

MILLER DA SILVA LEHNER

**ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum*
EM FEIJOAIS DE MINAS GERAIS**

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

Viçosa
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

MILLER DA SILVA LEHNER

**ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum*
EM FEIJOAIS DE MINAS GERAIS**

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

APROVADA: 25 de julho de 2011.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Co-orientador)

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior
(Co-orientador)

Pesq. Rogério Faria Vieira

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Orientador)

Aos meus pais, Osvaldo e Elzeli

A minha noiva, Alice

Ao meu irmão Matheus

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), pela infraestrutura disponibilizada para a realização de parte desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao professor e orientador, José Eustáquio de Souza Carneiro, pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança durante esses anos.

Aos pesquisadores, Hudson Teixeira, Trazilbo José de Paula Júnior e Rogério Faria Vieira, pelos ensinamentos desde o início da graduação, pela amizade e por todo apoio que sempre me foi dado.

Ao professor e co-orientador, Eduardo Mizubuti, pela confiança, paciência, pelas importantes sugestões e pelo grande aprendizado que obtive ao fazer parte de sua equipe nesses últimos meses.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos (BIOPOP), em especial a Robson e Braz pela ajuda durante a realização desse trabalho.

Aos funcionários e estagiários da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG-UREZM), pela ajuda e agradável convívio.

Aos funcionários e colegas do Programa Feijão da UFV

Aos meus pais, Osvaldo e Elzeli, pelas orações, por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, pelo amor e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À minha noiva Alice, pela paciência, carinho, pelos momentos de alegria, por sofrer junto comigo nos momentos difíceis, enfim, por me fazer uma pessoa mais forte.

Ao meu irmão Matheus, pelo apoio e sinceridade.

Aos meus familiares e amigos pelo suporte em todos os momentos de minha vida.

A todos os professores que contribuíram com minha formação acadêmica desde a graduação em Agronomia, sem os quais não teria obtido êxito.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Miller da Silva Lehner, filho de Osvaldo Lehner e Elzeli de Fátima da Silva Lehner, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, no dia 20 de novembro de 1985.

Cursou o primário na Escola Estadual Madre Santa Face, em Viçosa, Minas Gerais.

De 1997 a 2003, cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Effie Rolfs, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2005, iniciou o curso superior em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), colando grau em janeiro de 2010 como Engenheiro Agrônomo.

Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa em julho de 2011.

ÍNDICE

RESUMO -----	vii
ABSTRACT -----	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL -----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	2
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	8
3.1 AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO -----	8
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA -----	9
3.3 GENOTIPAGEM COM MARCADORES SSR -----	10
3.4 ANÁLISE DOS DADOS -----	10
4. RESULTADOS -----	12
5. DISCUSSÃO -----	18
6. CONCLUSÕES -----	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	24

RESUMO

LEHNER, Miller da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoads de Minas Gerais.** Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Trazilbo José de Paula Júnior e Hudson Teixeira

O conhecimento sobre a estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* é importante para direcionar as estratégias de controle do mofo-branco do feijoeiro, principalmente o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes ao patógeno. Objetivou-se estudar a estrutura genética das populações de *S. sclerotiorum* em lavouras de feijão em Minas Gerais. Analisaram-se 127 isolados provenientes de quatro regiões produtoras de feijão (subpopulações) em Minas Gerais quanto ao polimorfismo identificado por oito marcadores microssatélites. Houve alta diversidade genética, com maior parte da variação decorrente de diferenças entre indivíduos dentro das subpopulações. Identificaram-se 65 haplótipos, sendo 49 representados por um único isolado e 59 alelos. Não houve evidência de acasalamento aleatório nas subpopulações. Maior fração clonal foi registrada na subpopulação da Zona da Mata. A população está moderadamente estruturada. Contudo, não houve diferenciação genética entre as subpopulações do Noroeste, Zona da Mata e Triângulo Mineiro. Houve diferença da subpopulação Sul em relação às demais. Pela análise de agrupamento detectou-se a existência de seis grupos, com a presença de imigrantes entre eles. A maioria dos isolados da subpopulação Sul constituiu um único grupo. Nos outros grupos houve mistura de indivíduos das diferentes subpopulações. A alta variabilidade genética observada nas populações de *S. sclerotiorum*, implica em maiores cuidados na seleção de materiais resistentes ao mofo branco. O processo de seleção deve ser realizado em diferentes regiões de Minas Gerais a fim de minimizar os riscos de suplantação de resistência.

ABSTRACT

LEHNER, Miller da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean producing areas of Minas Gerais.** Adviser: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Trazilbo José de Paula Júnior and Hudson Teixeira.

Knowledge about the genetic structure of the population of *Sclerotinia sclerotiorum* can help decide the most adequate white mold management strategies, especially the development and use of resistant cultivars. The objective of this work was to study the genetic structure of populations of *S. sclerotiorum* on bean crops in Minas Gerais. We quantified the genetic variability of 127 isolates from four bean-producing regions (subpopulations), based on eight microsatellite markers. There was high genetic variability, with most variation due to differences among individuals within subpopulations. We identified 59 alleles and 65 haplotypes, with 49 haplotypes represented by a single isolate. There was no evidence of random mating in the subpopulations. Highest clonal fraction was recorded for the Zona da Mata subpopulation. The total population is moderately structured. However, there was no genetic differentiation between subpopulations of Noroeste, Zona da Mata, and Triângulo. However, all three subpopulations differed from that of Sul. Six clusters of isolates were detected, with evidence of immigrants among them. Most of the isolates from Sul subpopulation constituted a single group. In other groups there was mixing of individuals from other subpopulations. The high genetic variability observed in the population of *S. sclerotiorum* warns for greater care in the selection of bean genotypes resistant to white mold. The selection process should be performed in different regions of Minas Gerais in order to minimize the risk of supplanting resistance.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) A produtividade média no Brasil é de cerca de 900 kg/ha (CONAB, 2009/2010). Em Minas Gerais, Estado segundo maior produtor nacional, o rendimento médio do feijoeiro nas três épocas de plantio, na safra de 2009/2010, foi de 1453 kg/ha (Companhia Nacional de Abastecimento, 2010), acima da média nacional, mas em patamar ainda considerado baixo.

A ocorrência de doenças está entre os principais fatores responsáveis por essa baixa produtividade (Paula Júnior *et al.* 2008). Dentre elas, destacam-se as causadas por fungos habitantes do solo (Paula Júnior e Zambolim 2006). Estes diferentemente daqueles que afetam a parte aérea, podem sobreviver por longos períodos sem a presença de restos culturais ou de hospedeiros alternativos (Paula Júnior *et al.* 2008).

O mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é considerado, atualmente, a doença mais destrutiva dos feijoeiros irrigados do país, principalmente em monocultivos sucessivos na mesma área, nas safras de outono-inverno (Valarini e Spadotto 1995; Paula Júnior *et al.* 2004). Há muitos desafios para o estabelecimento de práticas efetivas de manejo do mofo-branco. O controle químico por meio de fungicidas é eficiente (Paula Júnior e Zambolim 2006), mas o custo pode ser alto para muitos agricultores. Vale salientar que o patógeno pode infectar mais de 400 espécies vegetais (Purdy 1979; Boland e Hall 1994), incluindo plantas daninhas, e pode produzir estruturas de sobrevivência que se mantêm viáveis no solo por vários anos (Cook *et al.* 1975; Adams e Ayers 1979; Steadman 1983). Portanto, qualquer medida de controle adotada de forma isolada tenderá ao insucesso.

A alternativa mais viável para o controle do mofo-branco do feijoeiro seria o desenvolvimento e uso de cultivares tolerantes e/ou resistentes. No entanto, o êxito dos programas de melhoramento visando o desenvolvimento dessas cultivares pressupõe considerar a variabilidade do hospedeiro e patógeno. Logo compreender a estrutura genética da população de *S. sclerotiorum* é epidemiologicamente importante e tem implicações diretas no manejo da doença (McDonald e Linde 2002).

O objetivo foi estudar a estrutura genética de *S. sclerotiorum* nas áreas produtoras de feijão em Minas Gerais.

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- i) Mensurar a variabilidade existente entre e dentro das subpopulações;
- ii) Determinar como a variabilidade genética da população do patógeno está distribuída nas regiões produtoras de feijão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *S. sclerotiorum* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Discomycetes*, ordem *Leotiales*, família *Sclerotiniaceae*, gênero *Sclerotinia* (Bolton *et al.* 2006). O fungo está amplamente distribuído (Purdy 1979) e quando em ambiente favorável, o patógeno é capaz de infectar folhas, flores, vagens, sementes, hastes e frutos. Há uma gama extensa e diversa de hospedeiros, incluindo culturas agrícolas importantes, como soja, algodão, alface, repolho, batata, tomate industrial, girassol, amendoim e ervilha (Boland e Hall 1994; Hartman *et al.* 1999; Purdy 1979), além de plantas daninhas, como picão, carrapicho, caruru, mentrasto e vassoura (Paula Júnior e Zambolim 2006). Segundo Bolton *et al.* (2006), nos Estados Unidos as perdas anuais em decorrência do mofo-branco ultrapassam os 200 milhões de dólares.

Na ausência de hospedeiro suscetível, o fungo pode persistir por longo período no solo, por meio de estruturas de resistência de formato irregular e coloração escura, conhecidas como escleródios. Estas, a princípio apresentam coloração branca e, posteriormente, tornam-se negras e duras. Podem sobreviver no solo por mais de 10 anos e são altamente resistentes a substâncias químicas, calor seco de até 60°C e congelamento (Coley-Smith e Cooke 1971).

A germinação dos escleródios pode ser miceliogênica, com a produção de hifas, ou carpogênica, com a produção de apotécios. Para germinar carpogenicamente, os escleródios necessitam de período de condicionamento no solo (Schwartz e Steadman 1978; Hunter *et al.* 1984; Huang e Kozub 1991; Ferraz *et al.* 1999). Os apotécios constituem o estágio sexual do fungo. Estes podem originar-se de escleródios enterrados no solo até 5 cm de profundidade. Cada escleródio pode produzir de um a 20 apotécios, em cada um dos quais são formados ascos, com oito

ascósporos cada. Durante o período funcional de 5 a 10 dias, cada apotécio pode liberar mais de dois milhões de ascósporos (Schwartz e Steadman 1978).

Nos últimos anos, como resultado de inovações tecnológicas aplicadas ao processo produtivo, doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo têm se destacado (Paula Júnior *et al.* 2004; Paula Júnior e Zambolim 2006). O cultivo de plantas hospedeiras em sucessão, o uso de grãos como sementes, a alta densidade de plantas, a fertilização excessiva e o cultivo no outono-inverno com pivô-central criaram um ambiente altamente favorável ao desenvolvimento de fungos de solo, como *S. sclerotiorum*.

Os sintomas iniciais da doença ocorrem em reboleiras nas lavouras, principalmente nos locais com alta densidade de plantas e/ou crescimento vegetativo abundante. Geralmente, o sintoma inicial é a murcha da planta. Depois, são observadas manchas encharcadas nas folhas, hastes e vagens, seguidas por crescimento de micélio branco e “cotonoso”, o que originou a denominação “mofobranco”. Com o progresso da doença, são formados escleródios facilmente visíveis a olho nu, dentro do tecido infectado e sobre ele (Hall e Steadman 2005). Os tecidos doentes tornam-se secos, esbranquiçados, leves e quebradiços. As sementes infectadas são pequenas, sem brilho, descoloridas, enrugadas e mais leves, ou podem não apresentar qualquer alteração visível. Segundo Steadman (1975), *S. sclerotiorum* pode ser isolado de menos de 0,5% de sementes assintomáticas e de cerca de até 12% de sementes com algum sintoma ou sinal da doença.

As infecções primárias são iniciadas principalmente pelos ascósporos, os quais necessitam de água livre e de uma fonte exógena de energia, geralmente pétalas de flores senescentes e/ou tecidos lesionados caídos no solo ou ainda retidos nas plantas (Abawi e Grogan 1975; Steadman 1979). Folhas e hastes contaminadas com ascósporos em contato com o solo úmido, assim como folhas e hastes em contato com escleródios na superfície do solo também podem iniciar a doença. As infecções secundárias decorrem do contato entre plantas doentes e saudáveis.

Nos tecidos colonizados pelo patógeno ocorre a produção de escleródios, que ao caírem no solo, podem ser incorporados, juntamente com os restos da cultura, nas operações de aração e gradagem. No solo, os escleródios são capazes de sobreviver por vários anos na ausência das espécies hospedeiras (Cook *et al.* 1975; Steadman 1983). Em condições favoráveis (10-25°C), os escleródios presentes na camada

superior do solo germinam e produzem os apósporos (Abawi e Grogan 1979). Os ascósporos, principal inóculo inicial do mofo-branco, podem sobreviver por até 12 dias no campo (Abawi e Grogan 1975). Eles podem ser carregados via correntes aéreas para diferentes partes da planta, para outras plantas na mesma área, e ainda, para cultivos próximos.

Propágulos do fungo podem ser introduzidos nas áreas isentas e disseminados a longas distâncias por meio de sementes infectadas por micélio ou por lotes contaminados com escleródios (Napoleão *et al.* 2001; Vieira e Paula Júnior 2006). Sementes infectadas por *S. sclerotiorum* podem apodrecer e não germinar e sobre as sementes podem ser formados escleródios, ou seja, micélio dormente nas sementes pode disseminar o fungo (Tu 1989) e contribuir para o acúmulo de inóculo no solo e aumento da intensidade da doença nas áreas produtivas (Juliatti *et al.* 2001).

É importante evitar a entrada do patógeno em áreas indenens, pois uma vez presente torna-se muito difícil erradicá-lo (Paula Junior *et al.* 2006). Deve-se sempre usar sementes com boa qualidade sanitária e limpar máquinas e implementos agrícolas provenientes de áreas infestadas antes de serem empregados em áreas isentas da doença. Onde já ocorre a doença, além do controle químico, recomenda-se também adotar o sistema de plantio direto, menor densidade de plantas e a utilização de cultivares de porte ereto (Paula Júnior *et al.* 2006). Estes propiciam maior insolação e circulação de ar entre as plantas, o que cria um ambiente menos favorável ao patógeno.

Os principais cultivares de feijão são suscetíveis, portanto, embora custoso, o principal método de controle da doença tem sido a utilização de fungicidas. Fontes de resistência fisiológica (restrição ao desenvolvimento de lesões em tecidos da haste) têm sido identificadas a partir de inoculações em casa de vegetação (Miklas *et al.* 1998, Miklas *et al.* 2006). A combinação desse tipo de resistência com mecanismos de escape, como por exemplo, o porte ereto das plantas, parece ser boa estratégia para diminuir as perdas em decorrência da doença.

Marcadores microssatélites tem boa precisão e reprodutibilidade, por isso têm sido muito utilizados em estudos genéticos. O alto nível de variação detectado por esses marcadores aumenta a resolução do estudo de genealogia e diversidade genética, reduzindo o número de marcadores requeridos para distinguir os genótipos (Caixeta *et al.* 2009).

Diversidade é composta de dois aspectos, riqueza e equitabilidade. Riqueza é o número de genótipos presentes em uma população. Equitabilidade diz respeito a como os genótipos estão distribuídos dentro das populações. Em populações de microrganismos, índices de diversidade gênica e genotípica são necessários para estimar a diversidade genética (Grunwald *et al.* 2003). Diversidade gênica é função do número e frequências de alelos em cada loco. Embora múltiplos locos sejam geralmente usados, diversidade é estimada para cada loco, separadamente. Diversidade genotípica é função do número e frequência de combinações alélicas e pode ser feita entre locos diferentes (Milgroom 1996). Os índices de diversidade genotípica mais utilizados são N1 (Hill), H' (Shannon-Wiener) e, principalmente, o G (Stoddart e Taylor 1988) (Grunwald *et al.* 2003).

McDonald e Linde (2002) definem estrutura genética como a quantidade e distribuição da variação existente entre e dentro das populações. É consequência da interação entre as cinco forças evolutivas (mutação, migração, seleção, deriva e recombinação). O conhecimento da estrutura genética poderá mensurar o potencial evolutivo de uma população. Fitopatógenos com grande potencial evolutivo têm maior risco de suplantar a resistência existente em alguns cultivares, ou mesmo, desenvolver resistência a fungicidas ou antibióticos.

As populações naturais de *S. sclerotiorum* ocorrem como um mosaico de clones, que mantêm entre si a tendência do isolamento genético (Kohn *et al.* 1991; Anderson e Kohn 1995; Cubeta *et al.* 1997). Análises filogenéticas de clones usando sequências de DNA de quatro regiões geográficas indicaram populações predominantemente clonais, sem evidências de que trocas genéticas atuais ou recombinação entre genótipos individuais tenham ocorrido (Carbone *et al.* 1999). Entretanto, Kohn 2001, sugeriu tratar-se de espécie geneticamente heterogênea. A população mundial de *S. sclerotiorum* é composta de subpopulações, algumas das quais são mais velhas ou permaneceram isoladas ou endêmicas; outras são mais recentes ou altamente dispersas. O mesmo autor verificou que amostragens realizadas em lavouras de regiões de clima subtropical revelaram maior recombinação entre indivíduos do que em lavouras em clima temperado. Poucos genótipos clonais de *S. sclerotiorum* predominaram em todas as amostras.

Atallah *et al.* (2004), por meio de índices de associação e desequilíbrio de ligação, notaram indícios de recombinação sexual em duas regiões produtoras de

batata no Estado de Washington, EUA. A presença de diferentes grupos de compatibilidade micelial (MCG) em isolados oriundos de um único apotécio substanciou ainda mais essa observação. Entretanto, ao analisar todas as populações como apenas uma, rejeita-se a hipótese de recombinação sexual na população. No total 82 MCG's foram identificados, 64 deles compostos por apenas um isolado. O número de alelos por loco variou de 2 a 5, dos 25 primers utilizados, apenas 11 exibiram polimorfismo.

A estrutura genética de uma população de 276 isolados de *S. sclerotiorum*, coletados em quatro regiões (populações regionais) produtoras de canola no Irã, foi estudada por Hemmati *et al.* (2009). Um escleródio retirado de cada planta foi considerado como um isolado, e a uniformidade genética de cada isolado foi obtida através da técnica de ponta de hifa. Seis primers microssatélites fluorescentes foram utilizados nas análises. O número de alelos obtidos variou de 3 a 8. Os resultados indicaram alto nível de clonalidade e 80 haplótipos foram identificados, sendo que 7,5% deles ocorreram mais de 10 vezes, embora nenhum tenha sido detectado nas quatro populações. A diversidade genotípica foi considerada moderada e variou de 12 a 22%. Apenas 4% da variação genética total foram devidos a variações entre as populações, ou seja, a grande maioria da variação (96%) foi detectada dentro das populações regionais. As populações foram caracterizadas por predominância de estrutura clonal. Entretanto, baseado em testes de acasalamentos aleatórios, houve indícios de que recombinação gamética ocorreu nas populações.

Um estudo conduzido na Austrália comparou isolados coletados em flores infectadas com ascósporos com isolados coletados em lesões no caule de canola, em anos diferentes (Sexton *et al.* 2006). Foram identificados 55 haplótipos. Menos de 10% da variação foi atribuída à diferença entre os dois anos. O desequilíbrio de ligação mensurado indicou a ocorrência tanto de reprodução clonal quanto sexual. Os resultados sugeriram que não existiu uma divisão genética entre os isolados que colonizaram as flores e aqueles presentes nos caules.

Dez marcadores SSR foram usados para caracterizar uma população de 79 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em campos de feijão no cerrado brasileiro (Gomes *et al.* 2011). Alta diversidade genética foi encontrada. O índice de diferenciação genética das populações (F_{st}) foi alto (0,29) e a análise de variância molecular detectou alta variação (71,2%) dentro das populações de *S. sclerotiorum*

analisadas. A variação genética de populações de *S. sclerotiorum* da Nova Zelândia foi estudada com a técnica “southern blotting” (Carpenter *et al.* 2009). Houve alto nível de variação e ocorrência de fluxo gênico (migração) entre as populações de *S. sclerotiorum* analisadas.

A variabilidade genética de 40 isolados brasileiros de *S. sclerotiorum* coletados em diferentes hospedeiros (feijão, tomate, pimenta, lentilha, alface, girassol, cenoura, rabanete canola e repolho) foi estudada com marcadores RAPD. Pela análise de agrupamento (UPGMA, distancia genética de Jaccard) não houve relação da região geográfica ou hospedeiro com os grupos. A alta variabilidade genética entre os isolados indicou ocorrência de reprodução sexual. Houve 99 % de variação entre indivíduos, cultura hospedeira não teve efeito significativo (Litholdo Júnior *et al.* 2011).

Em estudo recente Ekins *et al.* (2011) utilizaram marcadores RAPDs, RFLPs e testes de compatibilidade micelial para estudar a estrutura genética de *S. sclerotiorum* em lavouras de girassol na Austrália. Com base na análise de 40 isolados obtidos de 10 escleródios, os autores concluíram que há apenas um genótipo de *S. sclerotiorum* por escleródio. Também não houve diferença entre genótipos oriundos de ascósporos pertencentes a uma mesma asca. Foi observado também que o mesmo genótipo infecta flores (proveniente de ascósporo) e caules (proveniente de escleródio) o que indica não haver especialização entre genótipos provenientes de ascósporos ou escleródios. Não houve diferenciação entre as populações e a maior parte da variação foi atribuída à variabilidade dentro das populações.

Até o momento, os estudos sobre a estrutura genética de populações de *S. sclerotiorum* têm reportado alta diversidade genética em regiões tropicais (Gomes *et al.* 2011; Litholdo Júnior *et al.* 2011; Sexton *et al.* 2006; Sexton e Howlett 2004). Populações clonais foram detectadas principalmente em regiões temperadas (Kohli *et al.* 1992; Cubeta *et al.* 1997). Apesar de alta diversidade, acasalamento aleatório não é característica das populações, embora haja indícios de recombinação (Hemmati *et al.* 2009; Sexton *et al.* 2006; Atallah *et al.* 2004). Em muitos trabalhos observou-se compartilhamento de haplótipos (Hemmati *et al.* 2009; Cubeta *et al.* 1997; Kohli *et al.* 1995). A migração de indivíduos (fluxo gênico) que pode ocorrer tanto por escleródios associados às sementes ou ascósporos por correntes de ar (Abawi e

Grogan 1979; Kohli *et al.* 1992), parece ser característica de populações de *S. sclerotiorum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e isolamento

As amostras do patógeno foram constituídas de escleródios formados em feijoeiros com sintomas de mofo-branco em lavouras localizadas em quatro regiões do Estado de Minas Gerais (Figura 1). Um total de 127 isolados foi coletado em 19 localidades nas regiões Noroeste, Triângulo Mineiro/Alto do Paranaíba, Zona da Mata e Sul de Minas Gerais. O tamanho das amostras variou de 19 (Triângulo Mineiro) a 43 (Noroeste de Minas) (Tabela 1). Juntas, essas regiões são responsáveis por aproximadamente 74 % da produção de feijão em Minas Gerais (IBGE 2009). Maior parte da produção (38,24 %) vem da região Noroeste. A coleta de escleródios nessa região foi feita em grandes áreas de cultivo, sob pivô central, onde se cultivava feijão do grupo carioca. Situação diferente da Zona da Mata, onde as amostras do patógeno foram obtidas em pequenas lavouras, sem irrigação, todas cultivando feijão vermelho.

Para a análise de distribuição geográfica dos isolados, informações de latitude e longitude do local de coleta foram registradas com aparelho portátil de sistema de posicionamento global (GPS). Sempre que possível descritores dos locais de coleta (tipo de vegetação, tipo de solo, pluviometria média, temperatura média etc.), assim como informações sobre o manejo da cultura (cultivar, agrotóxicos, irrigação etc.) foram registrados.

Os escleródios foram imersos em solução de etanol 70% por 3 min e de hipoclorito de sódio 1%, também por 3 min. Em seguida, eles foram imersos em água esterilizada e transferidos, assepticamente, para 20 mL de meio batata-dextrose-água (BDA – Acumedia®), suplementado com 200 mg/L de cloranfenicol, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As placas com os escleródios foram mantidas em B.O.D a 23 °C no escuro, por 7 a 10 dias.

Para assegurar a manutenção da identidade genética de cada isolado, após a germinação dos escleródios e formação da colônia, segmentos únicos de

extremidades de hifas de cada isolado foram transferidos assepticamente para novas placas com BDA. As culturas foram mantidas a 23°C no escuro, por até 15 dias, sendo então preservadas a 4°C, também no escuro. Em todas as análises realizadas neste trabalho utilizaram-se culturas oriundas de extremidade de hifas.

3.2 Extração de DNA

A biomassa fúngica foi obtida pelo crescimento micelial em meio líquido sintético (10 g de sacarose; 2 g de asparagina; 2 g de extrato de levedura; 1 g KH_2PO_4 ; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,44 mg de ZnSO_4 ; 0,48 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; e 0,36 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 1L H_2O) a 23 °C, no escuro, por seis a 10 dias. O micélio obtido foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 24 h seguido da extração de DNA.

As extrações de DNA foram realizadas seguindo o método CTAB (Doyle e Doyle 1990), com modificações. A biomassa foi macerada em nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz. Posteriormente, a massa micelial foi transferida para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e adicionou-se 750 μL de solução CTAB 2X e 15 μL de 2- β -mercaptoetanol por tubo. Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C, por 30 min. Em seguida adicionou-se 500 μL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico a cada tubo (25:24:1 v/v), homogeneizados e centrifugados a 14.000g, por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL com adição de 500 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 14.000g, por 5 min. Alíquotas de 360 μL do sobrenadante foram transferidas para novos tubos, aos quais foi adicionado 324 μL de isopropanol resfriado. Estas suspensões foram mantidas a -20°C, por 10 min, logo após foram centrifugadas a 14.000 g, por 7 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 70%. Após o descarte do etanol, os tubos foram postos a secar em temperatura ambiente. O *pellet* final foi ressuscitado a 37°C, por 2 h, em 50 μL de solução tampão (1 mL tris-HCl (1M); 200 μL EDTA (500 mM); 98,8 mL H_2O). A qualidade e concentração do DNA extraído foram mensuradas por espectrofotometria (Nanodrop), e a concentração final ajustada a 20 ng/ μL .

3.3 Genotipagem com marcadores SSR

Foram utilizados oito locos SSR descritos por Sirjusingh e Kohn (2001). Esses locos foram utilizados para a caracterização de populações de *S. sclerotiorum* de diferentes locais: Brasil (Gomes *et al.* 2011), Irã (Hemmati *et al.* 2009), Turquia (Mert-Tu` rk *et al.* 2007), Austrália (Sexton e Howlett 2004) e, principalmente, na América do Norte (Sirjusingh e Kohn 2001; Atallah *et al.* 2004).

Para permitir a análise de mais de um loco ao mesmo tempo, cada *primer* foi marcado com um dos três corantes fluorescentes 6-FAM, NED e HEX. Os seguintes *primers* e suas respectivas fluorescências foram: 7-2:AF377902 (NED), 9-2:AF377903 (6-FAM), 12-2:AF377906 (HEX), 13-2:AF377907 (HEX), 36-4:AF377914 (NED), 92-4: AF377919 (6-FAM), 106-4:AF377921 (HEX) e 114-4:AF377923 (6-FAM). As reações de PCR multiplex foram realizadas com kit específico para primers microssatélites (Typeit® Microsatellite Kit, QIAGEN, USA), totalizando 9 µL de reação. As reações de PCR multiplex foram feitas nestas condições: um ciclo a 95 °C por 5 min, seguido por 95 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 90 s e 72 °C por 30 s, e 60 °C por 30 min.

A concentração do produto da PCR foi mensurada em espectrofotômetro e ajustada para aproximadamente 25 ng por loco. Posteriormente, 1 µL do produto da PCR foi misturado a 8 µL de formamida deionizada Hi-Di™ (Applied Biosystems, USA) mais 1 µL de um marcador de 600 bp marcado com um fluoróforo (rox). Os fragmentos foram então separados por um sistema de capilaridade em sequenciador ABI Prism® 3100. O tamanho das bandas foi mensurado automaticamente por meio do programa GeneMarker 1.91.

3.4 Análise dos dados

A frequência alélica por loco de cada população e a diversidade gênica de todos os locos e de cada subpopulação foram calculadas por meio do programa Genepop 4.1 (Rousset 2008). Com o mesmo programa, o teste da razão de verossimilhança (teste G^2) foi realizado para testar o equilíbrio gamético (H_0 =população em equilíbrio) de cada loco e de cada par de populações. O teste é baseado na razão entre duas funções de máxima verossimilhança: uma definida pelas

frequências genótípicas esperadas no equilíbrio (L_0) e a outra pelas frequências genótípicas observadas (L_1) (Cruz *et al.* 2011).

Alguns índices de riqueza, diversidade e equitabilidade foram calculados para estimar a diversidade genética das populações de *S. sclerotiorum*. A riqueza genotípica $E(gn)$, foi estimada usando curvas de rarefação (Grünwald *et al.* 2003) para diminuir o erro devido a diferenças no tamanho das subpopulações (n). Para mensurar a diversidade genotípica, empregaram-se os índices NI (Hill 1973), G (Stoddart e Taylor 1988) e H' (Shannon-Wiener 1949) e os respectivos intervalos de confiança calculados pelo programa R (R Development Core Team 2008), com 1000 replicações *bootstrap*. Como as subpopulações possuem “ n ” diferentes, os índices foram escalonados para o número de genótipos de cada subpopulação (Grunwald *et al.* 2003). Para comparar a equitabilidade entre as populações, foi calculado (sem escalonamento) o índice E_5 ($E_5 = G-1/N_1-1$). A fração clonal de cada população foi calculada com base na frequência dos clones de cada população, $n-G/n$, em que n é o tamanho da amostra e G o número de genótipos (Zhan *et al.* 2002).

A diferenciação genética entre as populações foi comparada por meio da estatística θ (Weir e Cokerham 1984), equivalente ao F_{ST} de Wright para dados haplóides, calculada com o programa Multilocus 1.3 (Agapow e Burt 2003), com *bootstrap* de 1000 re-amostragens. O valor encontrado em cada par de subpopulações indica se há diferenciação genética entre elas. Da mesma forma, o índice de associação I_A , e r_d foram calculados para testar a hipótese de equilíbrio gamético, ou seja, verificar se há indícios de acasalamento aleatório entre os indivíduos. Para isso, as estimativas de desequilíbrio de ligação (I_A e r_d) foram comparadas com as esperadas no caso de acasalamentos ao acaso (hipótese nula). O número de migrantes (Nm) também foi calculado ($F_{ST} = 1/(1+4Nm)$).

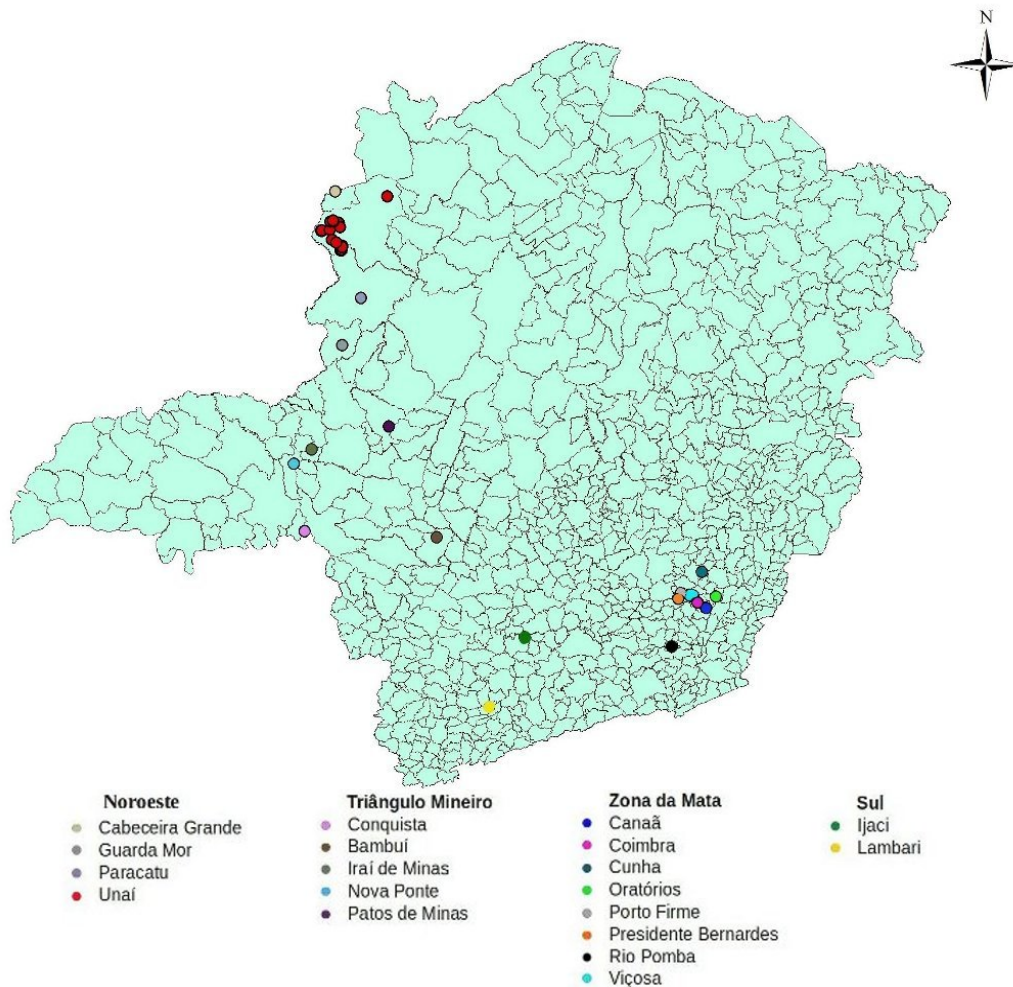
A estatística F_{ST} de Wright foi calculada (Genepop 4.1) para a população total. Para estimar a distribuição da variação genética entre e dentro das subpopulações realizou-se análise de variância molecular (AMOVA) com o programa Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010) e 1000 simulações.

Para investigar ocorrência de mistura entre as populações, a análise bayesiana de agrupamento foi realizada com o programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000). O conjunto de dados foi analisado usando o modelo de mistura, com 10.000.000 de interações “Monte-Carlo Markov Chains (MCMC)” e *burn-in* de 1.000.000. Todos

os parâmetros foram definidos com valores padrão. O número de grupos (K) variou de 1 a 10 e a análise foi repetida três vezes independentes. O maior valor da probabilidade [Ln P (D)] definiu o número de grupos.

4. RESULTADOS

Pela análise dos oito locos SSR detectaram-se 59 alelos e 65 genótipos. O número de alelos por loco variou de 3 (loco 36-4) a 13 (loco 106-4) (Tabela 2). Dos 65 genótipos, 49 foram representados por um único isolado (haplótipos únicos). Dois estiveram presentes em todas as regiões representando 27,6 % da população.



A diversidade gênica (H) foi maior no loco 12-2 (79,5%) e menor no loco 9-2 (11,8%), que apresentou polimorfismo apenas para os isolados das populações Noroeste e Triângulo Mineiro (Tabela 2). A fração clonal variou de 21 % (Triângulo

Mineiro) a 54,8% na subpopulação da Zona da Mata, onde 15 isolados foram representados por um único genótipo. O número de haplótipos compartilhados variou de 3, entre as subpopulações Noroeste e Sul e Noroeste e Triângulo, a 6, entre as subpopulações da Zona da Mata e do Triângulo Mineiro. Haplótipos compartilhados foram um indicativo de fluxo gênico entre as subpopulações. Os altos índices de equitabilidade (E_5) nas subpopulações da região Noroeste, Triângulo Mineiro e Sul indicaram que nessas subpopulações os genótipos estão mais uniformemente distribuídos em relação à Zona da Mata (Tabela 1).

Tabela 1 - Índices de diversidade, riqueza e equitabilidade para quatro subpopulações de *Sclerotinia sclerotiorum* amostradas em lavouras de feijoeiro no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Estatística	Subpopulações			
	Noroeste	Triângulo	Zona da Mata	Sul
N	43	19	42	23
n° de Haplótipos	28	15	19	18
H'	0,93 (0,86-1,01) ^a	0,97 (0,85-1,09)	0,81 (0,69-0,93)	0,97 (0,88-1,07)
N ₁	0,81 (0,66-0,95)	0,92 (0,73-1,11)	0,57 (0,41-0,73)	0,92 (0,76-1,08)
G	0,61 (0,44-0,77)	0,83 (0,64-1,01)	0,32 (0,18-0,47)	0,84 (0,68-1,00)
E(g ₁₉)	14,86	15	10,69	15,49
E ₅	0,74	0,89	0,52	0,90

N Tamanho da amostra
H' Índice de Shannon-Wiener escalonado para $\ln(g_{obs})$
N₁ Índice N₁ de Hill
G Índice de Stoddart e Taylor
E₅ Índice de equitabilidade baseado na razão entre $(G-1)/(N_1-1)$
E(g₁₉) Índice de riqueza para o menor n amostral
^a Números entre parênteses indicam o intervalo de confiança calculado a partir da abordagem de bootstrap

A subpopulação do Sul apresentou maior diversidade genotípica (índices G e N1), em relação à da Zona da Mata (Tabela 1), porém não difere das demais (Noroeste e Triângulo Mineiro). Não houve diferença de diversidade genotípica entre as quatro subpopulações baseadas no índice H' (Shannon-Wiener). Entretanto, foi detectada maior riqueza e equitabilidade nas subpopulações do Noroeste, Triângulo Mineiro e Sul (Tabela 1). A riqueza (número de genótipos) estimada com curvas de rarefação para o menor n ($E_{(g19)}$) variou de 10,7 (Zona da Mata) a 14,9 (Noroeste de Minas) (Figura 2). Contudo, os testes de associação aleatória detectaram altos níveis de desequilíbrio de ligação entre pares de locos, tanto nas subpopulações regionais, quanto na população total. Em todas as subpopulações, os valores de I_A foram significativos, sugerindo baixa ocorrência de acasalamento aleatório (Tabela 4).

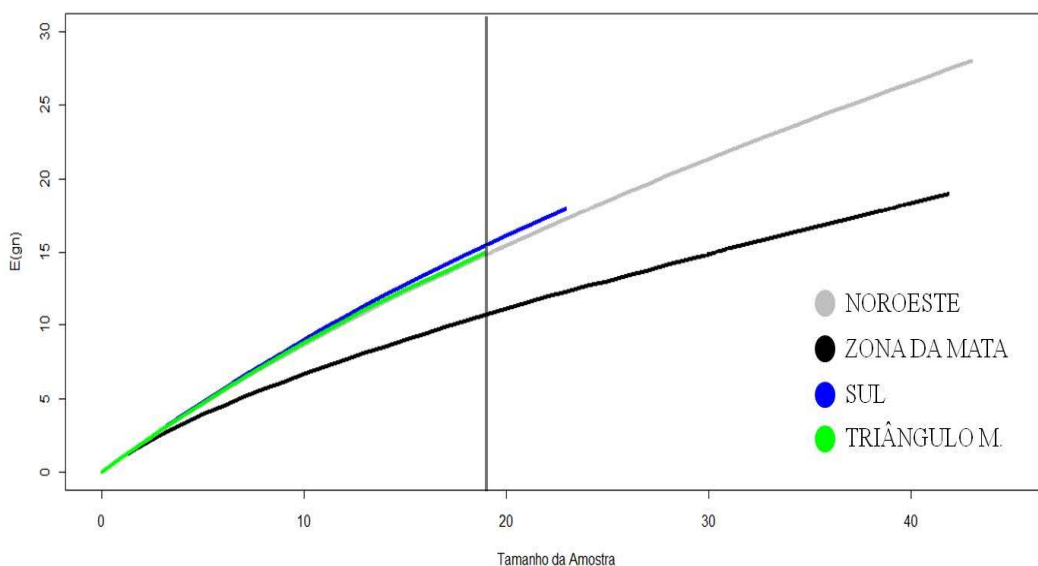


Figura 2- Riqueza estimada pelo método de rarefação $E(g_n)$, de quatro subpopulações de *Sclerotinia sclerotiorum* amostradas em lavouras de feijoeiro em Minas Gerais, Brasil. O menor tamanho amostral das quatro subpopulações amostradas, $n=19$ (linha vertical) foi usado para comparar a estimativa de riqueza entre as populações

Pela análise de variância molecular, AMOVA, estimou-se a porcentagem de variação total dentro e entre as populações, com 84,5 % da variação total devida a variações dentro das populações (Tabela 3).

Tabela 2. Número de alelos por loco e diversidade gênica por loco em cada subpopulação de *Sclerotinia sclerotiorum* usada nesse trabalho.

Locus	repetição	tam (bp)	na	diversidade gênica (H)				
				subpopulações				
				N	TM	ZM	S	T
7-2:AF377902	(GA) ₁₄	148-172	9	0,82	0,59	0,45	0,70	0,64
12-2:AF377906	(CA) ₉	211-223	7	0,82	0,81	0,73	0,86	0,79
114-4:AF377923	(AGAT) ₁₄ (AAGC) ₄	336-412	9	0,42	0,64	0,30	0,66	0,46
13-2:AF377907	(GTGGT) ₆	275-320	8	0,40	0,46	0,29	0,66	0,42
9-2:AF377903	(CA) ₉ (CT) ₉	352-416	6	0,22	0,29	0,00	0,00	0,12
106-4:AF377921	(CATA) ₂₅	484-568	13	0,75	0,71	0,34	0,70	0,60
92-4:AF377919	(CT) ₁₂	371-377	4	0,65	0,44	0,09	0,54	0,41
36-4:AF377914	CA ₆ (CGCA) ₂ CAT ₂	411-424	3	0,18	0,44	0,29	0,30	0,28

N = Noroeste, TM = Triângulo Mineiro, ZM = Zona da Mata, S = Sul, T = total da diversidade gênica em cada loco, tam = tamanho, na = número de alelos

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* coletados em lavouras de feijão no Estado de Minas Gerais.

F.V	G.L	S.Q	Componente de Variância	Porcentagem de Variação
Entre populações	3	36,79	0,34 Va	15,5
Dentro de populações	123	228,9	1,86	84,5
Total	126	265,75	2,20	

Fst: 0,15

Para a população total, o valor F_{st} de Wright foi 0,15 (Tabela 3). Estimativas para os pares de populações, baseadas na estatística θ (estimador do F_{st} de Wright) indicam grande diferenciação genética ($\theta > 0,15$) de todas as subpopulações em relação àquela do Sul de Minas (Tabela 5). No geral, não houve diferença entre as outras subpopulações. Houve diferenciação moderada entre a subpopulação do Noroeste com a da Zona da Mata ($\theta = 0,10$). Esses resultados indicam que apenas a subpopulação do Sul de Minas diferencia das demais. As outras subpopulações não estão fortemente estruturadas. O número de migrantes em cada população variou de 0,5 (Zona da Mata) a 8,3 (Noroeste) (Tabela 5).

Tabela 4- Estimativas do desequilíbrio de ligação por meio do índice de associação (I_A) e da estatística alternativa do índice de associação multilocus (r_d) entre populações de *Sclerotinia sclerotiorum* em lavouras e feijoeiro, Minas Gerais, Brasil.

População	I_A	r_d
Noroeste	1,41**	0,20**
Triângulo Mineiro	1,87**	0,27**
Zona da Mata	1,71**	0,29**
Sul	1,58**	0,27**
Total	1,81**	0,26**

** Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 5- Estimativa da diferenciação da população (diagonal superior) e número de migrantes (diagonal inferior) entre populações de *Sclerotinia sclerotiorum* em lavouras de feijoeiro, Minas Gerais, Brasil.

Populações	Noroeste	Triângulo Mineiro	Zona da Mata	Sul
Noroeste	-	0,03 ^a	0,10*	0,19*
Triangulo Mineiro	8,31 ^b	-	0,04	0,19*
Zona da Mata	2,11	5,85	-	0,33*
Sul	1,04	1,05	0,50	-

^a θ de Weir e Cokerham (Equivalente ao F_{ST} de Wright para organismos haplóides)

^b Número de migrantes (Nm) estimado por $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$

* Significativo a 1% de probabilidade

Pelo teste da razão de verossimilhança (teste G^2) detectaram-se os locos que mais contribuiriam para a diferenciação das subpopulações. De maneira geral, houve diferenciação da subpopulação Sul em relação às demais. Houve também pequena diferenciação entre as subpopulações Noroeste e Zona da Mata, significativa nos locos 7-2, 114-4, 106-4 e 92-4. Não houve diferenciação entre as populações nos locos 12-2, 9-2 e 36-4 (Tabelas 6 a 9). Devido à ausência de polimorfismo, a estatística G^2 não pode ser calculada entre as subpopulações Sul e Zona da Mata no loco 9-2.

Tabela 6- Probabilidade pelo teste da razão de verossimilhança das frequências alélicas (G^2) entre os locos 9-2: (diagonal inferior) e 106-4 (diagonal superior)

Pop	N	TM	ZM	S
N		0,00**	0,00**	0,00**
TM	0,67		0,03	0,00**
ZM	0,14	0,03		0,00**
S	0,66	0,08	NA	

** Significativo a 1%

N = Noroeste, TM = Triângulo Mineiro, ZM = Zona da Mata e S = Sul
NA = não aplicado

Tabela 9- Probabilidade pelo teste da razão de verossimilhança das frequências alélicas (G^2) os locos 114-4 (diagonal inferior) e 13-2 (diagonal superior)

Pop	N	TM	ZM	S
N		0,38	0,65	0,50
TM	0,32**		0,66	0,37
ZM	0,00**	0,03**		1,00
S	0,00**	0,00**	0,00**	

** Significativo a 1%

Tabela 8- Probabilidade pelo teste da razão de verossimilhança das frequências alélicas (G^2) entre os locos 7-2 (diagonal inferior) e 12-2 (diagonal superior)

Pop	N	TM	ZM	S
N		0,24	0,13	0,54
TM	0,25		0,32	0,17
ZM	0,00**	0,38		0,00**
S	0,00**	0,00**	0,00**	

** Significativo a 1%

N= Noroeste, TM= Triângulo Mineiro, ZM= Zona da Mata e S= Sul

Tabela 9- Probabilidade pelo teste da razão de verossimilhança das frequências alélicas (G^2) os locos 114-4 (diagonal inferior) e 13-2 (diagonal superior)

Pop	N	TM	ZM	S
N		0,37	0,01**	0,00**
TM	0,02		0,10	0,00**
ZM	0,00**	0,01**		0,00**
S	0,00**	0,00**	0,00**	

** Significativo a 1%

Pela análise bayesiana detectaram-se seis agrupamentos de indivíduos, com ocorrência de mistura de genótipos entre eles (Figura 3, painel A). O grupo 1 foi composto por isolados da região Noroeste. Houve dois indivíduos imigrantes (sinalizados com *) pertencentes à subpopulação Triângulo Mineiro (Figura 3, painel B). O grupo 2 foi composto por 95% de isolados do Sul, com apenas um imigrante do Noroeste. 73,9 % dos indivíduos do Sul foram agrupados separadamente, o que comprova que os isolados dessa região são diferentes dos das demais regiões. O

terceiro grupo foi formado principalmente (59%) por isolados da Zona da Mata, havendo 29% de imigrantes do Noroeste, 7% do Sul e 5% do Triângulo Mineiro. Nos grupos 4 e 5, observou-se mistura equilibrada de indivíduos do Noroeste, Triângulo e Zona da Mata, com apenas dois indivíduos imigrantes do Sul no quinto grupo. Por fim, o sexto grupo teve a maioria de indivíduos oriundos do Noroeste com um pouco de mistura de indivíduos das outras três regiões. De maneira geral, os isolados do Sul pertenceram a um grupo, enquanto os isolados da Zona da Mata, Noroeste e Triângulo Mineiro, eram misturados aos outros cinco grupos. O resultado é semelhante aos anteriores, que indicaram não haver diferenciação entre os indivíduos amostrados nessas três populações.

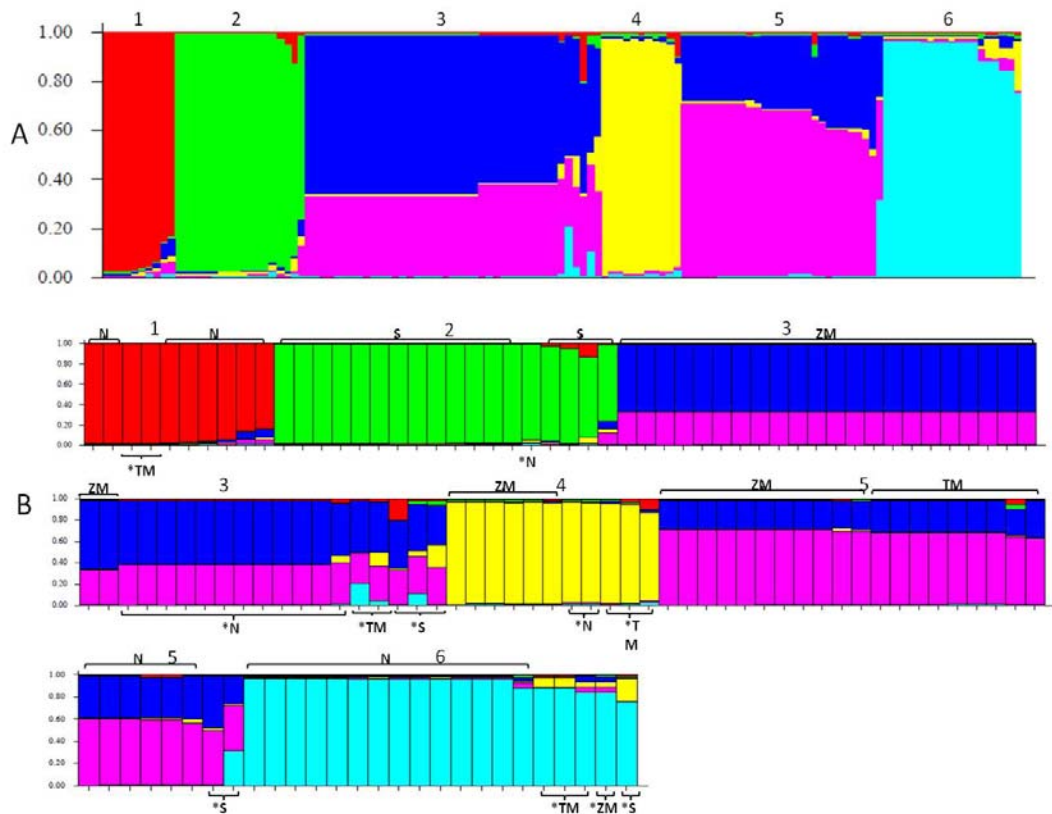


Figura 3 - Análise bayesiana de agrupamento. Painel A: grupos representados pelas diferentes cores. Painel B: ampliação do painel A, distribuição dos isolados (barras verticais) dentro dos grupos. As siglas N, TM, ZM e S se referem à região geográfica de cada isolado; Noroeste, Triângulo Mineiro, Zona da Mata e Sul de Minas, respectivamente. Os isolados marcados com * foram considerados isolados imigrantes (pertencentes à outra população).

5. DISCUSSÃO

A população de *S. sclerotiorum* apresentou alta variabilidade genética nas áreas produtoras de feijão em quatro regiões de Minas Gerais. A diversidade alélica nos locos SSR analisados para os isolados de Minas Gerais foi mais alta que a constatada em estudos realizados no Canadá (Sirjusingh e Kohn 2001), Estados Unidos (Atallah *et al.* 2004), Austrália (Sexton e Howlett 2004) e Turquia (Mert-Tu" rk *et al.* 2007). Entretanto, o número de alelos constatado recentemente na população de *S. sclerotiorum* do cerrado brasileiro foi maior que o encontrado no presente estudo. No cerrado, o número de alelos variou de seis a 18, mesmo com menor número de isolados analisados (79) (Gomes *et al.* 2011). O menor número de alelos encontrados nos mesmos oito locos SSR analisados no presente estudo sugerem que há maior diversidade gênica no cerrado em relação a Minas Gerais. Neste estudo, apenas o loco 106-4 teve maior variação alélica em relação aos isolados do cerrado. Menor número de alelos (três) foi encontrado no loco 36-4 que foi reportado como monomórfico em trabalhos anteriores nos EUA e no Canadá (Atallah *et al.* 2004, Sexton e Howlett 2004). Diferenças de práticas agronômicas, e da diversificação de hospedeiros podem interferir na diversidade encontrada nas populações de *S. sclerotiorum* (Malvarez *et al.* 2007). Houve menor riqueza e maior fração clonal na subpopulação da Zona da Mata em relação às demais. Na Zona da Mata, a produção de feijão é caracterizada pela agricultura familiar, com pequenas áreas de cultivo e baixo nível tecnológico (Costa 2007). Ressalta-se ainda que o feijão (hospedeiro) na maioria das vezes é semeado apenas na safra da seca (de fevereiro a junho). Nas outras regiões, a produção de feijão é realizada em áreas extensas, o uso de pivôs mantém a umidade do solo quase que continuamente, há plantios mais adensados e hospedeiros cultivados durante praticamente o ano todo, devido ao plantio da soja. Em relação aos fatores ecológicos, a umidade do solo é fator determinante para a produção de apotécios (Abawi e Grogan 1979, Twengstrom *et al.* 1998, Bolton *et al.* 2006). Curiosamente, durante as coletas realizadas no presente estudo, não foram observados apotécios em escleródios de *S. sclerotiorum* nas lavouras da Zona da Mata. Por outro lado, nas regiões Noroeste e Sul, foi observada a presença dessas estruturas. A formação ou não de apotécios parece não interferir substancialmente na estrutura genética de *S. sclerotiorum* em lavouras de feijão de Minas Gerais, pois em todas as subpopulações não houve evidência de acasalamento aleatório. Por se tratar

de fungo homotálico, as consequências da recombinação na variabilidade genética da população são pequenas (Ekins *et al.* 2011).

Outra hipótese para menor variabilidade da subpopulação da Zona da Mata em relação às demais seria a possível interferência do processo de deriva genética. Populações de patógenos que sofrem redução significativa de tamanho, causada por ausência de hospedeiro, clima, etc., são menos diversificadas que aquelas que mantêm altas populações durante todo o ano (McDonald e Linde 2002). Conforme mencionado anteriormente, na Zona da Mata, a produção de feijão é realizada predominantemente durante uma estação de cultivo por ano, portanto, espera-se haver menor tamanho da população do patógeno. Ademais, a predominância de poucos genótipos do patógeno pode também ser influenciada pelas características do cultivo de feijão nessa região; feito por pequenos agricultores, que cultivam preferencialmente o feijão vermelho (Vieira *et al.* 2010). Os grãos da safra anterior são usados para o plantio na safra seguinte (Fonseca *et al.* 2002), geralmente sem controle da qualidade fitossanitária. A troca e o comércio desses grãos é prática comum entre os agricultores (Fonseca *et al.* 2002). Tais fatos podem explicar a alta frequência de um único haplótipo nessa região, já que a introdução do patógeno em áreas indenes ocorre principalmente por sementes infectadas por micélio ou por lotes contaminados com escleródios (Tu 1988; Napoleão *et al.* 2001; Vieira e Paula Júnior 2006).

Dos 65 genótipos identificados, sete foram compartilhados entre duas ou três regiões, apenas dois estiveram presentes em todas as subpopulações. O compartilhamento de genótipos indica migração de indivíduos entre subpopulações. Estima-se que 77% a 90% dos ascósporos são depositados dentro de 100 m da fonte (apotécio) (Ben-Yephet e Bitton 1985). Por outro lado, alguns autores acreditam em dispersão de ascósporos pelo ar a distâncias de até 3 - 4 km (Cubeta *et al.* 1997). Desta forma, a reprodução sexual por meio de ascósporos, entre indivíduos separados por longas distâncias parece improvável. A compra de sementes certificadas é prática incomum entre os produtores de feijão, mesmo em propriedades com maior nível tecnológico. Possivelmente, a migração de indivíduos ocorra por meio de escleródios ou grãos contaminados com micélio.

Fungos que se reproduzem preferencialmente de forma assexuada geralmente têm estrutura populacionais clonais, ao contrário dos que se reproduzem de forma

sexuada cuja população tende a ser mais diversa (Hemmati *et al.* 2009). *Sclerotinia sclerotiorum* apresenta ambas as fases (sexual e assexual) em seu ciclo de vida. Essa espécie pode se reproduzir assexuadamente por meio de escleródios ou sexuadamente por autofecundação (Kohli e Kohn 1997). Entretanto, o fato de ser espécie homotática não impede que haja recombinação entre os indivíduos (Ekins *et al.* 2006). A recombinação sexual em fungos fitopatogênicos tem implicações diretas no manejo das doenças. Cultivares resistentes tendem a ser mais vulneráveis (terem a resistência suplantada) e fungicidas menos efetivos (desenvolvimento de populações resistentes) (Milgroom 1996). A hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada em todas as subpopulações, inclusive na população total (composta pelas quatro subpopulações). Vários fatores, como seleção, fluxo gênico e deriva genética podem causar desequilíbrio gamético nas populações (Milgroom 1996). Foi observado fluxo gênico (número de migrantes) entre todas as populações estudadas, principalmente entre as subpopulações do Noroeste, Triângulo Mineiro e Zona da Mata, o que pode estar contribuindo para o desequilíbrio observado. Apesar de não haver evidência de recombinação, houve alta frequência de genótipos únicos nas populações. Ao comparar a distribuição dos alelos nos oito locos, entre os indivíduos de uma região (associação multilocos), observou-se que os indivíduos são muito parecidos, com poucas diferenças de alelos. Isso explica os altos valores encontrados no índice de associação (I_A). A baixa diferença entre os indivíduos dentro de uma população resultaram em altos valores do índice de associação. A ocorrência de campos clonais de *S. sclerotiorum* com muitos genótipos em frequências baixas foi reportado por Kohli e Kohn (1998), em estudo com 2747 isolados coletados em campos de canola no Canadá. Segundo esses autores, a formação de novos genótipos pode ocorrer não apenas em decorrência de meiose (reprodução sexual), mas também via mitose, após a fusão de dois núcleos compatíveis. Dessa forma, outros fatores podem estar gerando diversidade nas populações de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais. Embora alta clonalidade não tenha sido observada, acasalamento aleatório não é o principal fator que influencia a estrutura de genética das subpopulações de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais.

Em espécies homotáticas, reprodução sexual não necessariamente irá gerar recombinação e novos genótipos (Carbone e Kohn 2001). Por essa razão, o fato de *S. sclerotiorum* ser espécie homotática, ajuda a explicar a alta riqueza genética, porém

ausência de recombinação nas populações estudadas. Segundo Kohli *et al.* (1992), variabilidade em populações de *S. sclerotiorum* pode ser mantida por fatores como neutralidade seletiva, seleção transitória, fluxo gênico, recombinação sexual e mutação. Os mesmos autores classificam os ambientes povoados por *S. sclerotiorum* como neutros, devido às constantes mudanças de macro e microclima, hospedeiros, e práticas agrônômicas. Situações de forte pressão de seleção tendem a gerar homogeneidade dentro das populações, visto que poucos genótipos são selecionados. De forma análoga, na ausência de forte pressão de seleção, geralmente observa-se alto número de genótipos em baixa frequência nas populações. Essa situação parece ser condizente com o que foi observado nas populações de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais. Outra possível explicação para explicar a alta riqueza genotípica encontrada nas populações em Minas Gerais é a ocorrência de mutações. Segundo McDonald e Linde (2002), as taxas de mutação tendem a serem maiores quanto maior o tamanho das populações. Na maioria das lavouras amostradas nesse estudo, havia alta incidência de *S. sclerotiorum*. Outro fato importante é que dentro de uma mesma região os genótipos dos indivíduos eram similares, diferindo em poucos alelos na maioria das vezes. Essa característica é típica de mutações pontuais. Indivíduos recombinantes costumam ter uma mistura dos genótipos parentais, tornando-se bem diferentes. Em populações de fungos caracterizados por sistemas endogâmicos, há evidências de que a variabilidade genética está fortemente associada ao acúmulo de mutações no genoma (Whittle *et al.* 2011). Portanto, mutações podem ser fontes importantes de variabilidade nas subpopulações de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais. Nossa hipótese é que a ocorrência de mutações e fluxo gênico entre as regiões, são os principais mecanismos pelos quais a população de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais se mantém diversa.

A população de *S. sclerotiorum* em lavouras em Minas Gerais está moderadamente estruturada ($F_{st} = 0,15$). A condução de experimentos que selecionam linhagens resistentes e/ou tolerantes ao mofo-branco, a princípio, deve ser feita nas diferentes regiões, visto que há diferenças entre as populações de *S. sclerotiorum*. Um cultivar resistente, cujo processo de seleção for realizado com isolados pertencentes a um ou poucos locais, tenderá ao insucesso caso venha a ser cultivado em outras regiões. Vale ressaltar que testes de virulência entre os isolados de diferentes regiões são necessários para orientar os programas de melhoramento na

escolha de isolados ou regiões geográficas onde os ensaios serão conduzidos. Aparentemente, as subpopulações de *S. sclerotiorum* das regiões Noroeste, Triângulo Mineiro e Zona da Mata têm estrutura genética parecida. Nossa explicação é que o fluxo gênico entre essas regiões é mediado provavelmente por sementes contaminadas com escleródios, o que explica a não diferenciação dessas populações. Quanto à subpopulação do Sul, acredita-se que a diferenciação seja maior pela possibilidade de ser influenciada por genótipos que ocorrem em outras regiões não amostradas, possivelmente de localidades do Estado de São Paulo, pela proximidade geográfica. Ao analisar a distribuição dos indivíduos em cada grupo formado com base em ancestralidade, observou-se que 73,9% dos indivíduos pertencentes ao Sul foram agrupados separadamente. Indivíduos das outras regiões foram encontrados nos outros cinco grupos. Esse resultado está de acordo com os obtidos pela diferenciação das populações por meio da estatística θ , e confirmam que a subpopulação Sul se diferencia das demais. Foi observada também a presença de indivíduos imigrantes dentro dos grupos. Existem vários mecanismos pelos quais fungos fitopatogênicos podem migrar de uma região geográfica para outra. No caso de *S. sclerotiorum*, a migração de indivíduos entre as áreas de cultivo é feita principalmente por meio de escleródios misturados às sementes. Ascósporos são inóculo mais importantes para a dinâmica da doença dentro dos campos (Abawi e Grogan 1979).

Na maioria dos estudos, maior porcentagem de variação de *S. sclerotiorum* é atribuída à variabilidade dentro das populações. Gomes *et al.* (2011) utilizaram 10 marcadores SSR e encontraram 71,2 % de variação dentro das populações. Hemmati *et al.* (2009), trabalharam com 276 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em campos de canola no Irã e encontraram 96% de variação dentro das populações. A variação dentro das populações encontrada por Atallah *et al.* (2004), foi de 92,4%. Em nosso estudo 84,5 % da variação total foi atribuída à variabilidade dentro das subpopulações regionais. Grande parte dos 15,5 % da variação atribuída à variabilidade entre populações deve-se a diferença da subpopulação Sul em relação às demais. Pelo fato de ser fungo homotático, era de se esperar essa maior variação dentro das populações. Ademais, a probabilidade de ocorrer alguma recombinação entre indivíduos que estão próximos geograficamente é maior do que aqueles separados por longas distâncias. Outra possível explicação para esse fato é a geração

de variabilidade via mitose após fusão de núcleos compatíveis (Kohli e Kohn 1998). A somatogamia (fusão de hifas) só é possível entre indivíduos que estão próximos geograficamente (dentro da população). Embora possível, recombinação mitótica não tem sido observada em populações naturais (Kohli e Kohn 1998). Não há informações suficientes para afirmar que esse processo gere alguma variabilidade dentro das populações de *S. sclerotiorum* em Minas Gerais.

As implicações dos resultados deste trabalho para o manejo do mofo-branco do feijoeiro em Minas Gerais são de muita importância. O fato de as populações serem variáveis implica em possíveis diferenças de virulência e sensibilidade a fungicidas. Logo, a seleção de materiais para resistência/tolerância a *S. sclerotiorum* no Estado de Minas Gerais, deve ser realizada em diferentes regiões, a fim de minimizar os riscos de uma prematura suplantação de resistência.

6. CONCLUSÕES

- Existe variabilidade entre as populações de *Sclerotinia sclerotiorum*, causadoras do mofo-branco do feijoeiro em Minas Gerais.
- O patógeno é altamente variável dentro das populações em cada região.
- Menor variabilidade foi encontrada na população da Zona da Mata em relação às demais.
- As populações de *Sclerotinia sclerotiorum* das regiões Noroeste, Zona da Mata e Triângulo Mineiro têm estrutura genética semelhante, entretanto há forte diferenciação entre a região Sul e as demais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI GS, GROGAN RG, 1975. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65, 300-309.

ABAWI GS, GROGAN RG, 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 899-890.

ADAMS PB, AYERS WA, 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 896-899.

ANDERSON JB, KOHN LM, 1995. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 33, 369-391.

ATALLAH ZK, LARGET B, CHEN X, JOHSON DA, 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington State. *Phytopathology* 94, 737-742.

AGAPOW PM, BURT A, 2003. Multilocus, version 2.3. University of London, London. <http://www.agapow.net/software/multilocus/>.

BEN-YEPHET Y, BITTON S, 1985. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 13, 33-40.

BOLAND GJ, HALL R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16, 93-108.

BOLTON MD, THOMMA BPHJ, NELSON BD, 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7(1), 1-16.

CAIXETA ET, OLIVEIRA ACB, BRITO GG, SAKIYAMA NS, 2009. Tipos de Marcadores moleculares. In: BORÉM A, CAIXETA ET. (Eds) Marcadores Moleculares. Ed. UFV, 2ª ed, 33-52.

CARBONE I, ANDERSON JB, KOHN LM, 1999. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* 53,11-21.

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

CARPENTER MA, FRAMPTON C, STEWART A, 2009. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 27 (1), 13-21.

COLEY-SMITH JR, COOKE RC, 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9, 65-92.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho 2010. Brasília. Conab 43 p. Publicação mensal.

COOK GE, STEADMAN JR, BOOSALIS MG, 1975. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in western Nebraska. *Phytopathology* 65, 250-255.

COSTA MR, 2007. Melhoramento de feijões preto e vermelho visando à resistência a antracnose, ferrugem e mancha-angular com auxílio de marcadores moleculares. Tese de doutorado, Viçosa-MG, UFV.

CRUZ CD, MEDEIROS FF, PESSONI LA, 2011. Estrutura genética de populações. In: CRUZ CD, MEDEIROS FF, PESSONI LA. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*, cap.3, 219-315.

CUBETA MA, CODY BR, KOHLI Y, KOHN LM, 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. *Phytopathology* 87, 1000-1004.

DOYLE JJ, DOYLE JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.

EKINS M, AITKEN EA, COULTER KC, 2006. Homothallism in *Sclerotinia minor*. *Mycological research* 110, 1193-1199.

EKINS MG, HAYDEN HL, AITKEN EAB, GOULTER KG, 2011. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. *Australian Plant Pathology* 40, 99–108.

EXCOFFIER L, LISCHER HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Research* 10, 564-567.

FERRAZ LCL, CAFÉ FILHO AC, NASSER LCB, AZEVEDO J, 1999. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 48, 77-82.

FONSECA JR, VIEIRA EHN, VIEIRA RF, 2002. Algumas características do feijão coletado na Zona da Mata de Minas Gerais. *Revista Ceres* 49, p.81-88.

GOMES EV, NASCIMENTO LB, FREITAS MA, NASSER LCB, PETROFEZA S, 2011. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. *Journal of Phytopathology* 159, 94-98.

GRUNWALD NJ, GOODWIN SB, MILGROOM MG, FRY WE, 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93, 738–746.

HALL R, STEADMAN JR, 2005. White mold. In: SCHWARTZ HF, STEADMAN JR, HALL R, FOSTER RL (Eds.) Compendium of bean diseases, 2nd ed, 44-46.

HARTMAN GL, SINCLAIR JB, RUPE JC (Eds.), 1999. Compendium of Soybean Diseases. 4th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnessota.

HEMMATI R, JAVAN-NIKKHAH M, LINDE CC, 2009. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 125, 617–628.

HILL MO, 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54, 427–432.

HUANG HC, KOZUB GC, 1991. Temperature requirements for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 32, 279-286.

HUNTER JE, PEARSON RC, SEEN RC, SMITH CA, ALUMBO DR, 1984. Relationship between soil moisture and occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold disease on snap beans. *Protection Ecology* 7, 269-280.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>> Acesso em: 27 de março, 2009.

JULIATTI FC, SILVA AS, JULIATTI FC, 2001. Problemas fitossanitários em culturas sob pivô-central no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: ZAMBOLIM L (Ed.) Manejo Integrado Fitossanidade: cultivo protegido, pivô-central e plantio direto. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 205-256.

KOHLI Y, BRUNNER LJ, YOELL H, MILGROOM MG, ANDERSON JB, MORRALL RAA, KOHN LM, 1995. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology* 4, 69-77.

KOHLI Y, MORRALL RAA, ANDERSON JB, KOHN LM, 1992. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. *Phytopathology* 82, 875-880.

KOHLI Y, KOHN LM, 1998. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genetics and Biology* 23, 139-149.

KOHN LM, STASOVISKI E, CARBONE I, ROYER J, ANDERSON JB, 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81, 480-485.

KOHN LM, 2001. Integrating our genotypic diversity data: towards a global picture of population subdivision and fine-scale structure in *Sclerotinia*, with implications for disease management. In: HARDWICK, N.V.; HOCART, M.J.; STEADMAN, J.R.; WHIPPS, J.M.; YOUNG, C.S.; HUGHES, K.J.D. (Eds.) *The XI International Sclerotinia Workshop: program papers and delegate list*. York: BSPP, 17-19.

LITHOLDO JÚNIOR CG, GOMES EV, LOBO JÚNIOR M, NASSER LCB, PETROFEZA S, 2011. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 10 (2), 868-877.

MALVÁREZ G, CARBONE I, GRUNWALD NJ, SUBBARAO KV, SCHAFER M, KOHN LM, 2007. New Populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Lettuce in California and Peas and Lentils in Washington. *Phytopathology* 97 (4), 470-483.

McDONALD BA, LINDE C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.

MERT-TURK F, IPEK M, MERMER D, NICHOLSON P, 2007. Microsatellite and Morphological Markers Reveal Genetic Variation within a Population of *Sclerotinia sclerotiorum* from Oilseed Rape in the Canakkale Province of Turkey. *Journal of Phytopathology* 155,182–187.

MIKLAS PN, GRAFTON KF, KELLY JD, SCHWARTZ HF, STEADMAN JR, 1998. Registration of four white mold resistant dry bean germplasm lines: I9365-3, I9365-5, I9365-31, and 92BG-7. *Crop Science*, Madison, 38, 6,1728.

MIKLAS PN, GRAFTON KF, HAUF DC, KELLY JD, 2006. Registration of partial white mold resistant pinto bean germplasm line USPT-WM-1. *Crop Science*, Madison 46, 5, 2339.

MILGROOM MG, 1996. Recombination and the Multilocus Structure of Fungal Populations. *Annual Review of Phytopathology* 34, 457–77.

NAPOLEÃO R, CAFÉ-FILHO AC, LOPES CA, NASSER L, 2001. Mofa-branco do feijoeiro irrigado no cerrado. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Manejo Integrado Fitossanidade: cultivo protegido, pivô-central e plantio direto. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 119-136.

PAULA JÚNIOR TJ, VIEIRA RF, ZAMBOLIM L, 2004. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte 25 (223), 99-112.

PAULA JÚNIOR TJ, VIEIRA RF, LOBO JÚNIOR M, MORANDI MAB, CARNEIRO JES, ZAMBOLIM L, 2006. Manejo integrado do mofa-branco do Feijoeiro. Guia técnico, Viçosa-MG, 48p.

PAULA JÚNIOR TJ, ZAMBOLIM L, 2006. Doenças. In: VIEIRA C, PAULA JÚNIOR TJ, BORÉM A (Eds.). Feijão 2ed, Viçosa: Editora UFV, 359-414.

PAULA JÚNIOR TJ, VIEIRA RF, TEIXEIRA H, COELHO RR, CARNEIRO JES, ANDRADE MJB, REZENDE AM, 2008. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. Série Documentos, nº 42.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-945.

PURDY LH, 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69, 875-880.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>.

ROUSSET F, 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resource* 8, 103–106.

SCHWARTZ HF.; STEADMAN JR, 1978. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68, 383-388.

SEXTON AC, HOWLETT BJ, 2004. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Current Genetics* 46, 357-365, 2004.

SEXTON AC, WHITTEN AR, HOWLETT BJ, 2006. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. *Genome* 49,1408–1415.

SHANNON CE, WEAVER W, 1949. The Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press, Urbana, IL*.

SIRJUSINGH C, KOHN LM, 2001. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology Notes* 1, 267-269.

STEADMAN JR, 1975. Nature and epidemiological significance of infection of bean seed by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65, 1323-1324.

STEADMAN JR, 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 69, 904-907.

STEADMAN JR, 1983. White mold - a serious yield limiting disease of bean. *Plant Disease* 67, 346-350.

STODDART JA, TAYLOR JF, 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118, 705-705.

TU JC, 1988. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology* 121, 40-50.

TU JC, 1989. Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Disease* 73, 281-285.

TWENGSTROM E, KOPMANS E, SIGVALD R, SVENSSON C, 1998. Influence of different irrigation regimes on carpogênica germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology* 146, 487-493.

VALARINI PJ, SPADOTTO CA, 1995. Identification of survival niches of pathogens in irrigated agriculture of Guaíra, São Paulo State. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30, 1239-1243.

VIEIRA RF, PAULA JR TJ, 2006. Semente: Veículo de Disseminação de Patógenos. In: VIEIRA C, PAULA JR TJ, BORÉM A (Eds.). *Feijão*. Viçosa: Editora UFV, 359-414.

VIEIRA RF, PAULA JR TJ, TEIXEIRA H, 2010. Produção de feijão: segurança alimentar. *Informe Agropecuário* 31, 22 - 27.

WHITTLE CA, NYGREN K, JOHANNESSON H, 2011. Consequences of reproductive mode on genome evolution in fungi. *Fungal Genetics and Biology*.

ZHAN J, KEMA GHJ, WAALWIJK C, McDONALD BA, 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spartial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* 36, 128-136.