de 12 horas e umidade relativa superior a 95%. Após 48 horas sob estas condições, as plantas foram transferidas para casas-de-vegetação, onde permaneceram até a avaliação de sintomas.

Tabela 1. Escala fenológica do feijoeiro comum

Fase	Estádio	Descrição
Vegetativa	V ₀	Germinação/Emergência
	V ₁	Cotilédones ao nível do solo
	V ₂	Folhas primárias expandidas
	V ₃	Primeira folha trifoliada
	V ₄	Terceira folha trifoliada
Reprodutiva	R ₅	Botões florais
	R ₆	Abertura da primeira flor
	R ₇	Aparecimento das primeiras vagens
	R ₈	Primeiras vagens cheias
	R ₉	Modificação da cor das vagens (maturidade)

Fonte: adaptada de DOURADO NETO & FANCELLI, 2000.

A severidade da doença foi verificada visualmente aos 15, 18 e 21 dias após inoculação, usando-se a escala de notas descrita por SCHOONHOVEN & PASTOR-CORRALES (1987) (Figura 3): 1 - plantas sem sintomas da doença; 2 - presença de até 3% de lesões foliares; 3 - presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4 - presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5 - presenças de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10 - 15% da área foliar; 6 - presenças de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15 - 20% da área foliar; 7 -

presenças de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20 - 25% da área foliar; 8 - presenças de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25 - 30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9 - sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, plantas que receberam notas de 1 a 3 (ausência de lesões com esporulações) foram consideradas resistentes e plantas com notas de 4 a 9 (presença de lesões esporulantes) foram consideradas suscetíveis, conforme CIAT (1995).

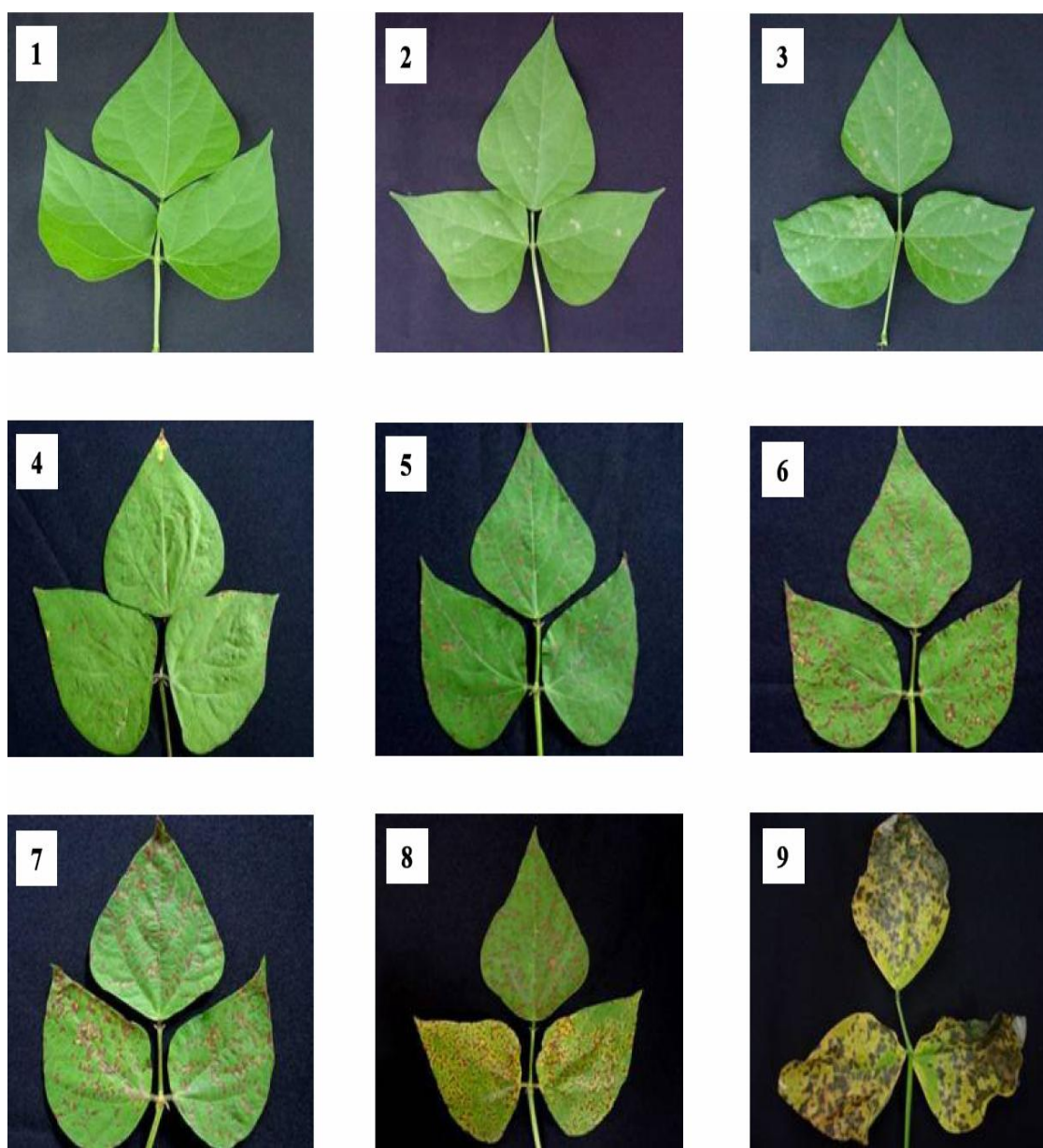


Figura 3. Escala de avaliação da severidade de mancha angular em feijoeiro, incitada por *P. griseola*. FONTE: Vital (2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram efetuadas coletas de folhas de feijoeiro apresentando sintomas de mancha angular em 33 áreas de cultivo, distribuídas em nove cidades de Minas Gerais. Foram visitadas oito localidades no município de Paracatu; sete em Lagoa Formosa; cinco em São Miguel do Anta; quatro em Canaã; três em Coimbra; duas nos municípios de Manhumirim, Unaí e Viçosa e uma em Alto Jequitibá. No total, foram obtidos 78 isolados monospóricos de *P. griseola* em condições de serem caracterizados. De cada uma das cidades visitadas, obtiveram-se, no mínimo, cinco isolados monospóricos e pelo menos um isolado de cada cidade visitada foi caracterizado.

Dos 78 isolados obtidos, 31 foram caracterizados, possibilitando a verificação de grande variabilidade patogênica. Deste total, foram obtidos 15 patótipos distintos, os quais são apresentados na Tabela 2. De acordo com os dados, de cada dois isolados de *P. griseola* caracterizados, um patótipo foi identificado. Dos 15 patótipos obtidos, o 63-63 foi detectado em sete das nove cidades. Além disso, esse patótipo foi o mais frequente com 12 dos 31 isolados caracterizados. O patótipo 63-23 ocorreu em três cidades com a frequência de três isolados; os patótipos 63-7, 47-39 e 15-7 ocorreram em duas cidades cada um, com uma frequência de dois isolados, sendo que, os demais ocorreram em uma única cidade com a frequência de um isolado. A constatação de que vários isolados foram classificados como patótipo 63-63, ou seja, apresentam reação de compatibilidade com todas as variedades diferenciadoras, indica que a série diferenciadora da mancha angular necessita ser revista, incluindo novas variedades visando melhor discriminação em patótipos (NIETSCHE *et al.*, 2001).

Nos trabalhos desenvolvidos por SARTORATO (2002), SARTORATO (2004) e VITAL (2006), as variedades diferenciadoras Don Timóteo, G11796 e Bolón Bayo demonstraram reação de suscetibilidade a praticamente todos os isolados de *P. griseola* caracterizados. De acordo com os resultados relatados, pode-se verificar que tais variedades não estão sendo relevantes na discriminação de patótipos de *P. griseola*, o que também foi constatado neste

trabalho. Além disso, devido às condições do fotoperíodo, estas variedades apresentam a desvantagem de não florescerem em determinados locais do Brasil, como Minas Gerais, Goiás e os estados das Regiões Norte e Nordeste, o que dificulta o desenvolvimento de trabalhos de caracterização do fungo, já que impossibilita uma constante reposição de sementes. Diante destes fatos, verifica-se, mais uma vez, a necessidade de revisão dos genótipos que compõem a série diferenciadora atual, tanto em número quanto em tipo, visando maior eficiência na classificação dos patótipos.

Todos os isolados apresentaram um fenótipo de virulência tipicamente do acervo Mesoamericano, uma vez que foram capazes de incitar a doença em variedades Andinas e Mesoamericanas de feijão (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995). Estes resultados demonstram que, em Minas Gerais, há a predominância de patótipos de *P. griseola* do grupo Mesoamericano, como ocorre no restante do país (NIETSCHKE, 2000). Isto se deve, principalmente, ao fato de que, no Brasil, a maioria dos cultivares de feijão utilizada pelos produtores pertence ao *pool* gênico Mesoamericano. Consequentemente, a pressão de seleção favoreceu o predomínio de tais patótipos. Assim, a utilização de cultivares Andinos como fontes de resistência à mancha angular, pode ser uma boa estratégia para programas de melhoramento que visam resistência a essa doença (GUZMÁN *et al.*, 1995).

A virulência das populações Mesoamericanas do patógeno tem sido documentada no Brasil e em vários países. SARTORATO e RAVA (1984) observaram a especialização fisiológica do fungo *P. griseola* no Brasil. CARBONELL *et al.* (1997) e SARTORATO (2002), utilizando o atual grupo de diferenciadoras, confirmaram a ampla distribuição e a predominância de sete patótipos de *P. griseola* em cinco estados brasileiros. PASTOR-CORRALES & JARA (1995) determinaram 27 patótipos em diferentes países da América Latina. MAHUKU *et al.* (2002) identificaram 50 patótipos a partir de 112 isolados obtidos de feijões da América Central, e apenas 18 deles foram encontrados em um ou mais países. Pesquisas preliminares realizadas na Costa Rica (ARAYA & OROZCO, 2001) demonstraram a importância da variabilidade patogênica na seleção de fontes de resistência à enfermidade.

Tabela 2. Caracterização de isolados de *P. griseola* coletados em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais

Número	Isolado	Fenótipos de Virulência das Variedades ¹												Patótipo	Local
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
1	A ₁ 13	a	b	c	d			g	h	i				15-7	Lagoa Formosa
2	A ₁ 8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Lagoa Formosa
3	A ₁ 32	a	b	c	d	e	f	g	h	i			l	63-39	Lagoa Formosa
4	A ₂ 4	a	b	C	d	e	f	g	h	i				63-7	Lagoa Formosa
5	A ₂ 12	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Lagoa Formosa
6	A ₆ 10	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j			63-15	Lagoa Formosa
7	AJ 12	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Alto Jequitibá
8	B ₁ 46	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Paracatu
9	B ₂ 9	a	b	c	d			g	h	i				15-7	Paracatu
10	B ₃ 8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j		l	63-47	Paracatu
11	B ₄ 4	a	b	c	d		f	g	h	i			l	47-39	Paracatu
12	B ₄ 6	a	b	c	d	e				i				31-4	Paracatu
13	B ₇ 17	a	b	c				g	h	i	j			7-15	Paracatu
14	B ₇ 50	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Paracatu
15	C ₁ 1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Unaí
16	C ₁ 17	a	b					g	h	i		k		3-23	Unaí
17	C ₁ 28	a	b	c	d	e	f		h	i				63-6	Unaí
18	C ₂ 10	a	b	c		e		g	h	i		k		23-23	Unaí
19	CM ₁ 2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Canaã
20	CM ₃ 11	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		63-31	Canaã
21	Coimbra 20	a	b	c	d	e	f	g	h	i				63-7	Coimbra
22	Coimbra 21	a	b	c	d	e		g	h	i				31-7	Coimbra
23	SM 17	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	São Miguel do Anta

Continuação da Tabela 2.

Número	Isolado	Fenótipos de Virulência das Variedades ¹												Raça	Local
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
24	SM 20	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	São Miguel do Anta
25	SM 25	a	b	c	d		f	g	h	i			l	47-39	São Miguel do Anta
26	SM 28	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	São Miguel do Anta
27	SM 32	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63-23	São Miguel do Anta
28	SM ₂ 11	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	São Miguel do Anta
29	Viçosa 3	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63-23	Viçosa
30	Viçosa 7	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	63-63	Viçosa
31	Manhumirim 14	a	b	c	d	e	f	g	h	i		k		63-23	Manhumirim

1/ A= Don Timóteo, B= G 11796, C= Bolón Bayo, D= Montcalm, E= Amendoim, F= G 5686, G= PAN 72, H= G 2858, I= Flor de Mayo, J= México 54, K= BAT 332 e L= Cornell 49-242. As letras minúsculas indicam suscetibilidade da variedade.

Devido à crescente importância da mancha angular, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, iniciado em 1992, tem intensificado esforços visando resistência a essa doença. Foram desenvolvidas isolinhas com grãos do tipo carioca contendo os genes: *Ur-ON* e *Co-10*, que conferem resistência à ferrugem [incitada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger] e à antracnose [incitada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib.], respectivamente, provenientes de Ouro Negro; *Co-4* e *Co-6*, que conferem resistência à antracnose, provenientes de TO e AB 136; e *Phg-1*, que confere resistência à mancha angular, proveniente de AND 277. RAGAGNIN *et al.* (2005) inter cruzaram estes materiais concentrando os genes *Ur-ON*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10* e *Phg-1* em quatro isolinhas que foram denominadas Rudá “R”. Posteriormente, objetivando aperfeiçoar a pirâmide obtida, SANGULARD *et al.* (2007), introgridiram genes de resistência à mancha angular por meio de cruzamentos entre Rudá “R” e outras quatro isolinhas derivadas de México 54 (*Phg-2* e/ou *Phg-5* e/ou *Phg-6*), MAR-2 (*Phg-4* e/ou *Phg-5*²), Cornell 49-242 (*Phg-3*) e BAT 332 (*Phg-6*²).

Dos 15 patótipos caracterizados neste trabalho, apenas o 63-63 apresentou reação de compatibilidade com as variedades diferenciadoras Cornell 49-242 e BAT 332, simultaneamente. Dados semelhantes foram observados por APARÍCIO (1998) e NIETSCHE (2000) ao verificarem estas variedades, indicando que Cornell 49-242 e BAT 332 podem ser utilizadas como fontes de genes de resistência à mancha angular complementares entre si, gerando um bom espectro de resistência.

As variedades México 54, Cornell 49-242 e BAT 332 (pertencentes ao grupo Mesoamericano) apresentaram resistência a 11, 11 e 10 patótipos, respectivamente, porém não apresentam resistência a nenhum dos isolados caracterizados como patótipo 63-63. Considerando as fontes de resistência AND 277 e MAR-2, houve reações diferenciadas quando inoculadas com os 15 patótipos de *P. griseola* caracterizados. As notas variaram de 1 a 9, para um mesmo isolado caracterizado (adotou-se o critério de média entre os valores para definir as notas), sendo AND 277 e MAR-2 resistentes a 10 e 8 patótipos, respectivamente. No entanto, AND 277 apresentou resistência ao isolado

denominado CM₁2 caracterizado como patótipo 63-63 e MAR-2 foi resistente aos isolados SM 28 e Viçosa 7, também caracterizados como patótipo 63-63.

Considerando o trabalho visando à piramidação de genes de resistência à mancha angular realizado por SANGLARD *et al.* (2007) e interpolando o espectro de resistência das fontes avaliadas, há um potencial de que as linhagens derivadas dos intercruzamentos possuam resistência à grande parte dos isolados caracterizados neste trabalho, excetuando aqueles caracterizados como patótipo 63-63 e identificados por: A₁8 e A₂12 (Lagoa Formosa), AJ 12 (Alto Jequitibá), B₁ 46 e B₇ 50 (Paracatu), C₁1 (Unaí), SM 17, SM 20 e SM₂11 (São Miguel do Anta). Estes isolados foram obtidos de cidades que abrangem as três regiões do Estado de Minas Gerais em que foram coletadas as folhas (Tabela 3).

No Brasil, utilizando a série de variedades diferenciadoras, SARTORATO & ALZATE-MARIN (2004) verificaram que os patótipos 31-39, 63-31, 63-23, 63-39, 63-47, 63-55 e 63-63 foram os mais frequentes e amplamente distribuídos e são comumente encontrados nos Estados de Goiás e Minas Gerais. Neste trabalho, os patótipos 3-23, 7-15, 15-7, 23-23, 31-4 e 63-6, que até o momento não haviam sido identificados no Estado de Minas Gerais, foram caracterizados. Estes resultados confirmam que os isolados de Minas Gerais de *P. griseola* possuem um comportamento típico do grupo Mesoamericano e que possuem ampla variabilidade patogênica ou fisiológica.

Tabela 3. Avaliação de fontes de resistência à mancha angular utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV

Nº	Identificação	Patótipo	Reação das fontes de resistência				
			MAR-2	AND 277	México 54	BAT 332	Cornell 49-242
1	A ₁ 13	15-7	R	S	R	R	R
2	A ₁ 8	63-63	S	S	S	S	S
3	A ₁ 32	63-39	S	S	R	R	S
4	A ₂ 4	63-7	R	S	R	R	R
5	A ₂ 12	63-63	S	S	S	S	S
6	A ₆ 10	63-15	S	S	S	R	R
7	AJ 12	63-63	S	S	S	S	S
8	B ₁ 46	63-63	S	S	S	S	S
9	B ₂ 9	15-7	S	R	R	R	R
10	B ₃ 8	63-47	R	R	S	R	S
11	B ₄ 4	47-39	S	S	R	R	S
12	B ₄ 6	31-4	S	S	R	R	R
13	B ₇ 17	7-15	S	R	S	R	R
14	B ₇ 50	63-63	S	S	S	S	S
15	C ₁ 1	63-63	S	S	S	S	S
16	C ₁ 17	3-23	S	S	R	S	R
17	C ₁ 28	63-6	R	R	R	R	R
18	C ₂ 10	23-23	R	R	R	S	R
19	CM ₁ 2	63-63	S	R	S	S	S
20	CM ₃ 11	63-31	S	R	S	S	R
21	Coimbra 20	63-7	R	R	R	R	R
22	Coimbra 21	31-7	R	R	R	R	R
23	SM 17	63-63	S	S	S	S	S
24	SM 20	63-63	S	S	S	S	S
25	SM 25	47-39	S	S	R	R	S
26	SM 28	63-63	R	S	S	S	S
27	SM 32	63-23	R	R	R	S	R
28	SM ₂ 11	63-63	S	S	S	S	S
29	Viçosa 3	63-23	R	R	R	S	R
30	Viçosa 7	63-63	R	S	S	S	S
31	Manhumirim 14	63-23	R	R	R	S	R

R = Fenótipo resistente: notas de 1 a 3

S = Fenótipo suscetível: notas de 4 a 9.

Outro aspecto relevante observado é a existência de isolados caracterizados como um mesmo patótipo e que proporcionam reações diferenciadas quando inoculados nas fontes de resistência analisadas. Este fato pode ser observado entre isolados A₁13 e B₂9, caracterizados como patótipo 15-7; entre os isolados A₂4 e Coimbra 20 caracterizados como patótipo 63-7; e entre os isolados caracterizados como patótipo 63-63, principalmente, CM₁2, SM 28 e Viçosa 7 (em relação aos demais isolados caracterizados como patótipo 63-63, todas as fontes de resistência apresentaram reação de compatibilidade, ou seja, foram suscetíveis). Estes resultados mostram que existem diferenças, em relação à patogenicidade, entre isolados caracterizados como mesmo patótipo, oferecendo, mais uma vez, suporte para a proposta de revisão dos genótipos utilizados na série diferenciadora da mancha angular.

Até o presente momento, a caracterização de isolados de *P. griseola* tem apresentado alguns problemas, pois um isolado caracterizado como um dado patótipo em um ambiente ou em uma dada época do ano pode ser caracterizado como outro patótipo em outras condições ambientais ou em outras estações. Este fato revela a urgente necessidade de padronização das condições ambientais e das condições de avaliação da doença, para que a caracterização de *P. griseola* possa ser realizada pelos pesquisadores com maior confiabilidade (SARTORATO, 2002).

Apesar disso, os resultados obtidos neste trabalho são de relevante importância para programas de melhoramento, pois a caracterização de patótipos direciona os trabalhos de identificação de fontes de resistência à mancha angular, além de possibilitar o entendimento da distribuição do patógeno.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram caracterizados 31 isolados de *Pseudocercospora griseola*, os quais foram classificados em 15 patótipos distintos.

Verificou-se grande variabilidade patogênica entre os isolados obtidos e caracterizados e a predominância de patótipos do grupo Mesoamericano.

O patótipo mais amplamente distribuído e com maior número de exemplares foi o 63-63, indicando que a série diferenciadora da mancha angular necessita ser revista, incluindo novas variedades visando melhor discriminação em patótipos.

As variedades Don Timóteo, G11796 e Bolón Bayo apresentaram reação de compatibilidade com praticamente todos os isolados de *P. griseola* caracterizados, indicando, mais uma vez, a necessidade de revisão dos genótipos pertencentes à série diferenciadora da mancha angular.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se a necessidade de avaliação de novos acessos de *P. vulgaris* advindos de bancos ativos de germoplasma, visto que, as fontes utilizadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, tanto sozinhas quanto interpoladas, não apresentaram resistência aos isolados A₁8, A₂12, AJ 12, B₁ 46, B₇ 50, C₁1, SM 17, SM 20 e SM₂11, caracterizados como patótipo 63-63.

Isolados caracterizados como mesmo patótipo pela série diferenciadora, causam reações diferenciadas, em relação à patogenicidade, quando inoculados nas fontes de resistência México 54, Cornell 49-242, BAT 332, AND 277 e MAR-2, sendo mais um indício da necessidade de revisão das variedades utilizadas como diferenciadoras para a mancha angular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARÍCIO, B. H. E. **Caracterización de la diversidad molecular y la virulencia de aislamientos del hongo *Phaeoisariopsis griseola* de Brasil y Bolivia.** Cali, Colombia: Universidad del Valle. Trabajo (Grado) – Universidad del Valle, 120p. 1998.
- ARAYA, C. M. & OROZCO, S. Variabilidad patogénica y evaluación de fuentes de resistencia a *Phaeoisariopsis griseola* en Costa Rica. **Memorias, XLVII Reunión Anual PCCMCA.** Costa Rica. 2001.
- BORÉM, A. & CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T. J. & BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais.** Viçosa: UFV, p. 13-17. 1998.
- CAIXETA, E. T. **Caracterização da resistência genética à mancha angular e desenvolvimento de marcadores microssatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro.** Viçosa, MG: UFV. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 90p. 2002.
- CAIXETA, E. T., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 145, n. 3, p. 237-245. 2005.
- CARBONELL, S. A. M., ITO, M. F., POMPEU, A. S., FRANCISCO, F. J. & ALMEIDA, A. L. L. Variabilidade de *Phaeoisariopsis griseola* e fontes de resistência em feijoeiro no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 253, (Resumo). 1997.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Primer Taller Internacional sobre la Mancha angular del Frijol Comum, 1995, Cali.** Cali: Colômbia. 1995.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** East Lansing: Michigan State University. Tese (Doutorado em Agronomia) – Michigan State University, 90p.1987.
- CROUS P. W., LIEBENBERG M. M., BRAUN, U. & GROENEWALD J. Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 163-173. 2006.
- DOURADO NETO, D. & FANCELLI, A. L. Produção de feijão. Guaíba: **Agropecuária**, p. 385. 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2008. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em novembro de 2008.

- GUZMAN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W. C., TEMPLE, S. R., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A. B. C. & GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 600-607. 1995.
- MAHUKU, G. S., JARA, C., CAJIAO, C. & BEEBE, S. Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. **Euphytica**, v. 130, p. 303-313. 2003.
- MAHUKU, G. S., JARA, C., CUASQUER, J. B. & CASTELLANOS, G. Genetic Variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its Implications for Resistance Breeding of Common Bean. **Plant Pathology**, v. 51, p. 94-604. 2002.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G. A. PAULA-JR, T. J., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Fontes de resistência à mancha angular do feijoeiro em Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 45, p. 567-571. 2000.
- NIETSCHKE, S., BORÉM, A., CARVALHO, G. A., PAULA JÚNIOR, T. J., FERREIRA, C. F., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, v. 117, n. 1, p. 77-84. 2001.
- OLIVEIRA, E. J., ALZATE-MARIN, A. L., BORÉM, A., FAGUNDES, S. A., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Molecular marker-assisted selection for development bean lines resistant to angular leaf spot. **Plant Breeding**, v. 124, p. 572-575. 2005.
- OLIVEIRA, E. J., ALZATE-MARIN, A. L., BORÉM, A., MELO, C. L. P., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, p. 220-223, 2004.
- PASTOR-CORRALES, M. A. & JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, p. 15-22. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. & SINGH, S. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 103, p.161-171. 1998.
- PYNDJI, M. M. **Variabilité pathogénique de *Phaeoisariopsis griseola* dans la region des Grands Lacs**. In: NYABYENDA, P. & SCHEIDEGGER, U. (Eds.). Actes du sixieme Séminaire Regional sur l' Amélioration du Haricot dans la region des Grands Lacs. Kigali, Rwanda: CIAT. 76p. (African Workshop Series, 17). 1991.
- RAGAGNIN, V. A., ALZATE-MARIN, A. L., SOUZA, T. L. P. O., SANGLARD, D. A., MOREIRA, M. A. & BARROS, E. G. Use of molecular markers to pyramiding

- multiple genes for resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot in the common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 48, p. 94-95. 2005.
- SANGLARD, D. A., DAMASCENO, J. D., BALBI, B. P., BARROS E. G. & MOREIRA, M. A. Introgression of Angular Leaf Spot Resistance Genes in Common Bean Isolines. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 50, p. 101-102. 2007.
- SARTORATO, A. & ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 235-236. 2004.
- SARTORATO, A. & RAVA, C. A. Mancha angular. In: SARTORATO, A. & RAVA, C. A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, p. 41-68. 1994.
- SARTORATO, A. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five States in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 78-81. 2002.
- SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha angular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 192-194. 2006.
- SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the state of Goiás, Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 152, n. 7, p. 385-390. 2004.
- SCHOONHOVEN, A. van. & PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Colômbia, CIAT. 1987.
- VIEIRA, C., BORÉM, A. & RAMALHO, M. A. P. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 273-349, 1999.
- VITAL, W. M. ***Phaeoisariopsis griseola*: Physiological characterization, resistance sources and reaction of dry bean**. Campinas. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Pós-Graduação – IAC, 49p., 2006.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATÓTIPOS DE *Pseudocercospora griseola* COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO ITS DO rDNA NUCLEAR

1. INTRODUÇÃO

A mancha angular é atualmente uma das mais importantes doenças que acometem a cultura do feijoeiro em países tropicais e subtropicais, podendo causar severas perdas na produtividade, que podem atingir 80%, sob condições ambientais favoráveis (JESUS JR. *et al.*, 2001; MAHUKU *et al.*, 2002). No Brasil, a mancha angular é a principal doença da parte aérea do feijoeiro. Também em países como México e Bolívia, bem como em regiões da África e da América Central, a doença vem crescendo em importância, causando prejuízos econômicos aos produtores (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1998). O melhoramento para resistência à doença é a principal prática conduzida por melhoristas (MZUKU *et al.*, 1990; TRUTMANN & PYNDJI, 1994), no entanto o desenvolvimento de variedades resistentes tem sido dificultado devido à ampla variabilidade genética de *Pseudocercospora griseola*.

A diversidade genética de *P. griseola* tem sido examinada utilizando as variedades da série diferenciadora de feijão (PASTOR-CORRALES & JARA, 1995) análise de isoenzimas (CORREA-VICTORIA, 1988), marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (GUZMÁN *et al.*, 1995; PASTOR-CORRALES & JARA, 1995), gama de hospedeiros, características culturais, morfologia, além de análises de sequências de DNA, como a região do espaçador interno transcrito (ITS) e os genes de RNA ribossômico do *cluster* gênico do rDNA (CROUS *et al.*, 2006).

Uma significativa descoberta revelada por estes estudos foi a identificação de dois grupos principais de patótipos de *P. griseola*: (1) Andino,

que co-evoluiu com genótipos de feijão do *pool* gênico Andino e (2) Mesoamericano, que co-evoluiu com os genótipos de feijão do *pool* gênico Mesoamericano (GUZMÁN *et al.*, 1995).

A consequência prática desta co-evolução entre o patógeno e o hospedeiro é que patótipos Andinos de *P. griseola* tendem a apresentar reações de compatibilidade com variedades Andinas de feijão, resultando no estabelecimento da doença, enquanto que os patótipos de origem Mesoamericana tendem a apresentar reações de compatibilidade com variedades Mesoamericanas (apesar de patótipos Mesoamericanos também serem capazes de incitar a doença em feijões Andinos). O que se observa é que feijões de um dado *pool* gênico são mais resistentes aos patótipos de *P. griseola* que foram isolados a partir de feijões do outro *pool* gênico. Isto tem conduzido à sugestão de incorporação desta resistência em genótipos de feijão suscetíveis (GUZMÁN *et al.*, 1998). Tal estratégia requer um entendimento aprofundado da estrutura da população de *P. griseola* e do tipo de feijão cultivado em uma dada região, uma vez que o processo de co-evolução é controlado por genes de ambas as espécies e a interação afeta a probabilidade de sobrevivência de cada uma, dado que ocorre alteração das frequências gênicas, principalmente dos genes envolvidos na interação.

Entretanto, a diferenciação de patótipos Andinos (denominados *P. griseola* *formae griseola*) e Mesoamericanos (denominados *P. griseola* *formae mesoamericana*) de *P. griseola* baseada apenas em sintomas ou morfologia pode ser dificultada. Técnicas que possibilitem a caracterização rápida de populações de *P. griseola*, em uma determinada área, proporcionam informações importantes para o manejo da mancha angular pelos melhoristas que buscam a resistência à doença.

Para estudar a diversidade genética de muitos organismos, dentre eles os fungos, ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas. Estas se baseiam na hibridização do DNA, análise de sequências de marcas gênicas, amplificação de sequências repetitivas e a digestão através de enzimas de restrição de produtos da amplificação de PCR (KÖLLIFER *et al.*, 2006). Uma das técnicas que vem sendo utilizada em análises genéticas de fungos é a

amplificação de sequências de nucleotídeos da região do rDNA através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

O rDNA é uma ferramenta importante para avaliação filogenética em espécies fúngicas. Existem diversas cópias de rDNA, nos genomas eucariotos, as quais são arranjadas e separadas por espaços não-codificados. As sequências codificadas do rDNA são altamente conservadas entre espécies de fungos. A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio para análises de divergência evolutiva. Essa diferenciação é resultado, na maioria dos casos, da ação de ambientes diferentes que cada população está sujeita sobre a variabilidade preexistente na espécie (MARQUES, 2003).

A utilização de PCR permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como os Espaçadores Internos Transcritos (ITS1 e ITS2), localizados entre regiões altamente conservadas, como as regiões correspondentes aos genes 5,8S, 18S e 28S, do rDNA. A região ITS é altamente conservada na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usada para taxonomia e para diferenciação entre populações de uma mesma espécie (BRUNS *et al.*, 1991; ANTONIOLLI *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002).

Diante disso, este trabalho tem com objetivo a caracterização da diversidade genética de 48 isolados de *P. griseola* através de análise da região ITS (ITS1-5,8S-ITS2) do *cluster* gênico do rDNA, utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de micélio para extração de DNA

Neste trabalho foram analisados 48 isolados de *Pseudocercospora griseola*. Destes 48 isolados, 20 foram obtidos de folhas de feijoeiro que apresentavam sintomas de mancha angular em algumas localidades do Estado de Minas Gerais, Brasil. Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL), situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV) e na Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia/UFV. Para a obtenção de culturas monospóricas, seguiu-se uma adaptação da metodologia de isolamento direto proposta por CORREA-VICTORIA (1987) e PYINDJI (1991), conforme descrito no Capítulo 1.

Para a obtenção de massa micelial foi realizada a transferência de parte do micélio, que estava crescendo em placas de Petri contendo meio de cultura à base de água destilada, molho de tomate (Pomarola), carbonato de cálcio e antibiótico, para placas de Petri contendo o mesmo meio, seguindo-se os seguintes passos: (i) repicagem do micélio em câmara asséptica de fluxo laminar; (ii) maceração do micélio, com palitos esterilizados, em tubos contendo 2 ml água estéril; (iii) deposição e espalhamento de 0,5 ml dessa suspensão no centro das placas de Petri, visando a multiplicação de cada isolado; (iv) incubação por 12 dias a 24°C, no escuro, e armazenagem em incubadora. Após 12 dias, o micélio de cada um dos isolados foi cuidadosamente retirado das placas de Petri (evitando a retirada de meio de cultura), em seguida foi colocado em pacotes de papel alumínio, corretamente identificado e transferido para um isopor contendo N₂ líquido e, por fim, os pacotes foram acondicionados a - 80°C.

Na Tabela 1 são apresentados 20 dos 48 isolados analisados neste trabalho, os patótipos em que cada um deles foi caracterizado e a localidade de origem (todos os isolados foram obtidos de feijões Mesoamericanos).

Tabela 1. Isolados analisados, patótipos caracterizados através das variedades diferenciadoras e localidade de origem

Isolado	Patótipo*	Origem
Manhumirim 14	63-23	Manhumirim
29-3	59-39	Lambari
97-2	31-15	Coimbra
A ₁ 8	63-63	Lagoa Formosa
A ₂ 4	63-7	Lagoa Formosa
A ₆ 10	63-15	Lagoa Formosa
AJ5	-	Alto Jequitibá
AJ12	63-63	Alto Jequitibá
B ₁ 46	63-63	Paracatu
B ₃ 16	-	Paracatu
B ₃ 8	63-47	Paracatu
B ₄ 8	-	Paracatu
B ₇ 50	63-63	Paracatu
C ₁ 1	63-63	Unaí
CM ₁ 2	63-63	Canaã
Coimbra 20	63-7	Coimbra
SM17	63-63	São Miguel do Anta
SM25	47-39	São Miguel do Anta
SM28	63-63	São Miguel do Anta
Viçosa 3	63-23	Viçosa

*: o traço (-) indica que o isolado ainda não foi caracterizado.

2.2. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico total de cada um dos isolados foi realizada a partir de 50 mg de micélio e esporos (macerados em N₂ líquido com a utilização de gral e pistilo de porcelana), utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* da Promega, com numeração de catálogo A1125, de acordo com as especificações do fabricante.

Após as etapas de extração e purificação do DNA especificadas no kit, promoveu-se uma desproteinização, adicionando 350 µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v:v) por amostra e, em seguida, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm em centrífuga *Eppendorf*, por 10 min, para separar

a fase orgânica da aquosa. A fase aquosa foi transferida para microtubos de 1,5 mL e, então, foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado. Após a realização desta etapa, os microtubos foram suavemente invertidos e deixados por duas horas a -20°C. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 14.000 rpm em centrífuga *Eppendorf*, por 10 min, para a sedimentação do precipitado de DNA (*pellet*) e sua fixação ao fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol gelado 70%. Os microtubos foram colocados em câmara de fluxo laminar sobre papel-toalha, até secar o precipitado. O material foi então ressuspenso em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM, pH 8,0) contendo RNase (40 µg/mL), e finalmente armazenado a -20°C.

2.3. Quantificação do DNA genômico total

A concentração do DNA genômico total de cada um dos 20 isolados foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, na presença de 0,5 µL de brometo de etídeo (0,2 µg/mL). A cada canaleta desse gel foi aplicada uma amostra de 3 µL de água ultra-pura, 1 µL de corante azul de bromofenol e 2 µL da solução de DNA de cada um dos isolados, totalizando 6 µL. Utilizou-se como padrão de comparação o marcador de tamanho Lambda (DNA de fago λ, da Invitrogen Life Technologies, clivado com enzimas de restrição), nas concentrações de 100 e 200 ng/mL. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese sob tensão constante de 120 Volts em tampão SB 1X (*Sodium Boric Acid*, 10 mM hidróxido de sódio, pH 8,0 ajustado com ácido bórico), por cerca de uma hora. Após a eletroforese, o gel foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram digitalizadas pelo sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/µL.

2.4. Amplificação da região ITS do rDNA

As amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR para a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram o ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE *et al.*, 1990), sintetizados pela GIBCO-BRL (Life Technologies). As reações de PCR possuíam um volume final de 25 µL contendo 3,0 µL de DNA (10 ng/µL); 5 µL de PCR *buffer* 5X (Promega, Madison, WI, EUA); 4 µL de dNTP (2,5 mM); 1,0 µL de cada *primer* (ITS1 e ITS4 a 5 µM); 0,2 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/µL; Promega, Madison, WI, EUA) e 10,8 µL de água ultra-pura para completar o volume da reação. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, EUA), programado para realizar as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, uma extensão final de 72 °C por 7 min e, por fim, as reações eram mantidas a 4°C. Reações controles, sem DNA e com DNA de tomate (ingrediente principal utilizado no meio de cultivo do fungo), foram realizadas com o objetivo de verificar a possível presença de DNA contaminante, já que o micélio foi retirado direto do meio de cultura.

2.5. Sequenciamento da região ITS

As reações de sequenciamento da região ITS (ITS1 e ITS2) e do gene 5,8S do rDNA foram realizadas com o Kit ABI *Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions* (Applied Biosystems), em um sequenciador automático Applied Biosystems modelo 3730xl, na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul), pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977).

2.6. Captura de sequências no GenBank

Para o desenvolvimento deste trabalho, 28 sequências da região ITS de *Pseudocercospora griseola* foram obtidas no GenBank (*National Center for Biotechnology Information*), oriundas do trabalho de CROUS *et al.* (2006). As sequências são de isolados de *P. griseola* oriundos de diversos países. Estes isolados são representativos dos dois *pools* gênicos do fungo: Andino e Mesoamericano, conforme mostrado na Tabela 2. As sequências capturadas são correspondentes ao fragmento que engloba a região: ITS1-5,8S-ITS2, amplificada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (os mesmos padrões utilizados neste trabalho). A região total amplificada apresenta um tamanho médio de 499 bases (CROUS *et al.*, 2006).

Tabela 2. Códigos das sequências da região ITS de isolados de *P. griseola* capturadas no GenBank, *pool* gênico do isolado e origem de cada isolado.

Código no GenBank	<i>Pool</i> gênico*	Origem
DQ289801	-	Portugal
DQ289802	-	Holanda
DQ289803	Andino	Zâmbia
DQ289804	Andino	África do Sul
DQ289805	Andino	Zâmbia
DQ289806	Andino	África do Sul
DQ289807	Andino	África do Sul
DQ289808	Andino	Tanzânia
DQ289809	Andino	-
DQ289810	Andino	-
DQ289811	Andino	Zâmbia
DQ289812	Andino	Tanzânia
DQ289813	Andino	Zâmbia
DQ289814	Andino	África do Sul
DQ289815	Andino	África do Sul
DQ289816	Andino	África do Sul
DQ289817	Andino	África do Sul
DQ289818	-	Coréia
DQ289819	Andino	Colômbia
DQ289820	Andino	Colômbia
DQ289821	Andino	Colômbia
DQ289822	Mesoamericano	África do Sul
DQ289823	Mesoamericano	Malauí
DQ289824	Mesoamericano	África do Sul
DQ289825	Mesoamericano	África do Sul
DQ289826	Mesoamericano	África do Sul
DQ289827	Mesoamericano	Honduras
DQ289828	Mesoamericano	Colômbia

*: O traço (-) indica que o *pool* gênico do isolado não foi caracterizado.

2.7. Edição das sequências

As sequências obtidas foram importadas para o aplicativo computacional SEQUENCHER versão 4.7 (*Gene Codes Corporation*, Ann Arbor, Michigan) (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Sequencher.shtml>) e submetidas a

edições manuais. As extremidades de cada sequência foram eliminadas, com o objetivo de obter uma região de equivalência para cada um dos isolados obtidos e analisados neste trabalho (total de 20 isolados) em comparação com aqueles que tiveram a sequência depositada no GenBank (total de 28 isolados). Por fim, as sequências foram alinhadas utilizando CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e foram, novamente, inspecionadas e manualmente editadas usando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007), para que fosse possível a obtenção da rede de haplótipos. As análises para obtenção dos haplótipos foram realizadas pelo programa NETWORK 4.2.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>) com a utilização do algoritmo *Median-Joining* (MJ).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de *P. griseola* foi amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 e gerou um fragmento único de aproximadamente 530 pb, a partir do DNA total extraído dos 20 isolados brasileiros obtidos em 10 localidades do Estado de Minas Gerais. As demais sequências analisadas foram obtidas no GenBank e são provenientes do trabalho de CROUS *et al.* (2006). No total, foram analisadas 48 sequências da região ITS do rDNA de isolados de *P. griseola*.

Com o objetivo de verificar uma possível contaminação com tomate (ingrediente principal do meio de cultura utilizado para a multiplicação de *P. griseola*) durante a raspagem do micélio dos isolados para a extração de DNA, uma amostra do DNA de uma variedade de tomate foi amplificada através dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 utilizados para a amplificação do DNA dos isolados de *P. griseola* (Figura 1). A amplificação do DNA de tomate gerou um fragmento maior, em relação àqueles observados na amplificação do DNA do fungo e não houve sinal de contaminação, já que este fragmento não apareceu em nenhuma das amostras do DNA amplificado de *P. griseola*.

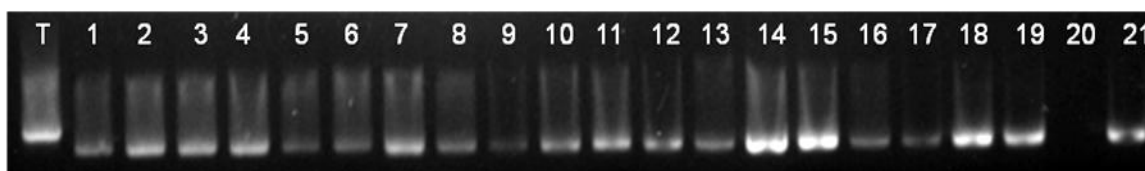


Figura 1. Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de uma variedade de tomate (utilizada como controle) e de 21 isolados do fungo *Pseudocercospora griseola*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. T – DNA de tomate; 1 – isolado A₁8; 2 – isolado C₁1; 3 – isolado B₇50; 4 – isolado CM₁2; 5 – isolado B₁46; 6 – isolado Coimbra 20; 7 – isolado 29-3; 8 – isolado B₄8; 9 – isolado AJ12; 10 – isolado B₃16; 11 – isolado A₆10; 12 – isolado 97-2; 13 – isolado SM17; 14 – isolado Manhumirim 14; 15 – isolado A₂4; 16 – isolado AJ5; 17 – isolado SM28; 18 – isolado B₃8; 19 – isolado SM25; 20 – isolado Coimbra 21 (não houve amplificação); 21 – isolado Viçosa 3.

A partir de cada amostra de DNA amplificado, realizaram-se dois sequenciamentos que diferiam na extremidade utilizada para o início do processo. Este procedimento foi de grande utilidade, já que possibilitou uma melhor correção manual das sequências obtidas e maior confiabilidade na realização desta metodologia. Com o alinhamento das 48 sequências, foram realizadas as análises para a construção de rede de haplótipos utilizando o algoritmo *Median-Joining* pelo programa NETWORK 4.2.0.1. Verificou-se a existência de cinco haplótipos distintos (Figura 2).

O haplótipo 1 englobou um total de 25 sequências referentes aos isolados 29-3; 97-2; A₁8; A₂4; A₆10; AJ12; AJ5; B₁46; B₃8; B₃16; B₄8; B₇50; CM₁2; Coimbra 20; Manhumirim 14; SM17; SM25; SM28; Viçosa 3 e às sequências do GenBank com os códigos DQ289822; DQ289823; DQ289824; DQ289825; DQ289826; DQ289828. Este haplótipo foi formado somente por sequências de isolados de origem Mesoamericana. O haplótipo 2 foi formado por apenas uma sequência, referente ao isolado C₁1. O haplótipo 3 também foi formado apenas por uma sequência, referente ao isolado com código DQ289827, obtido no GenBank. Os haplótipos 2 e 3 diferiram do haplótipo 1 pela existência de uma mutação de 1 pb distinta em cada um deles (A e B, respectivamente) e todos os isolados que compõem os três haplótipos pertencem ao *pool* gênico Mesoamericano de *P. griseola*.

O haplótipo 4 englobou 20 sequências referentes aos isolados com os seguintes códigos no GenBank: DQ289801; DQ289802; DQ289803; DQ289804; DQ289805; DQ289806; DQ289807; DQ289808; DQ289809; DQ289810; DQ289811; DQ289812; DQ289813; DQ289814; DQ289815; DQ289816; DQ289817; DQ289818; DQ289819; DQ289821. A maioria destas sequências pertence ao *pool* gênico Andino, exceto DQ289801; DQ289802; DQ289818 que não possuem a informação sobre o *pool* gênico. Este haplótipo difere do haplótipo 1 pela existência de duas mutações distintas (C e D, cada uma de 1 pb) e que diferem das mutações A e B. O haplótipo 5 foi formado por apenas uma sequência, referente ao isolado com código DQ289820, obtido no GenBank e que pertence ao *pool* gênico Andino. Este haplótipo difere do haplótipo 4 pela existência de uma mutação de 1 pb (E).

Apesar da falta de informação sobre o *pool* gênico de alguns isolados (DQ289801; DQ289802; DQ289818), verifica-se a formação de dois haplogrupos (Figura 2), um constituído por todos os isolados de origem Mesoamericana (cor vermelha – Figura 2) e outro constituído, basicamente, pelos isolados de origem Andina (cor verde – Figura 2). Esta evidência indica que os isolados que não possuem informações acerca do *pool* gênico, possivelmente, pertencem ao acervo Andino de *P. griseola*.

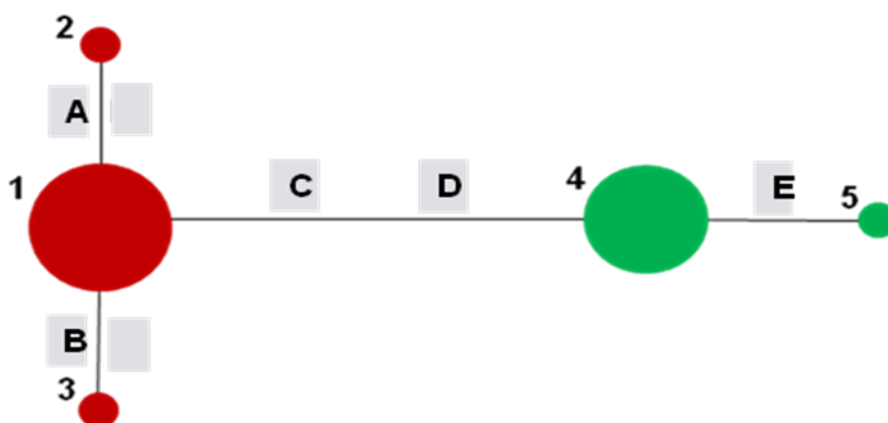


Figura 2. Rede de haplótipos construída pelo algoritmo *Median-Joining*, a partir de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 48 isolados de *P. griseola* obtidos de diversos locais. Números de 1 a 5 representam cada um dos haplótipos. Letras A, B, C, D e E representam mutações de 1pb.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por CROUS *et al.* (2006), verificando que a espécie *P. griseola* é subdividida em dois grupos distintos: *P. griseola* *formae griseola* (*pool* gênico Andino), que co-evoluiu com genótipos de feijoeiro de origem Andina e *P. griseola* *formae mesoamericana* (*pool* gênico Mesoamericano), que co-evoluiu, principalmente, com genótipos de feijoeiro de origem Mesoamericana. Apesar de no trabalho desenvolvido por CROUS *et al.* (2006) a separação dos dois grupos ter sido definida com base na gama de hospedeiros, morfologia, características culturais e nas análises das sequências da região ITS e dos genes que codificam para calmodulina e actina, observa-se que a análise da região ITS, feita neste trabalho, foi suficiente para a separação dos dois *pool* gênicos do patógeno.

Outro importante aspecto observado é que todos os isolados oriundos das cidades do Estado de Minas Gerais pertencem ao haplogrupo Mesoamericano. Este fato, também comprovado pelas inoculações artificiais nas variedades diferenciadoras, demonstra a necessidade de busca constante de fontes de resistência a estes patótipos. Uma alternativa é o uso de variedades Andinas, já que algumas não apresentam reação de compatibilidade com patótipos Mesoamericanos. OROZCO e ARAYA (2005) demonstraram que em locais onde são cultivados exclusivamente feijões do tipo Mesoamericano, ocorre uma pressão de seleção sobre as populações de *P. griseola* prevalentes, que conduz ao incremento de patótipos correspondentes ao acervo genético do hospedeiro, como ocorre no Brasil. Este mesmo processo ocorre nas regiões de cultivo exclusivo de feijão do *pool* gênico Andino, prevalecendo os patótipos Andinos de *P. griseola*.

Outro ponto interessante observado com as análises genéticas é o fato de o isolado C₁1, caracterizado através das inoculações nas variedades diferenciadoras como patótipo 63-63, ter sido separado do haplótipo que agrupou todos os outros isolados caracterizados como patótipo 63-63 (haplótipo 1). Apesar de esta separação ter sido baseada em uma mutação de 1 pb, isto pode ser um outro indício de que a série diferenciadora atual não é capaz de diferenciar plenamente os isolados inoculados, podendo caracterizar isolados diferentes como sendo um mesmo patótipo. Este seria um novo indício da necessidade de revisão das variedades que compõem a série diferenciadora da mancha angular.

Diversos trabalhos mostram a eficiência no uso da região ITS para o estudo de diversidade genética de fungos, pois esta região é altamente conservada na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usada para taxonomia e estudos de diversidade (GOMES *et al.*, 2002; KAUSERUD *et al.*, 2004; LUPATINI *et al.*, 2008).

BROWN *et al.* (1996) utilizando análise da região ITS e outras técnicas moleculares, conseguiram distinguir três formas de *Colletotrichum*, que causavam doença em citrus, mostrando a utilidade dos estudos envolvendo a região ITS para estudos interespecíficos. GOMES *et al.* (2002) confirmam a eficiência do estudo molecular da região ITS na caracterização, no

monitoramento e na identificação de fungos patogênicos, como um auxílio em programas que utilizam inoculações artificiais.

No trabalho desenvolvido por KAUSERUD *et al.* (2004), os autores, além de demonstrarem a utilidade da região ITS do rDNA para estudos filogeográficos, mencionam que a região é a principal marca utilizada para estudos de filogenia intra e interespecífica de espécies fúngicas. LUPATINI *et al.* (2008) trabalhando com *Scleroderma*, fungo oriundo de populações de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), também comentam sobre a utilidade da sequência da região ITS para estudos de diversidade dentro de uma espécie e entre espécies distintas de fungos.

Os resultados mostraram que a técnica de sequenciamento direto do produto do PCR da região ITS1-5,8S-ITS2 é eficiente para estudos de diversidade genética entre isolados de *P. griseola*, sendo capaz de distinguir os dois *pools* gênicos da espécie. Esta ferramenta requer quantidades mínimas de DNA e apresenta alta confiabilidade nos resultados, permitindo o monitoramento de isolados específicos e possibilitando determinar o *pool* gênico de populações do patógeno. No entanto, pôde-se observar a existência de apenas 5 mutações entre os 48 isolados analisados, o que impossibilita estudos mais aprofundados, como a filogeografia molecular de *P. griseola*. Para este propósito, verifica-se a necessidade de um maior número de sequências da região ITS analisadas ou, o que é mais provável, de outras sequências gênicas, para que, através das mutações existentes, os dados possam ser confrontados e os resultados possam ser alcançados.

Portanto, o estabelecimento do processo de co-evolução entre *Phaseolus vulgaris* e *Pseudocercospora griseola* e a verificação da existência de dois *pools* gênicos de cada uma das espécies sugere a possibilidade de incorporar genes de resistência de um acervo genético de feijão em outro; no entanto, para a implementação desta estratégia no desenvolvimento de novas cultivares resistentes, é necessário conhecer a estrutura genética das populações do patógeno em cada região de interesse.

4. CONCLUSÕES

A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de *P. griseola* pelos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 gerou um fragmento único de aproximadamente 530 pb.

A região ITS1-5,8S-ITS2 foi propícia para os estudos de diversidade genética entre os isolados de *P. griseola*, possibilitando a distinção dos *pools* gênicos: Andino (*P. griseola* formae *griseola*) e Mesoamericano (*P. griseola* formae *mesoamericana*).

Cinco haplótipos foram distinguidos através da existência de cinco mutações. Houve a formação de dois haplogrupos: o Andino, que englobou dois haplótipos e o Mesoamericano, que englobou três haplótipos.

Todos os isolados oriundos do Estado de Minas Gerais, Brasil pertencem ao *pool* gênico Mesoamericano, o que comprova a existência de co-evolução entre *Phaseolus vulgaris* e *Pseudocercospora griseola*, já que no Brasil predomina o cultivo de feijão do *pool* gênico Mesoamericano. Este fato, também comprovado pelas inoculações artificiais nas variedades diferenciadoras.

Os resultados indicam que os isolados capturados no GenBank que não possuem informações acerca do *pool* gênico (DQ289801; DQ289802; DQ289818), possivelmente, pertencem ao acervo Andino de *P. griseola*.

O isolado C₁1, caracterizado, através das inoculações artificiais na série diferenciadora da mancha angular, como patótipo 63-63, não foi agrupado no mesmo haplótipo que contém outros isolados caracterizados como patótipo 63-63. Isto pode ser outra evidência de que a série diferenciadora necessita ser revista, já que isolados diferentes podem estar sendo caracterizados como um mesmo patótipo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIOELLI, Z. I., SCHACHTMAN, D., OPHELKELLER, D. & SMITH, S. E. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycology Research**, v. 104, p. 708-715, 2000.
- BROWN, A. E., SREENIVASAPRASAD, S. & TIMMER, L. W. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v. 86, p. 523-527. 1996.
- BRUNS, T.; WHITE, T. & TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 22, p. 525-564. 1991.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** East Lansing: Michigan State University. Tese (Doutorado em Agronomia) – Michigan State University, 154p. 1987.
- CORREA-VICTORIA, F. J. **Pathogenic variation, production of toxin metabolites and isozyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.** Ph.D. thesis. Michigan State University, East Lansing. 1988.
- CROUS P. W., LIEBENBERG M. M., BRAUN, U. & GROENEWALD J. Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 163-173. 2006.
- GOMES, E. A., KASUYA, M. C. M., BARROS, E. G. & BORGES, A. C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetic of Molecular Biology**, v. 25, p. 477-483. 2002.
- GUZMÁN, P., GEPTS, P., TEMPLE, S., GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* Isolates with Polymerase Chain Reaction and Group-Specific Primers. **Plant Disease**, v. 83, p. 37-42. 1998.
- GUZMAN, P., GILBERTSON, R. L., NODARI, R., JOHNSON, W. C., TEMPLE, S. R., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A. B. C. & GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 600-607. 1995.
- JESUS JR., W. C., DO VALE, F. X. R., COELHO, R. R., HAU, B., ZAMBOLIN, L., COSTA, L. C. & BERGAMIN FILHO, A. Effects of angular leaf spot and rust on yield losses of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 91, p. 1045-1053. 2001.
- KAUSERUD, H., HÖGBERG, N., KNUDSEN, H., ELBORNE, S. A. & SCHUMACHER, T. Molecular phylogenetics suggest a North American link

- between the anthropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3137-3146. 2004.
- KOLLIKER, R., KRAEHEBUEHL, R., BOLLER, B. & WIDMER, F. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *Graminis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 109-119. 2006.
- LUPATINI, M., MELLO, A. H. de & ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de *Sclerotinia* UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- Maiden. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. spe, p. 2677-2682. 2008.
- MAHUKU, G. S., JARA, C., CUASQUER, J. B. & CASTELLANOS, G. Genetic Variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its Implications for Resistance Breeding of Common Bean. **Plant Pathology**, v. 51, p. 94-604. 2002.
- MARQUES, E. K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas, ULBRA, 372p. 2003.
- MZUKU, W. A. B., SAKA, V. W., MBALULE, J. C., KAMWANBA, S. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) germplasm against angular leaf spot and some root knot nematode (*Meloidogyne*) species in Malawi. **Zimbabwe Journal Agriculture Research**, v. 28, p. 15-21. 1990.
- OROZCO, S. C. & ARAYA, C. M. F. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 589-593. 2005.
- PASTOR-CORRALES, M. A. & JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, p. 15-22. 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A., JARA, C. E. & SINGH, S. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 103, p.161-171. 1998.
- PYNDJI, M. M. **Variabilité pathogénique de *Phaeoisariopsis griseola* dans la region des Grands Lacs**. In: NYABYENDA, P. & SCHEIDEGGER, U. (Eds.). Actes du sixieme Séminaire Regional sur l' Amélioration du Haricot dans la region des Grands Lacs. Kigali, Rwanda: CIAT, 76p, (African Workshop Series, 17). 1991.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 74, p. 5463-5467. 1977.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596–1599. 2007.

TRUTMANN, P. & PYNDJI, M. M. Partial replacement of local common bean mixtures by high yielding angular leaf spot resistant varieties to conserve local genetic diversity while increasing yield. **Annual Applied Biology**, v. 125, p. 45-52. 1994.

WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, New York, Academic Press, p. 315-322. 1990.