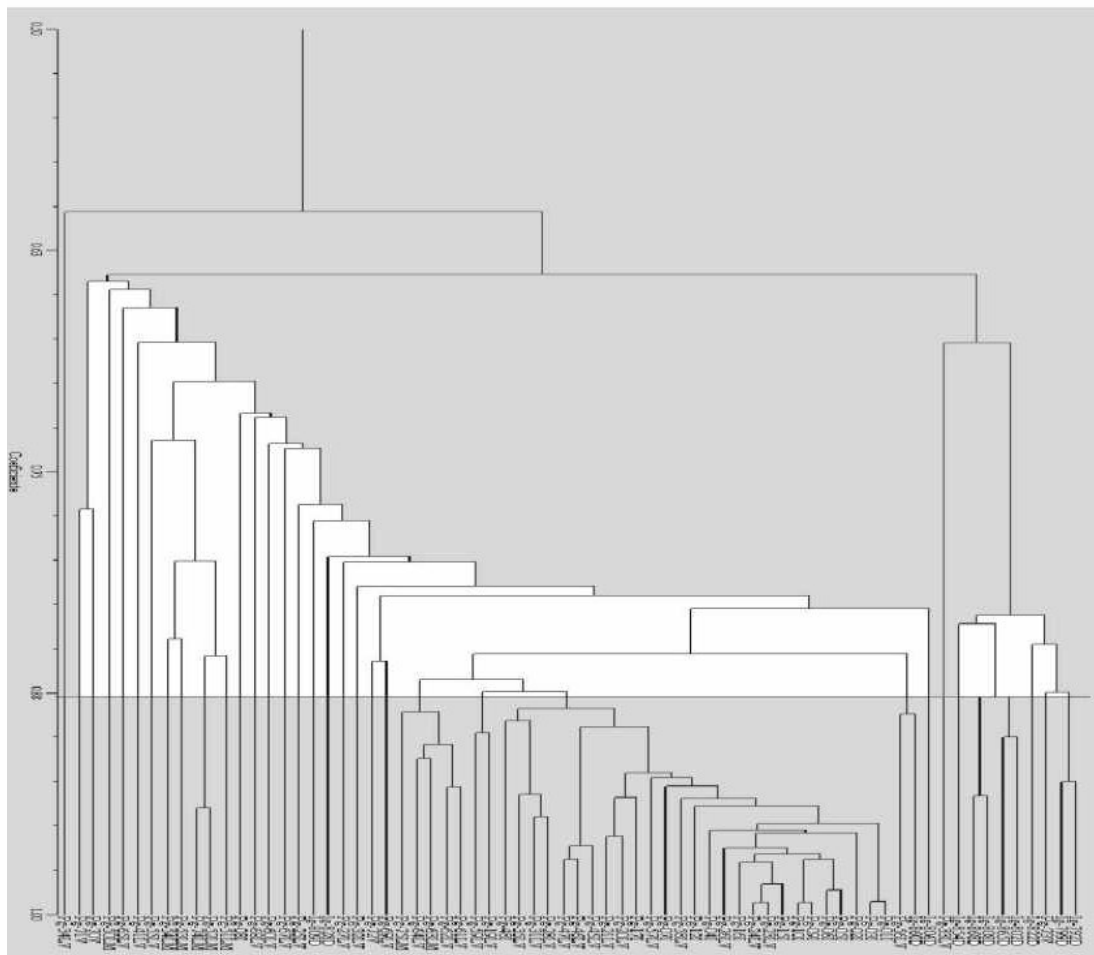


## Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores rapd



ISSN 1413-1455

Outubro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio-Norte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*** 71

## **Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores rapd**

*Kaesel Jackson Damasceno e Silva  
Cassius Nonato de Souza Freire  
Elaine Aparecida de Souza  
Aloísio Sartorato*

Teresina, PI  
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Meio-Norte**

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires,  
Caixa Postal: 01  
CEP 64006-220 Teresina, PI.  
Fone: (86) 3225-1141  
Fax: (86) 3225-1142  
Home page: [www.cpamn.embrapa.br](http://www.cpamn.embrapa.br)  
E-mail: [maiac@cpamn.embrapa.br](mailto:maiac@cpamn.embrapa.br)

**Comitê de Publicações**

Presidente: Hostón Tomás Santos do Nascimento.  
Secretária-Executiva: Ursula Maria Barros de Araújo  
Membros: Paulo Sarmanho da Costa Lima, Humberto Umbelino de Sousa, Fábio Mendonça Diniz, Flávio Flavaro Blanco, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito de Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo e Carlos Antônio Ferreira de Sousa.

Supervisor editorial: Lúgia Maria Rolim Bandeira  
Revisor de texto: Lúgia Maria Rolim Bandeira  
Normalização bibliográfica: Orlane da Silva Maia  
Editoração eletrônica: Jorimá Marques Ferreira  
Foto da capa: Diógenes Manoel Pedrosa de Azevedo

**1ª edição**

1ª impressão (2007): 300 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Meio-Norte

---

Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores RAPD / Kaesel Jackson Damasceno e Silva ... [et al.]. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2007.  
34 p. ; 21 cm. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio-Norte, ISSN 1413-1455 ; 71).

1. Mancha angular. 2. Feijão. 3. Variação genética. 4. Marcador molecular. 5. *Phaseolus vulgaris*. I. Silva, Kaesel Jakson Damasceno e. II. Embrapa Meio-Norte. III. Série.

CDD 635.65294 (21. ed.)

---

© Embrapa, 2006

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introdução</b> .....	8
<b>Material e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados e Discussão</b> .....	11
<b>Conclusões</b> .....	13
<b>Referências</b> .....	17

# Caracterização de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores rapd

---

*Kaesel Jackson Damasceno e Silva*  
*Cassius Nonato de Souza Freire*  
*Elaine Aparecida de Souza*  
*Aloísio Sartorato*

## Resumo

A mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, é uma das mais importantes doenças desta cultura no Brasil. O desenvolvimento de uma estratégia para controlar e ou reduzir o impacto do fungo *P. griseola* requer um conhecimento prévio da estrutura populacional do patógeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a diversidade genética e a estrutura genética de populações entre isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais e Goiás. Para este trabalho, foram selecionados 70 isolados de *P. griseola*, os quais foram caracterizados por meio de marcadores RAPD. Para a análise com os dados de marcadores moleculares, foram utilizados 19 *primers* de RAPD. Os *primers* amplificaram um total de 76 bandas polimórficas, totalizando, em média, quatro bandas polimórficas por *primer*. A similaridade genética entre os isolados variou de 0,301 a 0,993, com média de 0,746. As análises

---

<sup>1</sup>Trabalho financiado com recursos do Convênio Embrapa/Petrobrás

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220 Teresfina-PI. E-mail: kaesel@cpamn.embrapa.br

descritivas revelaram uma tendência de diferenciação dos isolados, por local de origem. A estimativa do índice de diversidade de Shannon revelou que, na cidade de Viçosa, MG, foi encontrada maior diversidade genética, enquanto que em Ijací, MG, a menor diversidade genética. A diversidade genética de Nei foi decomposta e verificou-se  $H_T = 0,3535$ . A diferenciação genética entre as populações estudadas foi de 0,1979 ( $G_{ST}$ ). Portanto, 80,21% da variação deve-se a variação dentro das populações. A AMOVA demonstrou que 77,51% da variação está contida dentro de cidades e 22,49% entre cidades. Foi realizada uma comparação par a par dos 76 locos polimórficos estudados. Foram obtidos valores de desequilíbrio gamético significativamente diferente de zero para as populações estudadas (teste de Fisher,  $P < 0,05$ ), mostrando que *P. griseola* mantém uma estrutura genética consistente com a reprodução assexual.

**Termos para indexação:** Mancha angular, feijão comum, variabilidade e marcadores moleculares.

# Characterization of *phaeoisariopsis griseola* isolates by rapd markers

---

## Abstract

*Angular leaf spot disease of common bean (Phaseolus vulgaris), caused by Phaeoisariopsis griseola, is one of the most important of this crop in Brazil. The development of a strategy to control and or reduce the impact of P. griseola requires a previous knowledge of the population structure. Therefore, the purpose of this study was to investigate the genetic diversity and population's genetic structure among P. griseola isolates collected in Minas Gerais and Goiás state, Brazil. Seventy isolates were characterized by RAPD markers. Nineteen RAPD primers were used in the molecular analysis. The primers amplified a total of 76 polymorphic bands, with average of 4.0 polymorphic bands per primer. The genetic similarity among the isolates varied from 0.301 to 0.993 with average of 0.746. The descriptive analyses revealed a tendency of differentiation of isolates for origin areas. The Shannon diversity index revealed that Viçosa, MG, presented the largest genetic diversity, whereas Ijaci, MG, presented the smallest genetic diversity. The total Nei's genetic diversity was partitioned ( $H_T = 0.3535$ ). The genetic differentiation among the populations was 0.1979 ( $G_{ST}$  value). Therefore, 80.21% of the genetic variation observed in this study was due to differentiation within populations. AMOVA demonstrated that 77.51% of the variation was contained within places and 22.49% among places. Pairwise comparisons of 76 polymorphic RAPD loci gave disequilibrium values that were all significantly different from zero (Fisher's exact test,  $P < 0.05$ ) for studied populations, showing that *P. griseola* maintains a genetic structure consistent with asexual reproduction.*

**Index terms:** *Angular leaf spot, common bean, variability and molecular markers.*

## Introdução

*Phaeoisariosis griseola* (Sacc.) Ferraris é o agente causal da mancha angular do feijoeiro, doença que pode provocar perdas na produção superiores a 80% (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997; SAETTLER, 1991; SCHWARTZ et al., 1981). A ocorrência desta doença foi relatada em mais de 78 países do mundo (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997). Nos últimos anos, ela se tornou uma das mais importantes no Brasil, podendo proporcionar perdas maiores que 80% na produção, dependendo da suscetibilidade das cultivares, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da cultura (SARTORATO, 2004). Em adição, são registradas perdas de qualidade das sementes e ou grãos, redução do valor de mercado e disponibilidade de sementes (PASTOR-CORRALES; JARA; SINGH, 1998).

O uso de cultivares resistentes é a estratégia mais eficiente e econômica, além de não promover danos ao ambiente, para a obtenção de altas produtividades. O desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha angular é dificultado pela elevada variabilidade patogênica apresentada pelo fungo *P. griseola*. Assim, o entendimento da variabilidade genética do patógeno é um importante pré-requisito para o desenvolvimento e o emprego de cultivares resistentes à mancha-angular.

Não obstante ao elevado nível de variabilidade genética detectado entre isolados do fungo *P. griseola*, eles podem ser agrupados em dois conjuntos gênicos, andino e mesoamericano. Guzmán et al. (1995) e Pastor-Corrales e Jara (1995) revelaram o processo de co-evolução entre o patógeno e o conjunto gênico hospedeiro, de acordo com o centro de origem, ou seja, isolados de origem andina infectam cultivares do conjunto gênico andino e, enquanto que, isolados de origem mesoamericana infectam cultivares do conjunto gênico mesoamericano, preferencialmente, mas também possuem capacidade de infectar cultivares de origem andina.



Elevada variação genética foi registrada previamente, por meio de marcadores moleculares, em alguns estudos realizados no Brasil e no mundo (BUSOGORO; JIJAKLI; LEPROIVE, 1999; MAHUKU et al., 2002b; SARTORATO, 2004; WAGARA et al., 2004). Busogoro, Jijakli e Leproive (1999) observaram elevada variabilidade genética entre isolados de *P. griseola* na África e a existência de padrões RAPD similares entre isolados coletados em diferentes locais, sugerindo uma possível ocorrência de migração entre isolados de diferentes locais. Mahuku et al. (2002b) verificaram níveis significativos de diferenciação genética ( $G_{ST} = 0,39$ ) entre isolados andinos obtidos na África e América Latina. Falta de especificidade dos isolados de acordo com a sua região de origem foi observada por Sartorato (2004). Wagara et al. (2004) estudaram 50 isolados de *P. griseola*, obtidos no Kenya, verificaram alto nível de variabilidade genética entre os isolados e obtiveram baixo nível de diferenciação genética entre populações (9,3%) em detrimento da variação dentro das populações (90,7%).

Devido à elevada variabilidade do fungo *P. griseola*, o sucesso de um programa de melhoramento que vise à obtenção de cultivares resistentes à mancha-angular requer o conhecimento da estrutura genética de populações de uma dada região. Tal conhecimento é crucial para determinar a adoção de estratégias para a obtenção de cultivares resistentes. Entretanto, no Brasil, existe uma carência de estudos que objetivem o conhecimento da estrutura populacional deste fungo.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a variabilidade genética de isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais por meio do uso do marcador molecular RAPD e fornecer informações sobre a estrutura genética da população amostrada, para orientar os programas de melhoramento genético que visam ao desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha-angular.

## Material e Métodos

### Isolados de *Phaeoisariopsis griseola*

Foram selecionados 70 isolados de *P. griseola*, dos quais 58 pertencem à micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e 12 foram cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão. Estes isolados foram coletados de cultivares de feijão comum que apresentavam sintomas de mancha-angular em condições de campo e são provenientes de quatro municípios do estado de Minas Gerais e de um município do estado de Goiás (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados, cultivares e município de origem dos isolados de *P. griseola*.

Isolados	Cultivar	Município – Estado	TC <sup>1/</sup>	Patótipo
Ig - 792	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 799	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-63
Ig - 802	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-63
Ig - 806	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 808	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-63
Ig - 809	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 822	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-63
Ig - 828	Emgopa Ouro	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 854	Jalo Precoce	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 860	Jalo Precoce	Damolândia, GO	C	63-63
Ig - 865	Jalo Precoce	Damolândia, GO	C	63-31
Ig - 868	Jalo Precoce	Damolândia, GO	C	63-63
Pg - 01	CV-13	Ijaci, MG	E	63-47
Pg - 02	CV-78	Ijaci, MG	E	63-15
Pg - 03	ESAL 507	Ijaci, MG	E	63-47
Pg - 04	Z-22	Ijaci, MG	E	63-63
Pg - 05	CV-78	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 06	MAI - 8-13	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 07	LH-10	Ijaci, MG	E	63-55
Pg - 08	CI - 257	Ijaci, MG	E	63-15

Continua

Tabela 1. Continuação.

Isolados	Cultivar	Município – Estado	TC <sup>1/</sup>	Patótipo
Pg - 09	ERIPARSA	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 10	ERIPARSA	Ijaci, MG	E	63-63
Pg - 12	RC-I-3	Ijaci, MG	E	63-23
Pg - 15	ESAL 502	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 16	-	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 17	-	Ijaci, MG	E	63-31
Pg - 19	-	Lavras, MG	E	63-47
Pg - 20	-	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 21	-	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 23	Batatinha	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 24	RC <sup>2/</sup>	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 25	RC	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 26	Batatinha	Lavras, MG	E	63-31
Pg - 27	RC x Talismã	Lavras, MG	E	63-31
Pg - 28	Jalo	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 31	Jalo	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 32	Jalo	Lavras, MG	E	63-31
Pg - 33	F1 (PA3)	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 34	RC	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 35	RC	Lavras, MG	E	63-63
Pg - 41	Mulatinho Vagem roxa	Lavras, MG	E	63-31
Pg - 45	Talismã	Lavras, MG	C	63-63
Pg - 46	Talismã	Lavras, MG	C	63-63
Pg - 47	Talismã	Lavras, MG	C	63-63
Pg - 48	Talismã	Ijaci, MG	E	63-63
Pg - 50	CNFC 10443	Lambari, MG	E	-
Pg - 51	CNFC 8065	Lambari, MG	E	-
Pg - 52	CNFC 10453	Lambari, MG	E	-
Pg - 53	Roxo 90	Lambari, MG	E	-
Pg - 54	MN 3420	Lambari, MG	E	-
Pg - 55	A-95	Lavras, MG	E	-
Pg - 56	A-114	Lavras, MG	E	-
Pg - 57	A-82	Lavras, MG	E	-
Pg - 58	A-97	Lavras, MG	E	-
Pg - 59	A-125	Lavras, MG	E	-

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Isolados	Cultivar	Município – Estado	TC <sup>1/</sup>	Patótipo
Pg - 60	A-118	Lavras, MG	E	-
Pg - 61	Small White	Lavras, MG	E	-
Pg - 62	Carioca MG	Lavras, MG	E	-
Pg - 63	Carioca MG	Lambari, MG	E	-
Pg - 64	VC-3	Lavras, MG	E	-
Pg - 65	RC	Lavras, MG	E	-
Pg - 67	RC	Lavras, MG	E	-
Pg - 68	RC	Lavras, MG	E	-
Pg - 69	OP-NS-331	Lavras, MG	E	-
Pg - 70	Roxo/vermelho	Viçosa, MG	E	-
Pg - 71	Jalo/Pintado	Viçosa, MG	E	-
Pg - 72	-	Viçosa, MG	E	-
Pg - 73	Jalo	Viçosa, MG	E	-
Pg - 74	-	Lambari, MG	E	-
Pg - 75	-	Lambari, MG	E	-

1/ TC: tipos de cultivo. C: campo de produção; E: campo experimental.

2/ RC: progênies oriundas do programa de seleção recorrente para resistência à mancha-angular.

### Obtenção das culturas monospóricas

Foram obtidas culturas monospóricas a partir de cada isolado amostrado, totalizando 70 monocultivos (SARTORATO, 2004). As culturas monospóricas foram realizadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e armazenadas à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e ausência de luz por, aproximadamente, 15 dias

### Obtenção de massa micelial

Após a obtenção da colônia monospórica, procedeu-se a retirada de cinco a seis pequenos discos de meio de cultura contendo micélio do fungo de

cada um dos 70 isolados e posterior transferência para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido (200 g.L<sup>-1</sup> de batata e 10 g.L<sup>-1</sup> de glucose). Estes frascos foram mantidos a 24 C em incubadora (Shaker), com agitação, na rotação de 110-120 RPM por, aproximadamente, 15 dias.

Após a obtenção de massa micelial foi realizada a filtragem e por meio do uso de bomba a vácuo a umidade remanescente foi retirada. O micélio de cada cultura monospórica foi acondicionado em vidraria e congelado a -20 C.

### **Extração de DNA total**

O DNA foi extraído de acordo com a metodologia desenvolvida por Raeder e Broda (1985) modificada. A massa micelial foi transferida para almofariz de porcelana e macerada em 10 ml de tampão de extração com CTAB a 65 C, juntamente com 30 µl de β-mercaptoetanol, com auxílio de areia esterilizada e nitrogênio líquido. O tampão de extração continha 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH = 8,0), 20 mM de EDTA (pH = 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona).

Após o procedimento de maceração, o material foi mantido em banho-maria, a 65 C, por 30 minutos, sendo agitado, por suaves inversões, a cada 10 minutos; seguido de resfriamento durante cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 mL da solução clorofórmio: álcool isoamil (24:1), seguidos da homogeneização e centrifugação, durante 10 minutos, a 4.000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30 mL da solução álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e levado ao freezer (-20 C) por seis horas, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7). O DNA dissolvido foi submetido a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil, sendo o sobrenadante coletado e misturado com o triplo de seu volume com álcool a 95%:acetato de sódio 3M (20:1) e mantido no freezer (-20 C), por seis horas, no mínimo. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada e o DNA dissolvido em 50-100 µL de TE.

A quantificação de DNA foi realizada com auxílio de um fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100. Para isso, foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4), juntamente com 0,1  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE, para uma concentração de 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , para as reações RAPD.

### Marcador RAPD

Foram avaliados 19 *primers*, sendo selecionados os seguintes: OP AN11, OP AP18, OP AQ01, OP AQ02, OP AQ03, OP AQ04, OP AQ08, OP AS03, OP AS04, OP AS05, OP AS06, OP AS07, OP AS08, OP AS11, OP AS15, OP AS19, OP AT19, OP BB06 e OP BB08. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331. O volume total da reação corresponde a 14  $\mu\text{L}$ , correspondendo a 4  $\mu\text{L}$  de água, 35 ng de DNA genômico, e 50  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,4  $\mu\text{M}$  de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 50 mM de tris-HCl, pH 8,0, 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 20 mM de KCl e 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase.

O processo de amplificação foi realizado da seguinte forma: 1) nos dois primeiros ciclos, a desnaturação do DNA foi feita a 94 C, por dois minutos, o anelamento a 37 C por 15 segundos e a elongação, a 72 C, por um minuto; 2) adicionalmente, mais 38 ciclos diferiram apenas no tempo de desnaturação (15 segundos). Após 40 ciclos, procedeu-se a extensão final por dois minutos a 72 C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70 volts, durante 4,5 horas. Logo após, foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com a câmara fotográfica EDA - 290 da Kodak.

## Estimativa da similaridade genética

Cada banda polimórfica foi tratada como um caráter único. Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) das bandas polimórficas, presentes nas 70 amostras de DNA. A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ), entre cada par de isolados, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da expressão (ROHLF, 1992).

$$sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

em que:

a = presença de bandas nos indivíduos  $i$  e  $j$ ;

b = presença de banda no indivíduo  $i$  e ausência no indivíduo  $j$ ;

c = ausência de banda no indivíduo  $i$  e presença no indivíduo  $j$ .

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.1 (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade genética gerada foi, então, usada para produzir um dendrograma pelo método da média das similaridades (UPGMA).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a seguinte expressão modificada de Skroch, Tivang e Nienhuis (1992):

Erro padrão estimado:

$$(s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \frac{1 - sg_{ij}}{n - 1}}$$

em que:

$n$  é a soma de  $a$ ,  $b$  e  $c$ , para cada par de isolados.

Os isolados geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma a partir da estimativa de valor máximo significativo de similaridade (sgm).

O sgm foi estimado por meio do teste de  $t$ , utilizando-se a seguinte expressão:

$$sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$$

em que:

$t$  = valor tabelado da distribuição t de Student, a 1% de probabilidade, com  $n-2$  graus de liberdade;

$S_{sg}$  = erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

A estimativa da diversidade dentro de cinco locais de coleta do patógeno, *P. griseola*, foi realizada utilizando-se o índice de Shannon, dado pela seguinte expressão:

$$H = -\sum p_i (\log_2 p_i)$$

em que:

$P_i$  = proporção de indivíduos que possuem a banda em um determinado

$\log_2 P_i$  = logaritmo de  $P_i$  com base 2.

Foram obtidas as seguintes estatísticas descritivas: número e % de locos polimórficos (LIN; CHENG; HUANG, 1997) e heterozigosidade esperada (NEI, 1973).

Estas análises foram realizadas no programa GDA (Genetic Data Analysis) versão 1.0 (LEWIS; ZAIKIN, 2001).

Nei (1973) propõe a partição da diversidade genética em seus componentes entre e dentro de populações.

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

em que:

$H_T$  = diversidade total, estimada a partir das freqüências alélicas médias de cada loco.

$H_S$  = componente da diversidade dentro da população.

$D_{ST}$  = componente da diversidade entre populações, dentro da espécie considerada.

A proporção da diversidade genética que é atribuída ao componente entre populações é estimada por:

A proporção da diversidade genética que é atribuída ao componente entre populações é estimada por:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$



## Análise de variância molecular

A análise de variância molecular foi realizada com o auxílio do programa Arlequin 2.000 (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000). A análise foi realizada considerando-se uma estrutura hierárquica na qual os isolados coletados em cada município foram tratados como uma população. Um resumo desta análise de variância está apresentado na Tabela 2.

A variância genética total  $\sigma^2_T$  corresponde a:  $\sigma^2_a + \sigma^2_b$

**Tabela 2.** Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	Graus de liberdade	E(QM)
Entre categorias	$A - 1$	$\sigma^2_b + n\sigma^2_a$
Dentro de categorias	$N - A$	$\sigma^2_b$
Total	$N - 1$	$\sigma^2_T$

$A$  = número de municípios amostrados;  $N$  = número total de isolados amostrados.

$\sigma^2_a$  = componente de variância devido às diferenças entre municípios;

$\sigma^2_b$  = componente de variância devido às diferenças entre amostras dentro de municípios.

$n$  = valor ponderado em função do número diferente de indivíduos para

cada município de coleta.  $n = \frac{N - \sum \frac{N_a^2}{N}}{A - 1}$  em que  $N_a^2$  é o número de

indivíduos na população  $A$  (municípios).

**Fonte:** Adaptado de (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

Os componentes de variância foram testados a partir do coeficiente  $\phi_{ST}$ , obtido pela expressão:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T}$$

em que:

$\phi_{ST}$  = corresponde à razão da variância entre categorias (municípios) pela variância total; representa o valor de indivíduos tomados ao acaso dentro de áreas de coleta, em relação a indivíduos tomados ao acaso em toda a amostra.

Na tentativa de esclarecer melhor a estrutura populacional deste patógeno, foi estimado o desequilíbrio de ligação dentro das populações de *P. griseola* que foram coletadas nos municípios de Ijaci (safra da seca/2005) e Lavras (safras da seca e inverno/2005). As bandas RAPD foram consideradas como locos únicos e a presença ou a ausência de bandas consideradas como alelos. O desequilíbrio de ligação foi calculado utilizando-se o programa Arlequin 2.000 (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

Para cada associação de locos estudada, a probabilidade foi testada pelo teste de Fisher e o método da cadeia de Markov. Uma associação foi considerada significativamente diferente de zero se o teste resultou em uma probabilidade menor que 0,05.

## Resultados e Discussão

### Análise de marcadores moleculares

A análise da diversidade entre isolados de *P. griseola* foi realizada por meio de marcadores RAPD. Todas as reações, para cada *primer*, foram realizadas duas vezes e 19 *primers* foram selecionados para analisar a diversidade do fungo. Foram amplificadas, no total, 76 bandas polimórficas, as quais foram utilizadas para avaliação dos 70 isolados de *P. griseola* (Tabela 3). Número de bandas polimórficas idêntico foi utilizado por Stenglein e Balatti (2006), ao caracterizarem a variabilidade genética de isolados de *P. griseola* de 45 isolados coletados na Argentina. Número de bandas polimórficas inferior (14 bandas) a este foi usado por Sartorato (2004), ao estudar a variabilidade genética de isolados de dois municípios

do estado de Goiás. Já Nietsche et al. (2001) fizeram inferências a respeito da variabilidade genética no estado de Minas Gerais, utilizando um total de 26 bandas polimórficas.

Foram geradas, em média, quatro bandas polimórficas por *primer*. Já Stenglein e Balatti (2006) obtiveram média de 10,86 bandas polimórficas por *primer*, utilizando isolados procedentes da Argentina.

### Avaliação da variabilidade genética

A similaridade genética entre os isolados variou de 0,301 a 0,993, com média de 0,746. Silva, Souza e Ishikawa (2007) obtiveram uma amplitude de 0,65 a 0,99 nas estimativas de similaridades genética para isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, o que indica que o fungo *P. griseola* possui maior variabilidade patogênica dentre os dois patógenos mais comuns do feijoeiro comum em Minas Gerais.

Na Figura 1 está representado o dendrograma construído a partir dos dados de similaridade genética e posterior agrupamento realizado pelo método UPGMA. A linha de corte representa o valor máximo de similaridade ( $sg_m$ ), à direita (acima) da qual os acessos são considerados semelhantes. O  $sg_m$  a 1% de probabilidade foi de 0,882. Por meio do dendrograma, foi possível verificar a formação de 33 grupos (com, pelo menos, dois isolados). Os grupos formados são apresentados na Tabela 4 e Fig. 1. Entre os isolados avaliados, 26 não agruparam com nenhum outro isolado dentro do intervalo estabelecido. Os isolados coletados no município de Viçosa, MG, não se agruparam com os outros isolados no nível de similaridade estabelecido (0,882).

**Tabela 3.** Primers de RAPD que detectaram polimorfismo nos isolados de *P. griseola*, com suas respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas.

Primer	Seqüências	N.º de bandas polimórficas
OP AN11	5' GTCCATGCAG 3'	5
OP AP18	5' GTCGTCGACA 3'	2
OP AQ01	5' GGCAGGTGGA 3'	3
OP AQ02	5' ACCCTCGGAC 3'	4
OP AQ03	5' GAGGTGTCTG 3'	4
OP AQ04	5' GACGGCTATC 3'	4
OP AQ08	5' TCGGTAGACC 3'	4
OP AS03	5' ACGGTTCCAC 3'	4
OP AS04	5' GTCTTGGCA 3'	3
OP AS05	5' GTCACCTGCT 3'	2
OP AS06	5' GGCGGTTAG 3'	3
OP AS07	5' CACGAGCAGG 3'	4
OP AS08	5' GGCTGCCAGT 3'	3
OP AS11	5' ACCGTGCCGT 3'	6
OP AS15	5' CTGCAATGGG 3'	5
OP AS19	5' TGACAGCCCC 3'	5
OP AT19	5' ACCAAGGCAC 3'	7
OP BB06	5' CTGAAGCTGG 3'	4
OP BB08	5' TCGTCGAAGG 3'	4
Total		76

O Grupo I é formado por dois isolados, Ig-792 e Ig-799, oriundos do município de Damolândia, GO, sendo caracterizados como patótipo 63-31 e 63-63, respectivamente. Importante mencionar, também, que estes isolados foram coletados infectando uma mesma cultivar (Emgopa Ouro). Situação análoga foi observada no Grupo II, no qual os quatro isolados foram coletados no município de Damolândia, GO. Dois destes isolados, Ig-802 e Ig-808, pertencem ao patótipo 63-63 e foram coletados sobre a cultivar Emgopa Ouro. Os isolados Ig-865 (patótipo 63-31) e Ig-868 (patótipo 63-63) quebraram a resistência da cultivar Jalo Precoce. A partir dos resultados dos Grupos I e II, pode-se observar tendência de evolução localizada do patógeno, visto que os isolados coletados no estado de Goiás (Damolândia) foram agrupados juntos e, em geral, apresentam baixa similaridade com os isolados obtidos no estado de Minas Gerais. Ausência de especificidade entre os isolados e sua região geográfica de origem foi observada por Sartorato (2004), no entanto, o autor observou formação de subgrupos formados por isolados de apenas um local.

Estes dados e outros já relatados enfatizam a necessidade da realização de monitoramento por local ou região de plantio, para que as estratégias de melhoramento sejam eficientes. O estudo da variabilidade genética deste fungo por meio de marcadores moleculares refletem melhor a dinâmica populacional do patógeno, permitindo um estudo mais completo do genoma de *P. griseola* em relação à avaliação do caráter virulência, mas não permitem a identificação de locos ligados a genes de virulência no fungo (SARTORATO, 2004). Dois isolados formam o Grupo III, sendo que um, Ig-860, é oriundo de Damolândia, GO e o outro (Pg-56), de Lavras, MG. Entre os 27 isolados que foram agrupados no Grupo IV estão 14 dos 15 isolados coletados em Ijací, MG. Portanto, há uma relação entre as seqüências de DNA amplificadas e o local de coleta dos isolados, presentes nos Grupos I, II e IV, independentemente do patótipo ao qual pertence o isolado. Trabalhos futuros precisam ser desenvolvidos priorizando o levantamento de informações acerca da variabilidade em diferentes regiões para que dados sobre a evolução do patógeno possam ser acumulados.

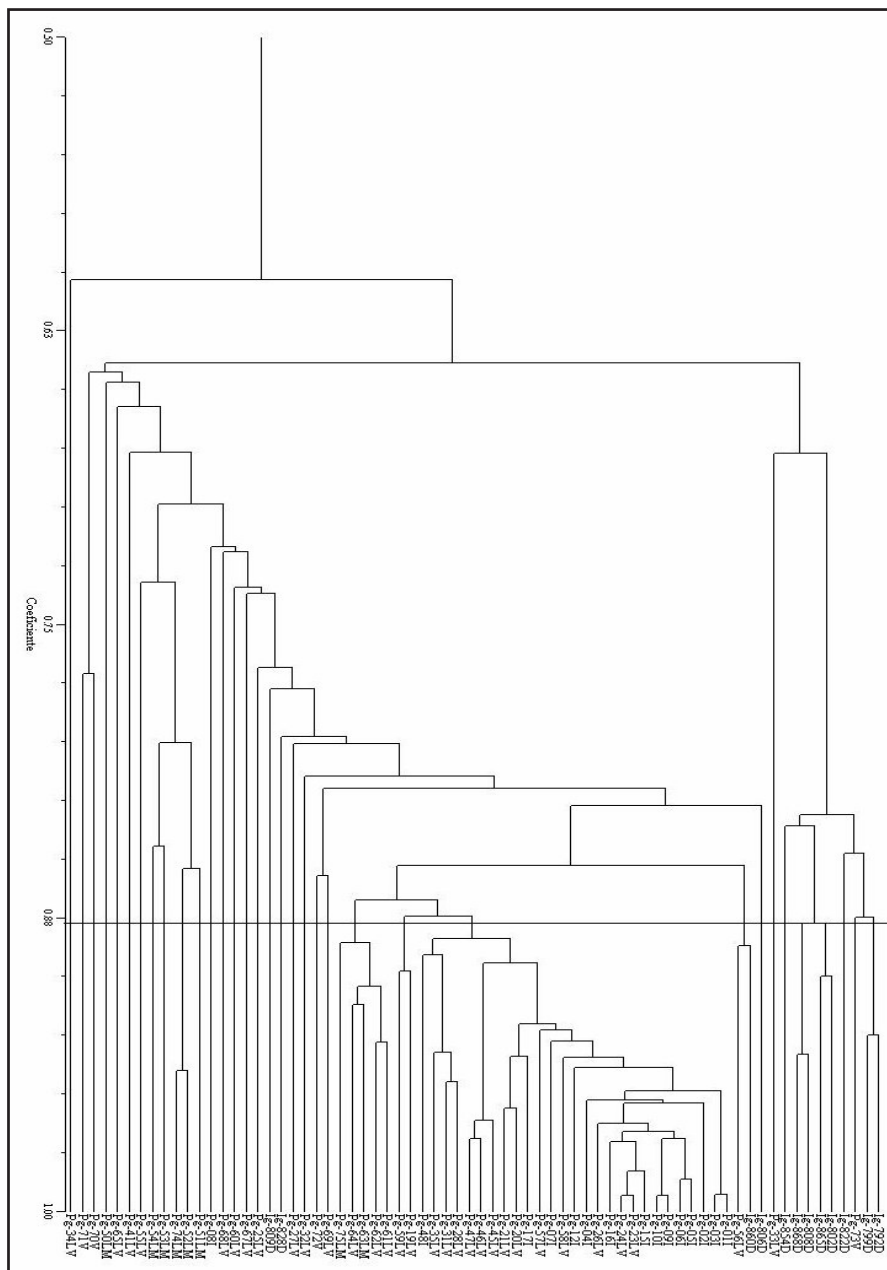


Fig. 1. Dendrograma obtido para os 70 isolados de *P. griseola*.

**Tabela 4.** Grupos de isolados considerando os resultados da análise de agrupamento (UPGMA) e do dendrograma, referentes aos 70 isolados estudados (Figura 1).

GRUPO I									
Isol. <sup>1/</sup>	C <sup>2/</sup>	Isol.	C						
Ig-792	D <sup>3/</sup>	Ig-799	D						
GRUPO II									
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C		
Ig-802	D	Ig-865	D	Ig-808	D	Ig-868	D		
GRUPO III									
Isol.	C	Isol.	C						
Ig-860	D	Pg-56	LV <sup>4/</sup>						
GRUPO IV									
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-01	I <sup>5/</sup>	Pg-03	I	Pg-02	I	Pg-05	I	Pg-06	I
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-09	I	Pg-10	I	Pg-15	I	Pg-23	LV	Pg-24	LV
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-16	I	Pg-26	LV	Pg-04	I	Pg-12	I	Pg-58	LV
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-07	I	Pg-57	LV	Pg-17	I	Pg-20	LV	Pg-21	LV
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-45	LV	Pg-46	LV	Pg-47	LV	Pg-28	LV	Pg-31	LV
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-35	LV	Pg-48	I						
GRUPO V									
Isol.	C	Isol.	C						
Pg-19	LV	Pg-59	LV						
GRUPO VI									
Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C	Isol.	C
Pg-61	LV	Pg-62	LV	Pg-63	LM <sup>6/</sup>	Pg-64	LV	Pg-75	LM
GRUPO VII									
Isol.	C	Isol.	C						
Pg-52	LM	Pg-74	LM						

1/ Isol.: Isolados; 2/C: Municípios de origem; 3/D: Damolândia, GO; 4/LV: Lavras, MG; 5/I: Ijaci, MG; 6/LM: Lambari, MG.

No Grupo IV encontram-se, também, os pares de isolados: Pg-09 (patótipo 63-31) e Pg-10 (patótipo 63-63), Pg-23 (patótipo 63-63) e Pg-24 (patótipo 63-63), que apresentaram maior similaridade genética (0,993). Destaca-se os isolados Pg-09 e Pg-10 que foram coletados infectando uma mesma cultivar, (Eriparsa), em plantas dentro de uma mesma parcela em campo experimental. Embora tenha sido detectada alta similaridade por meio de marcadores RAPD, existe diferença quanto ao padrão de virulência apresentado pelos isolados, sendo que no mesmo campo experimental ocorre variação entre os isolados. Elevada similaridade genética (0,992) foi detectada entre os isolados do patótipo 63-47 (Pg-01 e Pg-03), sendo os mesmos oriundos do município de Ijací e coletados sobre as cultivares CV-13 e ESAL-507. Em campos experimentais, ocorre fluxo contínuo de pessoas, o qual, certamente, propicia o transporte de esporos do fungo de um local para outro ou de uma cultivar para outra, propiciando alta disseminação do fungo no campo de produção.

O Grupo IV caracteriza-se pela ocorrência de isolados que foram coletados a partir de materiais do Programa Melhoramento de Feijão, realizado pela Universidade Federal de Lavras. Os hospedeiros caracterizam-se por apresentar constituição genética comum o que, provavelmente, também interfere na alta similaridade entre os isolados.

Três isolados (Pg-45, Pg-46 e Pg-47) formaram um subgrupo dentro do Grupo IV. Todos estes isolados pertencem ao patótipo 63-63 e foram coletados sobre uma mesma folha, porém, em lesões diferentes. Inicialmente, acreditava-se que a similaridade entre estes isolados seria a máxima, o que não aconteceu. Foi observada similaridade média de 0,964 entre os três isolados, indicando que podem ter ocorrido mecanismos de geração de variabilidade nestes isolados. Por outro lado, este resultado pode estar caracterizando uma possível contaminação advinda de outras parcelas, em virtude da intensa movimentação de pessoas entre as parcelas experimentais. Guzmán et al. (1999) observaram a ocorrência de isolados de origem mesoamericana e andina infectando uma mesma lesão, sugerindo que algumas lesões podem resultar da ação combinada de múltiplos conídios e que isolados de dois grupos de *P. griseola* podem coexistir em uma mesma folha.



O Grupo V é constituído por dois isolados (Pg-19 e Pg-59) coletados no município de Lavras, MG. Embora estes isolados tenham sido coletados em Lavras e no mesmo campo experimental, as safras de coleta foram diferentes; o Pg-19 foi coletado na safra da seca e o Pg-59 na safra das águas. Provavelmente, o isolado Pg-59 pode ter permanecido na área, sob restos culturais, após a colheita da safra anterior.

Cinco isolados, sendo três de Lavras e dois de Lambari, formaram o Grupo VI. Os isolados Pg-61 e Pg-64, embora tenham sido coletados infectando cultivares diferentes, Small White e VC-3, respectivamente, foram coletados em casa de vegetação no mesmo dia, o que pode justificar a alta similaridade (0,894) entre esses isolados. O Grupo VII foi formado por apenas dois isolados do município de Lambari.

Observando-se os agrupamentos gerados, pode-se fazer uma inferência, com cautela, a respeito dos mecanismos que propiciam o aumento da variabilidade neste patógeno. Percebe-se que, na maioria dos casos, como observado nos grupos I, II e IV, podem ter ocorrido eventos de mutação pontual em regiões diferentes das amplificadas via marcadores RAPD, pois apesar de comporem o mesmo grupo são classificados como patótipos diferentes. Outra possibilidade é a movimentação constante de pessoas no campo experimental, podendo transportar esporos de uma parcela a outra, no campo de produção.

Estudos sobre os mecanismos que geram essa variabilidade em *P. griseola* são escassos. Além disso, não há relatos sobre a ocorrência da forma sexual deste patógeno (BUSOGORO; JIJAKLI; LEPROIVE, 1999; MAHUKU et al., 2002a). Alguns mecanismos relatados por Burdon e Roelfs (1985), Drenth et al. (1996) e Leung, Nelson e Leach (1993) que levam ao aparecimento de diversidade dentro de populações do patógeno, são: mutações pontuais, migração e recombinação sexual. Adicionalmente, McDonald e Linde (2002) propõem a ocorrência de seleção e deriva genética como forças evolutivas que atuam sobre a população de patógenos. As forças seletivas podem ser impostas pelo grau de especialização das interações patógeno-hospedeiro, medida de controle e limitações ambientais (MAHUKU et al., 2002a). Estes fatores atuam

gerando diferenças na distribuição da variação fenotípica e genotípica entre os fitopatógenos, que podem levar à alta variação genética. É possível que esses fatores atuem isolados ou em conjunto, levando à ocorrência de novos patótipos e, conseqüentemente, aumentando os níveis de diversidade genética.

Em geral, a análise de agrupamento entre os isolados revelou a tendência de formação de grupos de acordo com o local de origem. Isso reforça a idéia de que o patógeno co-evolui com a população de hospedeiros do local e que ênfase deve ser dada ao monitoramento populacional na região específica de produção.

Levando-se em consideração o caráter patogenicidade, não foi possível observar relação direta entre esses e o agrupamento fornecido por marcadores RAPD. A probabilidade das regiões amplificadas estarem associadas aos locos para patogenicidade é praticamente nula. Isto pode ser atribuído ao fato de que marcadores moleculares são neutros e não dependem da interação que ocorre entre os alelos de avirulência, no patógeno e os alelos de resistência, na planta, a qual pode ser influenciada pelo tipo de inóculo e pelas condições ambientais (MAHUKU et al., 2002b). Resultado similar foi observado por Busogoro, Jijakli e Leproive (1999), Mahuku et al. (2002a,b) e Wagara et al. (2004).

## Diversidade genética

Os índices para cada município estão resumidos na Tabela 5. O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera que, quanto mais próximo o valor for de zero, menor é a diversidade. Os índices de diversidade variaram de 0,1156 (Ijaci, MG) a 0,3486 (Viçosa, MG). Estes valores, quando comparados aos relatados na literatura, para *P. griseola*, podem ser considerados altos. Esta diversidade pode ser explicada pelo amplo espectro de patogenicidade dos isolados mesoamericanos, os quais são capazes de infectar tanto as cultivares mesoamericanas quanto as

andinas. Foi possível visualizar, neste trabalho, índices de diversidade superiores ao obtidos por Wagara et al. (2004). Estes autores, ao estudarem a diversidade genética entre populações, mesoamericana, andina e afro-andina, de *P. griseola*, obtiveram os índices de diversidade: 0,231, 0,169 e 0,188, respectivamente. Silva (2004) estimou o índice de diversidade para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e observou que, para o estado de Minas Gerais, ele foi de 0,1894. Em média, este valor é inferior ao observado para o fungo *P. griseola*.

**Tabela 5.** Índices de diversidade de Shannon (D), amplitude, média e variância das similaridades genéticas para cinco municípios de coleta de isolados de *P. griseola*.

Municípios	D	Amplitude das similaridades	Média das similaridades	Variâncias das similaridades
Damolândia	0,2992	0,4810-0,9333	0,6969	0,0096
Ijaci	0,1156	0,4706-0,9932	0,8137	0,0126
Lambari	0,2955	0,3750-0,9400	0,7035	0,0101
Lavras	0,2787	0,3014-0,9933	0,7523	0,0140
Viçosa	0,3486	0,3750-0,8889	0,6690	0,0094

A maior média de similaridade (0,8137) foi observada para Ijaci, MG, indicando que a diversidade é menor neste local e corrobora com os dados de diversidade de Shannon. Resultado similar foi observado para Viçosa, MG em que a maior diversidade entre os isolados refletiu diretamente na menor média de similaridade (0,6690). Os resultados observados para média de similaridade e o índice de Shannon indicam uma correlação negativa, alta e significativa ( $r = -0,9487$ ), demonstrando que, quanto menor a média da similaridade, maior será a diversidade genética. Resultado similar foi observado por Silva (2004), o qual relatou uma correlação de -0,89, entre a média das similaridades e o índice de diversidade.

**Tabela 6.** Número e porcentagem de locos polimórficos e heterozigosidade esperada

Municípios	Nº de locos polimórficos	% de locos polimórficos	Heterozigosidade esperada
Damolândia	61	80,26	0,2777
Ijaci	48	63,16	0,1447
Lambari	60	78,95	0,3013
Lavras	76	100,00	0,3368
Viçosa	59	77,63	0,3741
Média	60,80	80,00	0,2869

Embora a amplitude e a variância das similaridades genéticas tenham sido maiores para o município de Lavras, MG, isto não refletiu diretamente na ampliação da diversidade genética, indicando que muitos isolados estão muito próximos geneticamente.

Na Tabela 6 são apresentadas algumas estatísticas descritivas estimadas por população (município). A maior porcentagem de locos polimórficos foi observada para o município de Lavras, enquanto a menor foi observada para o município de Ijaci.

A heterozigosidade esperada foi maior no município de Viçosa e menor no município de Ijaci. A maior estimativa da heterozigosidade para Viçosa deve ser observada com cautela, visto que apenas quatro isolados foram amostrados. Em média, 80,00% dos locos foram polimórficos e, considerando que todos os isolados deste estudo são de origem mesoamericana, pode-se fazer uma comparação com os estudos realizados na África por Wagara et al. (2004b), os quais identificaram maior percentual de locos polimórficos (91,6%) para isolados de origem mesoamericana.

A diversidade genética de Nei (1973) foi decomposta e verificou-se que a diversidade total entre as populações (municípios) foi de 0,3535 (HT), indicando que 35,35% dos isolados são únicos.

Uma análise da partição da diversidade genética, para todos os 76 locos polimórficos, apresentou uma moderada diferenciação genética entre as populações estudadas ( $G_{ST} = 0,1979$ ). Isso indica que, em média, 19,79% da variação genética observada neste estudo foi devido à diferenciação entre as populações, enquanto que 80,21% foi devido à variação dentro das populações. Wagara et al. (2004) subdividiram as populações de acordo com sua virulência e obtiveram estimativas similares, verificando que, entre os isolados estudados, 21,6% eram únicos e 9,3% da variação observada foi devido a diferenças entre as três populações estudadas, quando comparada a 90,7% da variação dentro das populações.

### **Análise de variância molecular**

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a ocorrência de variação genética. Na Tabela 7 encontra-se o resumo da análise de variância molecular dos resultados (50000 permutações) obtidos a partir de uma hierarquização feita em locais, em que cada local foi considerada como uma população.

A diferenciação genética existente entre os locais amostrados é altamente significativa ( $\Phi = 0,2249$ ,  $p < 0,000$ ), estando 22,49% da variação genética contida entre locais e 77,51% da variação existente encontra-se dentro dos locais (Tabela 7). Provavelmente, a maior parte da variação entre locais deve ter sido provocada pela presença dos isolados do município de Damolândia, GO, visto que este local é distante geograficamente e dos outros municípios do estado de Minas Gerais e não há troca de materiais entre esses locais. Percebe-se que estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, quando foi realizada a partição da diversidade de Nei (1973), nos quais foi observada uma maior variação dentro (80,21%), em detrimento da variação entre (19,79%). Estes resultados são similares aos apresentados por Mahuku et al. (2002a), os quais verificaram que a maior parte da diversidade (81%) resultou de diferenças existentes dentro de populações e 19% de diferenças entre populações.

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância molecular para cinco locais de ocorrência do fungo (*P. griseola*), analisados por marcadores RAPD.

F.V.	GL	SQ	Comp. de variância	% Total	$\Phi_{ST}$	P
Entre locais	4	206,593	3,2463	22,49	0,2249	0,000
Dentro de locais	65	727,079	11,1858	77,51		
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>933,672</b>	<b>14,4321</b>	<b>100,00</b>		

Wagara et al. (2004) verificaram um baixo nível de diferenciação genética entre populações. Em média, 90,7% da variação genética foi devido a diferenças dentro das populações e apenas 9,3% da variação foi devido a diferenças entre populações. Estes autores ressaltaram que uma possível ocorrência de recombinação parassexual pode ter proporcionado um aumento na diversidade dentro das populações.

Resultado aparentemente divergente foi observado por Stenglein e Balatti (2006) que, ao estudarem populações de isolados de *P. griseola* de origem andina e mesoamericana, verificaram que a maior parte da variação resultou de diferenças genéticas entre grupos (79,68%) em contraposição a 20,32% de diferença dentro do grupo. Os resultados de Stenglein e Balatti (2006) são esperados, pois, ao agrupar os isolados em seus conjuntos gênicos, torna-se evidente que as diferenças entre eles serão maiores que as diferenças dentro, devido à gama de hospedeiros que cada grupo tem a capacidade de infectar.

Estudo realizado com o patossistema *C. lindemuthianum*-*P. vulgaris* por Silva, Souza e Ishikawa (2007), no estado de Minas Gerais, mostrou que apenas 3,94% da variação estava contida entre as sub-regiões (Sul de Minas Gerais, Alto do Paranaíba e Zona da Mata) e 96,06% da variação está contida dentro das sub-regiões. Os autores ressaltaram a possibilidade do livre intercâmbio de sementes entre as sub-regiões, e que pode ter contribuído substancialmente para o incremento da variabilidade dentro em detrimento da variabilidade entre sub-regiões.

Fica, portanto, evidenciado que existe grande variação entre os isolados dentro de locais, o que fornece subsídios aos trabalhos que ressaltam o grande potencial deste fungo em gerar variabilidade.

Para entender melhor a estrutura populacional deste patógeno, foi realizada uma comparação par a par dos 76 locos polimórficos estudados, para três populações diferentes (Tabela 8). O maior e menor desequilíbrio gamético foi detectado para as populações coletadas no município de Lavras nas safras do inverno e da seca, na qual foram obtidos 2.175 (76,32%) e 1.658 (58,18%), respectivamente, valores de desequilíbrio gamético significativamente diferente de zero (teste de Fisher,  $P < 0,05$ ). O número de combinações dos locos foi de  $76(76-1)/2 = 2850$ . Portanto, existe desequilíbrio de ligação nas populações de *P. griseola* estudada, mostrando que este fungo mantém uma estrutura genética que é consistente com a reprodução assexuada (MCDONALD et al., 1994). Estes resultados dão suporte à observação da ausência de reprodução sexual em *P. griseola*. Segundo McDonald et al. (1994), o desequilíbrio gamético pode surgir do efeito do fundador, pressão de seleção e cruzamentos não aleatórios, incluindo reprodução assexuada. Devido ao pequeno tamanho das amostras, estes resultados devem ser interpretados com cautela.

Estes dados estão de acordo com os resultados apresentados por Mahuku et al. (2002a). Utilizando populações de origem andina e mesoamericana, estes autores obtiveram 81% dos valores de desequilíbrio significativamente diferente de zero, revelando que as populações de *P. griseola* reproduzem-se assexuadamente. O conhecimento da biologia de *P. griseola* indica que a reprodução assexuada é o principal mecanismo de reprodução (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997).

Uma questão importante a ser levantada é: qual a origem desta diversidade? Para um patógeno sem um ciclo sexual conhecido (LIEBENBERG; PRETORIUS, 1997), a diversidade não pode ser explicada pela recombinação sexual. McDonald e Linde (2002) propuseram a

existência de cinco forças evolutivas: mutação, deriva genética, fluxo gênico, reprodução e seleção. Mutações pontuais, como aberrações cromossômicas (deleções, translocações e perdas cromossômicas) (KLISTER; MIAO, 1992) e a presença de transposons (KEMPKEN; KÜCK, 1998), podem incrementar a variabilidade patogênica.

**Tabela 8.** Locais e safras de coleta dos isolados de *P. griseola* e desequilíbrio gamético para os 76 locos polimórficos estudados.

Locais	Safra/Ano	Nº de indivíduos	Desequilíbrio
Ijaci	Seca/2005	14	62,44%
Lavras	Inverno/2005	13	76,32%
	Seca/2005	18	58,18%

## Coclusões

Marcadores RAPD identificaram, eficientemente, elevada variabilidade entre os isolados de *P. griseola* estudados.

O fungo *P. griseola* mantém uma estrutura consistente com a reprodução assexual, visto que a maior parte da variação ocorre dentro das populações e as populações estão em desequilíbrio de ligação.



## Referências

- BURDON, J. J.; ROELFS, A. P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 8, p. 907-913, Aug. 1985.
- BUSOGORO, J. P.; JIJAKLI, M. H.; LEPROIVE, P. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., the causal agent of angular leaf spot of common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 559-569, Sep. 1999.
- DRENTH, A.; WHISSON, S. C.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A. G.; OBST, N. R.; RYLEY, M. J. The evolution of races of *Phytophthora sojae* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 2, p. 163-169, Feb. 1996.
- GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 37-42, jan. 1999.
- GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTAS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 600-607, May 1995.
- KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungifacts and perspectives. **BioEssays**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 652-659, Aug. 1998.
- KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.
- LEUNG, H.; NELSON, R. J.; LEACH, J. E. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: ANDREWS, J.; TOMMEROP, I. (Ed.). **Advances in plant pathology**. New York: Academic Press, 1993. v. 10, p. 157-205.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 2001, (d16c). Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em: 12 jun. 2007.
- LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Plant Protection**, Queenswood, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.
- LIN, T. P.; CHENG, Y. P.; HUANG, S. G. Allozyme variation in four geographical areas of *Cinnamomum kanehirae*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 88, n. 5, p. 433-438, Sep./Oct. 1997.

- MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 594-604, Oct. 2002a.
- MAHUKU, G. S.; HENRÍQUEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; BURUCHARA, R. A. Molecular markers dispute the existence of the afro-andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 580-589, June 2002b.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 1/2, p. 163-180, Jan. 2002.
- MCDONALD, B. A.; MILES, J.; NELSON, L. R.; PETTWAY, R. E. Genetic variability in nuclear DNA in field populations of *Stagonospora nodorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 250-255, Mar. 1994.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy Science United States of America**, Washington, v. 70, n. 17, p. 3321-3323, Aug. 1973.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 331-335, out./dez. 2002.
- NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A. DE; PAULA JR., T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G. DE; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijol comum en America Latina. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé Bogotá, v. 19, n. 1, p. 15-22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C.; SINGH, S. P. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 2, p. 161-171, 1998.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan. 1985.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York : Applied Biostatistics, 1992. 470 p.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York : Applied Biostatistics, 2000. 470 p.
- SAETTLER, A. W. Angular leaf spot. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St Paul, USA: APS Press, 1991. p. 15-16
- SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goias, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385-390, Aug. 2004.

- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2. 000**: a software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000. 1 v.
- SCHWARTZ, H. F.; CORREA, F. J.; PENEDA, P. A.; OTOYA, M. M.; KATHERMAN, M. J. Dry bean yields losses caused by *Ascochyta*, angular and white leaf spots in Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 494-496, June 1981.
- SILVA, K. J. D. e. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 241-247, Apr. 2007.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.
- STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 158-167, Apr./June 2006.
- WAGARA, I. N.; MWANG'OMBE, A. W.; KIMENJU, J. W.; BURUCHARA, R. A.; JAMNADASS, R.; MAJIWA, P. A. O. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as revealed by AFLP and Group-specific primers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 235-242, Apr. 2004.