

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

MARCELA COELHO

Sequenciamento de isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando as regiões ITS

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
OUTUBRO – 2014

MARCELA COELHO

Sequenciamento de isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando as regiões ITS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Celeste Gonçalves Vidigal.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
OUTUBRO – 2014

Aos meus pais Cicero Coêlho e Leni dos Santos Coêlho.
Às meninas Marciele Coêlho, Raquel Coêlho, Weza Coêlho André e ao menino
Antônio Miguel André.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, amparar-me nos momentos difíceis, dar força interior e sabedoria para superar os obstáculos da vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade concedida à realização deste curso de Mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão da Bolsa de Estudos durante o curso.

À professora doutora Maria Celeste Gonçalves-Vidigal, pela orientação e confiança.

Ao professor doutor Pedro Soares Vidigal Filho, que contribuiu para o meu crescimento profissional.

À professora doutora Marta Zulema Galván, pelos ensinamentos transmitidos, disponibilidade e paciência.

À professora doutora Cláudia Thomazella, pela disponibilidade e por estar presente na Banca Examinadora deste trabalho.

À doutora Lorena Lopes de Sousa, pela amizade e colaboração em todos os momentos.

À doutora Giselly Figueiredo Lacanallo, pela colaboração durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À mestranda Tamires Ribeiro, do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, por fornecer uma parte do material biológico para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Nupagri, pela ajuda e apoio.

Ao amigo Fabricio José Jaciani que, mesmo de longe, contribuiu com sua amizade e ensinamento.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARCELA COÊLHO, filha de Cicero Coêlho e Leni dos Santos Coêlho, nasceu em 15 de maio de 1981, na cidade de Campinas, estado de São Paulo.

Concluiu seus estudos do Ensino Fundamental em dezembro de 1996, na Escola Estadual Professor Adalberto Prado e Silva, na cidade de Campinas.

Em dezembro de 1999, concluiu o Ensino Médio na Instituição Escola Estadual Barão Geraldo de Rezende e, no ano de 2005, formou-se em Técnica Bioquímica, na Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado - ETECAP, na cidade de Campinas, onde, no período de dezembro de 2004 a agosto de 2005, realizou Estágio na Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB.

No ano de 2007, ingressou no curso de Ciências Biológicas, pela Instituição Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, na cidade de Araraquara, estado de São Paulo. No período de 2007 a 2009, fez estágio no Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, sob a orientação do Pesquisador Dr. José Belasque Júnior, onde desenvolveu o Trabalho de Conclusão de Curso com Diversidade genética de *Xanthomonas citri*, com ênfase em marcadores microssatélites. Graduou-se no ano de 2011 em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

No ano de 2011, na Universidade de Campinas - Unicamp, no Laboratório de Análise Genética e Molecular, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG, sob a orientação da professora doutora Anete Pereira de Souza, desenvolveu trabalho com o fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*, fazendo a genotipagem de microssatélites em sequenciador.

Em março de 2013, ingressou no Mestrado da Universidade Estadual de Maringá - UEM, na área de Genética e Melhoramento, realizando Pesquisa com sequenciamento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* que afeta o feijão comum, sob a orientação da professora doutora Maria Celeste Gonçalves-Vidigal.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Importância da cultura do feijão comum	4
2.2. Aspectos gerais da antracnose	5
2.3. Característica e variabilidade do fungo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	7
2.4. Regiões ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material biológico	19
3.2. Obtenção da massa micelial	20
3.3. Extração e quantificação do DNA	21
3.4. Amplificação das regiões ITS	21
3.5. Purificação dos fragmentos amplificados	22
3.6. Sequenciamento e análises das sequências das regiões ITS	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Identificação de SNPs – <i>Single nucleotide polymorphisms</i>	25
4.2. Similaridade e dissimilaridade	33
4.3. Agrupamentos	34
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

COELHO, Marcela, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, outubro de 2014. **Sequenciamento de isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando as regiões ITS.** Orientadora: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Conselheiros: Marta Zulema Galván e Lorena Lopes de Sousa.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc e Magnus) Briosi e Cavara, é uma das doenças mais severas que atacam o feijão comum no mundo. Uma das medidas mais eficientes para controlar esta doença é a utilização de cultivares resistentes, porém o surgimento de novas raças fisiológicas do fungo *C. lindemuthianum* representa um desafio para a utilização desta estratégia. Dentre as raças de *C. lindemuthianum* já relatadas, a raça 65 merece destaque, por ter sido identificada em vários países, incluindo o Brasil. Além disso, há registros de que isolados da raça 65, provenientes de diferentes localidades, apresentam variabilidade genética. Uma das técnicas para estudar a variabilidade genética em fitopatógenos envolve o sequenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico (rDNA). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65, provenientes de diversas regiões do Brasil, por meio do sequenciamento de regiões ITS. Um total de 17 isolados da raça 65, coletados nos estados do Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, foram estudados. Os resultados revelaram a existência de elevada variabilidade genética entre e dentro da raça 65. As análises das sequências dos 17 isolados da raça 65 apresentaram 11 SNPs nas regiões ITS, sendo que, na região ITS1, foram identificados 6 SNPs e, na região ITS2, 5 SNPs. A maior dissimilaridade genética foi observada entre os isolados 10 e 11, provenientes de Santa Catarina e, entre os isolados 3 e 11, do estado de Mato Grosso e Santa Catarina, respectivamente, cuja magnitude foi de 0,772. Por sua vez, os isolados mais similares foram o 2 e 7, com valor de distância genética de 0,002, os quais são oriundos do Mato Grosso e Santa Catarina, respectivamente. A árvore filogenética obtida com base nas sequências das regiões ITS1 e ITS2 revelou a formação de dois grupos bem definidos (Grupo I e II). O grupo I foi formado por 2 isolados provenientes de Santa Catarina e 1 isolado de cada um dos estados do Mato Grosso, São Paulo e Paraná. O grupo II apresentou a formação de dois

subgrupos, sendo um deles formado por 6 isolados de Santa Catarina, 3 isolados de São Paulo, 2 do Mato Grosso e 1 isolado de Minas Gerais, enquanto o segundo subgrupo foi composto por 1 isolado de Santa Catarina.

Palavras-chave: Antracnose, dissimilaridade genética, variabilidade genética.

ABSTRACT

COELHO, Marcela, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, October 2014. **Sequencing of isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* race 65 using the ITS regions.** Adviser: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Committee Members: Marta Zulema Galván and Lorena Lopes de Sousa.

Anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc and Magnus) Briosi and Cavara, is one of the most severe fungal diseases that attack common bean. An effective method to control anthracnose in common bean is to use resistant cultivars, but the emergence of new physiological races of *C. lindemuthianum* is a challenge to implement this strategy. Among the *C. lindemuthianum* races, the race 65 stands out for having been identified in several countries, including Brazil. In addition, there are several records that isolates of race 65 from different locations, present genetic variability. One of the techniques to study genetic variability in pathogens involves the sequencing of ITS regions (Internal Transcribed Spacer) of the ribosomal DNA (rDNA). Thus, the objective of this study was to characterize isolates of *C. lindemuthianum* race 65 from different regions of Brazil, through the sequencing of ITS regions. A total of 17 isolates of race 65, collected in the states of Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina and São Paulo were studied. The results revealed the existence of high genetic variability among and within the race 65. The sequence analysis of 17 isolates of race 65 showed the presence of 11 SNPs (single nucleotide polymorphism) in the ITS regions. In the ITS1 region were identified the presence of 6 SNPs, while in the ITS2, 5 SNPs were identified. The largest genetic dissimilarity was observed among isolates 10 and 11 from Santa Catarina state and among isolates 3 and 11 from Mato Grosso and Santa Catarina states, respectively, which value was 0.772. On the other hand, the most similar isolates were 2 and 7 (genetic distance of 0.002) collected in Mato Grosso and Santa Catarina states, respectively. The phylogenetic tree obtained from the ITS1 and ITS2 sequences, revealed the presence of two well-defined groups (Group I and II). Group I consisted of 2 isolates from Santa Catarina and 1 isolate each of the states Mato Grosso, São Paulo and Paraná. Group II was composed of two subgroups, one being formed by 6 isolates from Santa Catarina, 3 isolates from São Paulo, 2 from Mato Grosso and 1

isolated from Minas Gerais, while the second subgroup consisted of 1 isolate from Santa Catarina.

Keywords: Anthracnose, genetic dissimilarity, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante fonte proteica e energética para a população brasileira (Vieira et al., 1983; Borém e Carneiro, 1998). Considerado um dos alimentos mais completos para a dieta humana, o feijão comum possui altos teores de proteína, fibra, ferro, carboidratos complexos, vitaminas e minerais, principalmente zinco e ferro (Angioi et al., 2010; Carvalho et al., 2012). Da mesma forma, o feijão comum está entre as culturas leguminosas de maior expressão econômica no mundo (Broughton et al., 2003).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão comum (FAO, 2015). Na safra 2014/15, os três estados maiores produtores dessa leguminosa foram o Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso (Conab, 2015).

A cultura do feijão comum se adapta a diferentes condições edafoclimáticas, permitindo com que o seu cultivo seja realizado em várias épocas do ano, e em quase todos os estados brasileiros (Yokoyama et al., 1996). Entretanto, a ampla adaptabilidade desta cultura favorece a ocorrência de pragas e doenças que comprometem a produtividade da mesma (Vieira et al., 1998).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc e Magnus) Briosi e Cavara, é uma das doenças mais severas que afetam a cultura do feijão comum no Brasil e no mundo. As perdas na produtividade, devido à incidência da antracnose, podem alcançar níveis de até 100%, em condições ambientais favoráveis (Singh e Schwartz, 2010).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para controlar a antracnose no feijão comum, como a rotação de culturas, controle químico e uso de cultivares resistentes, as quais podem ser executadas de forma integrada ou com caráter preventivo (Rey et al., 2005). O método mais eficiente indicado para o controle da antracnose é a utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a ampla variabilidade patogênica do fungo *C. lindemuthianum* faz com que o desenvolvimento de cultivares de feijão comum, com resistência ampla e duradoura, seja dificultado (Pastor-Corrales et al., 1993; Sicard et al., 1997).

O fungo *C. lindemuthianum* possui ampla variabilidade patogênica, o que justifica um elevado número de raças fisiológicas existentes, impedindo que a resistência genética de cultivares seja mantida por períodos longos de tempo. Sendo

assim, há necessidade constante de desenvolver novas cultivares com resistência às raças emergentes do fungo causador da antracnose (Rava et al., 1994; González et al., 1998; Somavilla e Prestes, 1998; Alzate-Marin et al., 1999; Mahuku et al., 2002; Sartorato, 2002). A variabilidade genética dentro da espécie *C. lindemuthianum* pode ser o resultado de fatores citoplasmáticos, da heterocariose, mutação, parassexualidade, recombinação sexual, polimorfismos cromossômicos e transposons (Sartorato, 2002).

Para os programas de melhoramento genético é de extrema importância o entendimento da variabilidade e evolução patógeno-hospedeiro, pois permitem o conhecimento das raças incidentes nas diferentes regiões de cultivo e o desenvolvimento de cultivares com ampla resistência (Rodríguez-Guerra et al., 2003).

De acordo com Nunes et al. (2013), foram relatadas em todo o mundo 247 raças de *C. lindemuthianum*, das quais 73 estão presentes no Brasil. A raça 65 foi encontrada em 12 estados. O estado do Paraná apresentou a maior variabilidade, com 44 raças do patógeno identificadas, enquanto que o segundo estado com maior variabilidade patogênica foi Minas Gerais com 27 raças do patógeno, seguidos por Santa Catarina, Mato Grosso e São Paulo com 22, 11 e 9 raças, respectivamente.

A raça 65 de *C. lindemuthianum* merece destaque, devido a sua alta frequência e ser amplamente distribuída no Brasil. A raça 65 foi primeiramente reportada no estado do Mato Grosso, em 2009, em estudo conduzido por Gonçalves-Vidigal e colaboradores, com isolados provenientes do município de Primavera do Leste, importante região produtora de feijão comum deste estado.

Estudos revelam que esta raça apresenta uma grande variação de patogenicidade entre diferentes isolados estudados, evidenciando a variabilidade genética dentro da raça 65 (Alzate-Marin et al., 2007; Davide e Sousa, 2009). A incidência da raça 65 tem sido constatada em diversas regiões do Brasil, principalmente nos estados de Goiás, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (Carbonell et al., 1999; Thomazella et al. 2002; Alzate-Marin e Sartorato, 2004; Damasceno e Silva et al., 2007; Gonçalves-Vidigal et al., 2008).

Balardin et al. (1997) identificaram a raça 65 de *C. lindemuthianum* nas Américas do Sul, Norte e Central e, devido a sua elevada incidência em vários

países, ela pode ser considerada como uma raça de ocorrência generalizada, principalmente em isolados provenientes do Brasil e dos Estados Unidos.

Devido à raça 65 ser considerada uma das mais disseminadas no Brasil, por muito tempo, os programas de melhoramento buscaram cultivares resistentes a essa raça por meio da introgressão do gene *Co-2*, antigamente designado gene “*Are*”, presente na cultivar Cornell 49-242 (Mastenbroek, 1960; Adam-Blondon et al., 1994).

Os estudos fenotípicos vêm demonstrando a existência de variabilidade entre e dentro de raças em *C. lindemuthianum* (Alzate-Marin et al., 2001; Balardin et al., 1997). Assim, estudos que envolvem análises moleculares, tais como o sequenciamento do genoma, podem estimar a variabilidade genética de forma eficiente.

A amplificação das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico (rDNA) via PCR e posterior sequenciamento, é uma das formas mais eficientes para estimar a variabilidade genética em fungos. O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um cluster gênico, que é repetido centenas de vezes no genoma, no qual estão presentes os genes 18S, 5.8S e o 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (Fungaro, 2000).

Estudos conduzidos por Fungaro (2000) revelaram que a análise da variação de diferentes níveis taxonômicos tem sido permitida, pelo fato desse cluster gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis. A região 18S é a mais conservada e, por isso, é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados; já a porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies.

Mediante a importância da raça 65 de *C. lindemuthianum*, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65 provenientes de diversas regiões do Brasil por meio de sequenciamento de regiões ITS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da cultura do feijão comum

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie leguminosa pertencente à Família Fabaceae, Gênero *Phaseolus*, Subtribo Phaseoleae e Subfamília Faboideae (Papilionoideae) (Freytag e Debouck, 2002). O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, sendo cinco delas cultivadas: *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum), *P. lunatus* var. *lunatus* (feijão de lima), *P. coccineus* (feijão Ayocote), *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* (feijão tepari) e a espécie *P. polyanthus* (Vieira, 1988; Zimmermann e Teixeira, 1996). Entre as leguminosas, o feijão comum é considerado a terceira cultura mais importante, depois da soja e do amendoim (Lin et al., 2008).

O *Phaseolus vulgaris* L. é uma espécie que foi domesticada em dois centros de origem geograficamente diferentes: Mesoamericano (México e América Central) e Andino (América do Sul) (Ansari et al., 2004). No centro de origem Mesoamericano, predominam os genótipos de grãos pequenos, onde a proteína faseolina do tipo 'S' é predominante, enquanto que no centro de origem Andino encontram-se feijões de sementes graúdas, constituídas principalmente por proteína faseolina do tipo 'T'. No centro de origem Andino foram encontrados também os tipos de faseolina 'A', 'C' e 'H' (Gepts, 1988; Singh et al., 1991; Haley et al., 1994; Gepts et al., 2008; Burle et al., 2010).

Estudos baseados em isoenzimas, proteínas de sementes, características morfológicas, e marcadores de DNA comprovam que a domesticação de *P. vulgaris* ocorreu de forma independente, nos conjuntos gênicos Andino e Mesoamericano (Gepts e Debouck, 1991; Gepts, 1998). Os conjuntos gênicos Andinos e Mesoamericanos são geralmente distinguidos em coleções de feijão comum, pelos diferentes padrões de dados moleculares (Gepts, 1988; Koenig e Gepts, 1989; Pallottini et al., 2004; Kwak e Gepts, 2009) e morfológicos (Singh et al., 1991). Uma das consequências do processo de domesticação foi a ocorrência de raças ecogeográficas em cada um dos conjuntos gênicos (Singh et al., 1991; Beebe et al., 2000; Díaz e Blair, 2006).

O feijão comum é considerado um dos produtos agrícolas de maior importância econômica e social, por ser cultivado em grandes áreas e empregar grande quantidade de mão de obra durante seu ciclo (Vieira et al., 1999). Além disso, é a leguminosa mais importante para o consumo humano direto, sendo uma importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) para a dieta humana, especialmente nos países em desenvolvimento (Beebe, 2012).

O Brasil foi responsável por produzir 2,9 milhões de toneladas de feijão comum, no ano de 2013, destacando-se como o segundo maior produtor mundial dessa cultura, com destaque para a Índia como maior produtor (3,30 milhões de toneladas) (FAO, 2015). Os principais produtores mundiais de feijão comum são também os maiores consumidores, fazendo com que o excedente a ser exportado seja pequeno.

O feijão comum é um produto básico da alimentação brasileira e cultivado por pequenos e grandes produtores em todas as regiões (MAPA, 2014). Na safra de 2014/2015 os maiores produtores foram os estados do Paraná, com 771 mil toneladas em uma área plantada de 422 mil hectares, Minas Gerais, com a produção de 589 mil toneladas em área plantada de 365 mil hectares e Mato Grosso, com 525 mil toneladas em área plantada de 323 mil hectares que, juntos, contribuem com 56% da produção nacional, com destaque para o Paraná, que participa em 23% do total nacional (Conab, 2015).

O feijão comum é cultivado durante todo o ano, sob diferentes temperaturas, intensidade de luminosidade, umidade relativa e disponibilidade de água. Estas condições favorecem o desenvolvimento de muitos patógenos tais como fungos, vírus, bactérias e nematóides (Paula Júnior e Zambolin, 2006).

2.2. Aspectos gerais da antracnose

A antracnose do feijão comum é uma das principais doenças fúngicas do feijão comum, especialmente onde as condições ambientais são favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, ocasionando perdas na produtividade de até 100%, quando são utilizadas cultivares suscetíveis (Talamini et al., 2006; Damasceno e Silva et al., 2007).

O *C. lindemuthianum* é um patógeno cosmopolita e, portanto, encontra-se amplamente distribuído nas regiões de cultivo do feijão comum (Bianchini et al., 2005). A antracnose ocorre de forma mais severa em locais onde predominam umidade relativa acima de 91% e temperaturas amenas que variam entre 18° e 22°C. O desenvolvimento do patógeno é limitado em temperaturas superiores a 24°C e inferiores a 18°C (Cháves, 1980; Kelly et al., 1994).

Rey et al. (2005) qualificam a antracnose causada pelo patógeno *C. lindemuthianum* como a doença fúngica da parte aérea mais agressiva ao feijão comum, devido às perdas econômicas proporcionadas e a eficiência da transmissão deste patógeno via sementes.

Os sintomas da antracnose aparecem nos órgãos aéreos da planta como folhas, vagens e sementes, que são infectados geralmente por esporos (Bianchini et al., 2005). Quando afeta as plântulas, lesões pequenas de coloração marrom ou preta podem ser observadas nos cotilédones (Kimati, 1995). O hipocótilo pode apresentar pequenas lesões deprimidas com manchas de coloração marrom escura e se estendem por quase toda a planta. As lesões apresentadas no pecíolo e no caule são ovaladas, deprimidas e de coloração escura (Vieira et al., 1983).

Nas vagens, as lesões apresentam-se de forma arredondada e deprimida; nas folhas, iniciam-se na fase abaxial, ao longo das nervuras, com manchas de cor café-avermelhada e, posteriormente, escuras e necrosadas. Nas sementes, as lesões se apresentam deprimidas, de cor marrom com bordas escuras (Kimati et al., 1997).

A disseminação da doença pode ocorrer através de vários agentes como, por exemplo, a chuva e o vento. O livre comércio de grãos entre produtores e a reutilização das sementes para futuros plantios em uma mesma área, acarreta em aumento no potencial de inóculo do patógeno de uma safra para outra, facilitando a ampla distribuição de raças fisiológicas do fungo causador da antracnose (Thomazella et al., 2000). O controle da antracnose é dificultado devido à capacidade de sobrevivência do fungo durante vários meses, no solo e em restos culturais infectados (Sutton, 1992; Dillard e Cobb, 1993).

Para um eficiente controle da antracnose, são recomendadas medidas integradas, com destaque para a utilização de sementes livres do patógeno e tratadas com fungicidas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras por

período de 2 a 3 anos, resistência varietal e controle químico (Rava et al., 1994). Entretanto, a existência de inúmeras raças, além da ampla variabilidade patogênica observada entre e dentro de raças de *C. lindemuthianum* (Ishikawa et al., 2008; Davide e Souza, 2009) dificultam o controle do referido patógeno.

A resistência varietal é considerada a forma mais eficiente para o controle da antracnose do ponto de vista econômico, entretanto, a ampla variabilidade genética de *C. lindemuthianum* proporciona a quebra de resistência de cultivares recomendadas, ainda nos primeiros cultivos (Andrus e Wade, 1942; Balardin et al., 1990).

2.3. Característica e variabilidade do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*

O agente causal da antracnose do feijão comum foi primeiramente descrito em 1878 por Saccardo e Magnus, como *Gloeosporium lindemuthianum*, baseado em coletas feitas por Lindemuth em Bonn, na Alemanha (Zaumeyer e Thomas, 1957; Bailey e Jeger, 1992). Scribner em 1888, ao verificar a presença de setas (estruturas filamentosas produzidas entre os conidióforos e as margens dos acérvulos) nos esporos do fungo causador da antracnose em feijão comum, transferiu-o para o gênero *Colletotrichum*. Sendo assim, Than et al. (2008) considera o *Colletotrichum* pertencente ao Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Sordariomycetes; Ordem: Phyllachorales e Família: Phyllachoraceae.

Este fungo afeta um grande número de plantas leguminosas, tais como *Phaseolus acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *Vicia faba* e *Vigna unguiculata*. No entanto, a infecção mais severa é observada principalmente em plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* (Kimati, 1980).

O *C. lindemuthianum* apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita. A fase assexuada produz conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo (Sutton, 1992). Os conídios são hialinos, unicelulares, circulares e podendo ser oblongos. Os esporos germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o hospedeiro, sendo a esporulação abundante com uma massa de conídios de coloração rosada (Cháves, 1980). O aparecimento dos sintomas da antracnose pode ser observado no início da infecção, a partir do sexto dia após a inoculação (Kimati et al., 1997).

O fungo *C. lindemuthianum* é um patógeno necrotrófico, que geralmente, sobrevive de uma safra a outra sob a forma de micélio dormente ou como esporos em restos culturais ou no interior das sementes, promovendo sua perpetuação e a sua ampla disseminação a longas distâncias (Vieira et al., 1983). Já a sua disseminação a curta distância ocorre por meio dos respingos de água da chuva, pela ação do homem, do vento, dos animais, dos insetos e da utilização de implementos agrícolas que entram em contato com as plantas infectadas (Kimati, 1980).

A fase sexuada, conhecida como *Glomerella cingulata* f. (Stonem Spaulde e V. Schrenk) sp. *phaseoli*, pertence à classe dos Ascomicetos e ordem Diaportales. Os esporos sexuais ou ascósporos são resultantes dos processos de plasmogamia (fusão celular), seguidos de cariogamia (fusão nuclear) e divisão meiótica. São produzidos em corpos de frutificação denominados peritécios, os quais possuem formato mais ou menos arredondado, localizados dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco (Bergamin Filho et al., 1995).

Embora a fase sexuada seja difícil de ser naturalmente visualizada, é possível ser observada por meio de indução ou por desenvolvimento espontâneo (Roca et al., 2003; Mendes-Costa e Souza, 2005; Camargo Júnior et al., 2007). Damasceno e Silva et al. (2007) identificaram no estado de Minas Gerais, pela primeira vez, a forma sexuada de *Glomerella cingulata* f. (Stonem Spaulde e V. Schrenk) sp. *phaseoli* na natureza.

Segundo McDonald e Linde (2002), os patógenos que apresentam dois ciclos sexuais possuem uma vantagem sobre os patógenos que apresentam apenas um ciclo sexual ou assexual. Isto se deve ao fato de que, durante o ciclo sexual, muitas combinações novas de alelos são produzidas. Na fase assexual, um mecanismo que pode estar gerando variação dentro de uma população é a ocorrência do ciclo parassexual. Para isso, é necessária a formação de anastomoses entre hifas, que são fusões entre as células, onde ocorre a transferência de citoplasma e, conseqüentemente, do material genético.

Rodríguez-Guerra et al. (2003) estudaram grupos de anastomoses de amostras de *C. lindemuthianum* provenientes de plantas individuais de cultivares de feijão comum, através de marcadores moleculares, sendo este o primeiro relato sobre grupos de anastomoses em *C. lindemuthianum*. Após esta descoberta, vários

grupos de anastomoses foram identificados, sugerindo que este pode ser um mecanismo que leva à formação de diferentes linhagens clonais de *C. lindemuthianum*. Assim, apesar da estrutura populacional ter revelado que o ciclo reprodutivo do *C. lindemuthianum* é predominantemente assexual, há indícios de que em algum ponto durante o ciclo do hospedeiro, o patógeno se reproduza sexuadamente. Freire et al. (2005) determinaram grupos de anastomoses entre isolados de raças diferentes.

Em estudo realizado por Castro-Prado et al. (2007) para avaliar a ocorrência do ciclo parassexual em isolados de *C. lindemuthianum*, foi possível verificar a ocorrência de anastomose e a formação de heterocariose entre os isolados.

Os primeiros estudos sobre a variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* foram realizados por Barrus (1911), o qual verificou reações de suscetibilidade diferenciada nas cultivares de feijão comum Michelite, Perry Marrow e Michigan Dark Red Kidney, quando inoculadas com isolados de diferentes procedências. Foram identificadas duas raças distintas do patógeno, as quais foram posteriormente denominadas raças Alfa e Beta. Posteriormente, Burkholder (1923) identificou uma terceira raça descrita como Gama.

Em 1931, na Alemanha, 14 raças fisiológicas foram caracterizadas, e designadas de A a E, de G a N e X (Pesuer citado por Pastor-Corrales, 1988), sendo posteriormente diferenciadas por Schreiber (1932) em três grupos principais, Alfa, Beta e Gama. Andrus e Wade (1942), na Carolina do Norte, denominaram uma quarta raça como Delta. Yerkes Júnior e Ortiz (1956) no México constataram a presença de três grupos de raças desconhecidas, os quais foram denominados de Mexicano I, II e III. Blondet (1963) identificou a raça Épsilon e Cruickshank (1966) na Austrália, identificou as raças 1, 2 e 3.

Fouilloux (1975) identificou a raça Alfa-Brasil e Schnock et al. (1975) relataram a raça Ebnet (devido ao seu local de origem), que posteriormente foi renomeada de Kappa (Krüger et al., 1977). Uma mutação da raça Alfa, originalmente conhecida como Alfa 5N, originou a raça Lambda, descrita por Hubbeling (1976). Fouilloux (1979) relatou a raça Lambda mutante. No ano de 1984 a raça Épsilon foi identificada no Canadá (Tu, 1984).

No Brasil, os primeiros estudos quanto à ocorrência do *C. lindemuthianum*, foram realizados em 1966 por Kimati, no estado de São Paulo, que constatou a

existência das raças Alfa, Delta e grupo Mexicano II. Nesta mesma época, as raças Alfa e Beta foram identificadas a partir de isolados coletados no Rio Grande do Sul por Augustin e Costa (1971).

No estado do Paraná, a ocorrência do grupo Alfa foi relatada pela primeira vez por Araújo (1973); no mesmo ano, um novo grupo de raças foi determinado como Grupo Brasileiro I, no Rio Grande do Sul, por Oliveira et al. (1973), no estado de Minas Gerais, por Oliari et al. (1973) e em São Paulo, por Paradela Filho e Pompeu (1975).

Posteriormente, Hernández-Godinez et al. (1998) mencionaram a identificação de 93 patótipos de *C. lindemuthianum*, dentre os quais, 41 ocorriam no México. Estudos realizados por Balardin et al. (1997) e Mahuku e Riascos (2004) demonstraram a identificação de aproximadamente 114 raças nas regiões produtoras de feijão no mundo.

Flor (1971) propôs a teoria gene a gene, segundo a qual, para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência, podendo este ser um fator que dificulte o melhoramento do feijão comum, pois pode ser necessário um conjunto de diversos genes para a obtenção da resistência completa ao patógeno.

O elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética do fungo *C. lindemuthianum* evidenciam uma ampla diversidade de virulência (Pereira et al., 2010). Segundo Borém et al. (2007), raça é uma população que apresenta uma ou mais características peculiares que a distinguem de outras populações da mesma espécie.

Segundo Nunes et al. (2013), foi verificada a ocorrência de 247 raças de *C. lindemuthianum*, distribuídas por 28 países; destas, apenas 76 ocorrem em mais de um país; o restante das raças é restrito a cada região. Diferentes grupos de pesquisadores estudavam a variabilidade patogênica em todo o mundo; tal fato gerava uma grande dificuldade na troca de informações, devido a diferenças nas metodologias e nomenclaturas utilizadas para a caracterização do patógeno (Alzate-Marin et al., 2001). Assim, surgiu a necessidade de utilizar uma metodologia padrão para a identificação e denominação das raças.

O método de identificação das cultivares foi proposto por Pastor-Corrales (1991), determinando a padronização de 12 cultivares diferenciadoras e o uso de um

sistema binário apresentado por Habgood (1970). Para tanto, cada cultivar diferenciadora recebeu um valor binário, qual seja, 2^{n-1} . O valor 2 representa o número de classes de reações consideradas (resistente ou suscetível) e “n” é função da ordem das diferenciadoras. As reações de resistência ou suscetibilidade apresentadas pelas cultivares recebem, respectivamente, os valores zero e um.

Em estudos realizados por Carbonell et al. (1999), com isolados da mesma raça, demonstraram que há diferenças de virulência entre eles, sugerindo que o conjunto das 12 cultivares diferenciadoras propostas por Pastor-Corrales (1991) ainda não é o suficiente para diferenciar a diversidade entre os patótipos.

Mahuku e Riascos (2004) utilizaram 200 isolados amostrados de regiões com predominância de genótipos Andinos e Mesoamericanos e identificaram 90 raças, revelando que o fungo *C. lindemuthianum* é um patógeno altamente diversificado, e as 12 cultivares diferenciadoras tiveram sua resistência quebrada. Ishikawa et al. (2011) propôs um conjunto de diferenciadoras capaz de identificar variações dentro da raça 65. Para o estudo foi utilizado um total de 12 linhagens de feijão comum e 12 isolados classificados como raça 65. Para a identificação da variabilidade, foram sugeridas as seguintes linhagens de feijão comum: Estilo, Majestoso, Supremo, União, Valente, Ouro Vermelho, Madrepérola e Talismã, sendo todas essas cultivares bem adaptadas para as condições brasileiras e são comercialmente disponíveis, o que facilita a sua utilização.

Nos programas de melhoramento, a utilização das cultivares diferenciadoras para a antracnose pode levar a uma complicação, pois estas cultivares podem ser resistentes a certas raças e suscetíveis a outras. Desta forma, a cada nova raça que surge, cultivares resistentes podem tornar-se suscetíveis (Vieira et al., 1999).

Pastor-Corrales et al. (1993) sugerem um processo evolutivo separadamente para as regiões Mesoamericanas e Andinas, devido à preferência dos isolados de *C. lindemuthianum* pertencentes a uma região pelas cultivares desta mesma região; este fato explica a presença de maior diversidade de fenótipos de virulência, uma vez que evidências morfológicas e moleculares demonstram que a diversidade existente nos genótipos Mesoamericanos é maior do que os Andinos.

A existência de coevolução entre raças de *C. lindemuthianum* e a origem de seu hospedeiro *P. vulgaris* sugere que isolados originados de genótipos mesoamericanos tendem a ser mais agressivos em plantas de origem

mesoamericana e isolados andinos mais agressivos em plantas andinas (Gepts, 1988). Singh et al. (1991) e Beebe et al. (2000) observaram maior variabilidade genética do conjunto gênico Mesoamericano, quando comparado ao conjunto gênico Andino.

A interação entre o feijão comum e as raças fisiológicas do fungo *C. lindemuthianum* evidenciam uma paralela organização da diversidade genética que presumivelmente surgiu por meio da coevolução entre os dois organismos (Guzmán et al., 1995). Balardin e Kelly (1998) estudaram a interação entre origem do hospedeiro e origem do patógeno, utilizando 62 genótipos de feijão comum procedentes do Brasil, República Dominicana, Honduras, México, Inglaterra e Estados Unidos e classificados nos dois conjuntos gênicos Andinos e Mesoamericanos e 34 raças distintas de *C. lindemuthianum* procedentes da Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Honduras, México, Peru e Estados Unidos. Os autores observaram que as raças Mesoamericanas eram virulentas nos genótipos Andinos e Mesoamericanos, e que as raças Andinas foram altamente virulentas em genótipos Andinos. Melotto e Kelly (2000) relatam que o fato do germoplasma ter vindo de ambos os conjuntos gênicos e serem suscetíveis às raças Mesoamericanas, é porque essas raças apresentam maior diversidade patogênica.

O Brasil se destaca como um dos países com maior variabilidade patogênica pela grande quantidade de raças encontradas. De acordo com Nunes et al. (2013), o Brasil possui 73 raças do patógeno, distribuídas em 15 estados; a raça 65 está presente em 12 estados. A raça 65 tem sido relatada como uma das raças mais frequentes e amplamente distribuída em diversos países, tais como Brasil, Estados Unidos, México, Argentina, Equador, África e Índia, com maior destaque nos últimos 30 anos (Pastor-Corrales et al., 1994; Rava et al., 1994; Koch, 1996; Balardin et al., 1997; Balardin e Kelly, 1998; Sharma et al., 1999; Thomazella et al., 2000; Thomazella et al., 2002; Alzate-Marin e Sartorato, 2004; Mahuku e Riascos, 2004; Talamini et al., 2004; Bonett et al., 2008; Gonçalves-Vidigal et al., 2008; Gonçalves-Vidigal et al., 2009; Muth e Liebenberg, 2009; Pinto et al., 2010; Nunes et al., 2011). Em consequência disso, os programas de melhoramento têm concentrado sua atenção nesta raça, visando ao controle da antracnose (Davide e Souza, 2009).

Vários trabalhos vêm demonstrando que a raça 65, anteriormente conhecida como Épsilon (Grupo Alfa), merece destaque, devido a sua alta frequência e ampla distribuição geográfica (Rava et al., 1994; Carbonell et al., 1999; Sartorato, 2002; Alzate-Marin e Sartorato, 2004; Talamini et al., 2004).

No estudo realizado por Thomazella et al. (2000), no estado do Paraná, com as raças 7, 31, 69, 65, 73, 81, 87, 89 e 95 de *C. lindemuthianum*, os autores relataram que dentre as 12 diferenciadoras, apenas seis foram resistentes a todos os isolados, sendo que, das cultivares Mesoamericanas, apenas Michelite, México 222 e Cornell 49-242 foram suscetíveis e, das Andinas, apenas Kaboon foi resistente a todas as raças estudadas. As raças 65 e 73 foram virulentas em diferentes cultivares Mesoamericanas, porque foram isoladas de cultivares pertencentes ao conjunto gênico Mesoamericano, mostrando, dessa maneira, a especialização do patógeno ao conjunto gênico do hospedeiro *P. vulgaris*.

Alzate-Marin e Sartorato (2004) identificaram, através de uma pesquisa, que as raças 65, 73 e 81 são as mais frequentes e amplamente distribuídas no Brasil, e são comumente encontradas nos estados do Paraná, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal.

Visando à caracterização de isolados de *C. lindemuthianum* coletados na América do Sul, América Central, Europa e África, por meio de marcadores AFLP para análise da variabilidade patogênica e genética, Ansari et al. (2004) relataram que a maioria dos isolados foram divididos em dois grupos, e que os isolados da Europa e África, em menor número, foram mais similares geneticamente aos isolados da América Central.

Mahuku e Riascos (2004), em análises via Rep-PCR (*DNA sequence of repetitive-elements*) e RAMS (*Random Amplified Microsatellites*), em 200 isolados provenientes do pool gênico do feijão comum, e coletados em diversos países, mencionaram não haver diferenças genéticas marcantes entre isolados andinos e mesoamericanos para serem agrupados em grupos distintos.

Santos et al. (2008) relataram variabilidade patogênica dentro dos isolados da raça 65, 73 e 81, inoculando-se dois isolados da mesma raça em 37 cultivares de feijão comum. Segundo os autores, estes resultados evidenciaram uma elevada variabilidade do patógeno, sugerindo a existência de novas raças ou sub-raças que

não são capazes de serem detectadas através da série de cultivares diferenciadoras atual.

Estudos conduzidos por Balardin et al. (1990), Gonçalves-Vidigal et al. (2008) e por Pinto et al. (2012) demonstraram que isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum*, coletados no estado de Santa Catarina e Minas Gerais, apresentaram predominância nas regiões. Neste contexto, Vidigal Filho et al. (2007), avaliando landraces de feijão comum coletadas no estado do Paraná, inoculadas com raças Andinas e Mesoamericanas de *C. lindemuthianum*, observaram que a raça 65 apresentou maior nível de patogenicidade, quando comparada às outras raças.

Santos et al. (2008) verificaram que os isolados da raça 65, provenientes de Santa Catarina, foram mais virulentos do que isolados da raça 65 coletados no estado de Goiás. Segundo Davide e Souza (2009), há uma grande variação quanto à patogenicidade, quando se inoculam diferentes isolados pertencentes à mesma raça 65 em cultivares comerciais, evidenciando a variabilidade dentro da raça.

O'Sullivan et al. (1998) utilizaram técnicas como eletroforese em campo pulsado, citometria de fluxo e perfil telomérico avaliado por hibridização para a observação da variação e organização do cariótipo molecular de 18 isolados de *C. lindemuthianum*. Os resultados mostraram que o número de cromossomos estimado variou de 9 a 12 dentre os isolados testados e que o tamanho do genoma dessa espécie é altamente variável.

Ainda segundo O'Sullivan et al. (1998), a análise do genoma por eletroforese em campo pulsado mostrou que os cromossomos dessa espécie podem ser divididos em duas classes de tamanhos distintos: um grupo de cromossomos maiores que 7 Mb (milhões de pares de base) e outro grupo formado por um número variável de pequenos cromossomos, menores que 2,5 Mb. Quando foram considerados os dados de citometria de fluxo, variações de até 59% foram encontradas. Parte dessa variabilidade da organização do genoma pode ser explicada pela presença ou ausência, em uma dada linhagem, de regiões genômicas dispensáveis e ou de cromossomos inteiros.

O genoma dos fungos pode apresentar alguns elementos como translocações, duplicações, inversões e deleções, sendo estes responsáveis por novas recombinações. Estas novas sequências presentes no genoma de fungos

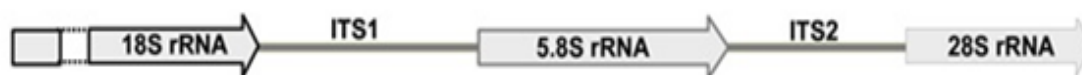
podem promover reorganizações, encontrados dispersos em várias cópias no genoma (Fierro e Martín, 1999).

No estudo da diversidade genética de muitos organismos, dentre eles os fungos, ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas. Uma dessas ferramentas moleculares é o uso do sequenciamento de regiões conservadas, como as denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer* - Espaçador Interno Transcrito) e IGS (*Intergenic Spacer Region*) do DNA ribossomal (rDNA), que têm sido utilizadas para estabelecer relações de filogenia molecular dentro de muitos grupos de fungos (Stewart et al., 1999).

2.4. Regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

As regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) são uma parte não codificante do DNA situado entre dois genes que codificam componentes estruturais de RNAs ribossomais: 18S codifica a pequena subunidade e o 28S a grande subunidade (Baldwin, 1992). Em organismos eucariotos, a unidade do rDNA é constituída de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e três não gênicas (ITS1, ITS2 e IGS).

As regiões ITS (Figura 1) contêm sequências de DNA que codificam o RNA ribossômico. Em fungos, essas regiões apresentam-se como um cluster gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5.8S e o gene 28S. A região ITS é dividida em ITS1, localizado entre os genes 18S e 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S; as regiões ITS1 e ITS2 são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (Hillis e Dixon, 1991; Schlotterer et al., 1994).



Fonte: Embong et al. (2008).

Figura 1 - Representação esquemática dos genes ribossomais e das regiões ITS.

As sequências ITS em fungos envolvem uma sequência de 600 a 800 pares de bases, as quais são amplificadas utilizando primers universais, que são complementares às sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA (White et al., 1990; Córdoba et al., 2002).

As regiões dos genes ribossomais dentro de uma determinada espécie são conservadas, e as sequências espaçadoras ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento. Por esta razão, a variação nas sequências espaçadoras tem sido usada para identificar espécies ou linhagens de fungos, realizar estudos de hibridização e, como marcadores, podem ser usados em estudos genéticos de populações (Hillis e Dixon, 1991; Gomes et al., 2002).

Outra característica importante da região ITS deve-se à natureza repetitiva do rDNA, que torna esta região fácil de amplificar, mesmo a partir de amostras pequenas, diluídas ou altamente degradadas (Gardes e Bruns, 1993). O desenvolvimento de iniciadores de táxon específico é baseado em regiões ITS, devido a essas regiões serem consideradas diferenciadas e serem usadas como sondas (McCartney et al., 2003).

Em fungos, a maioria dos estudos filogenéticos fundamentados em sequências de DNA foram baseados exclusivamente no gene ribossomal ou nas regiões ITS1 e ITS2 (Kausserud et al., 2004).

Neste contexto, com base na variabilidade das regiões ITS, Sicard et al. (1997) agrupou 128 isolados de *C. lindemuthianum* coletados na Argentina, Equador e México, em dois grupos distintos. Balardin et al. (1999), baseando-se em estudos das sequências de DNA das regiões ITS1, ITS2 e do gene rRNA 5.8S mencionaram níveis variáveis de dissimilaridade genética entre 14 isolados de *C. lindemuthianum*.

Chen et al. (2007), utilizando os primers ITS4 e C1F4 em análise de sequências de regiões ITS de sementes e folhas de feijão infectadas com *C. lindemuthianum*, verificaram que as sequências ITS de seis raças (17, 23, 31, 73, 89 e 1096) e o isolado MAFF 305390 (acesso nºAB087222 do GenBank) foram idênticos, e as sequências ITS da raça 2, e as linhagens BBA65483 (acesso nº AJ301958 do GenBank), CBS 151.28 (acesso nºAJ301946 do GenBank) e CBS 151.28 (acesso nºAJ301947 do GenBank) também foram idênticas. De acordo com os autores, houve três substituições de bases quando comparou a sequência ITS das seis raças e o isolado do GenBank e a sequência da raça 2 com os isolados do GenBank.

Portanto, visando estudos comparativos utilizando marcadores moleculares como ferramentas úteis aos estudos genéticos, as regiões ITS podem gerar um

grande número de informações para inferências filogenéticas, as quais podem fornecer uma medida mais acurada das distâncias genéticas entre as espécies, ou até mesmo isolados de uma mesma espécie (Lee e Taylor, 1992). Segundo Schoch et al. (2012), a análise filogenética tem sido considerada uma abordagem extremamente útil na determinação de espécies de *Colletotrichum* e outros fungos filamentosos, baseada em sequências das regiões ITS do rDNA.

Estudos têm demonstrado o potencial de outros marcadores, como os SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) que identificam regiões onde ocorrem variações frequentes (mudanças de uma base por meio de inserções ou deleções de um nucleotídeo específico) que estão presentes no genoma (Useche et al., 2001).

A informação gerada por SNPs poderá, posteriormente, ser utilizada em vários níveis nas análises como: marcadores no mapeamento genético; material de estudo na identificação de SNPs funcionais e seu respectivo fenótipo; ferramenta para estudos populacionais, por comparação do genoma de indivíduos de diferentes populações (Zhang e Hewitt, 2003). Adicionalmente, os marcadores SNPs têm se destacado por ocorrerem em um número bastante expressivo (Ganal et al., 2009) e revelaram ser úteis na identificação de divergência adaptativa de populações e espécies estreitamente relacionadas (Renaut et al., 2010).

Como resultados do sequenciamento, há quatro sequências do genoma de *Colletotrichum* disponíveis no domínio público: *C. higginsianum* e *C. graminicola* sequenciados por O'Connell et al. (2012); *C. orbiculare* e *C. gloeosporioides* sequenciados por Gan et al. (2013).

Além disso, o sequenciamento do genoma e montagem de um conjunto selecionado de cepas de *C. acutatum* está em curso através de investigação conjunta. A gama do hospedeiro de *C. higginsianum* inclui o sistema de modelo de *Arabidopsis thaliana* e muitas culturas de crucíferos (Kleemann et al., 2012), enquanto que *C. graminicola* é praticamente limitado ao milho (*Zea mays*). Os genomas dessas duas espécies possuem tamanhos semelhantes: 57,4 Mb de *C. graminicola* e 53,4 Mb para *C. higginsianum*.

Genomas de fungos codificam uma gama de biomoléculas como, por exemplo, metabolitos secundários, pequenos peptídeos, toxinas, enzimas e carboidratos, que estão ligados à patogenicidade e especificidade de hospedeiros. Estudos recentes de sequenciamento do genoma de *C. higginsianum* e *C.*

graminicola registraram um número relativamente alto de fatores de virulência em ambas as espécies (O'Connell et al., 2012).

Outro projeto concluído de sequenciamento do *Colletotrichum* envolveu dois fungos patogênicos de importância econômica: *C. orbiculare* essencialmente relacionado a cucurbitáceas e *Nicotiana benthamiana* e *C. gloeosporioides* com uma ampla gama de hospedeiros. *C. orbiculare* apresenta o genoma de tamanho 88,3 Mb, muito maior em comparação com outras espécies de *Colletotrichum*, incluindo *C. gloeosporioides* que possui o tamanho de 55,6 Mb (Gan et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento de Feijão Comum e de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa Aplicada a Agricultura (Nupagri), pertencente à Universidade Estadual de Maringá.

Um total de 17 isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* foram utilizados no presente trabalho. Os isolados são provenientes de isolamentos realizados em material vegetal com sintomas de antracnose, coletados nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

Dentre os 17 isolados, 12 pertencem à micoteca do Laboratório de Melhoramento de Feijão Comum e de Biologia Molecular, e cinco isolados são oriundos do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. Os isolados pertencentes à raça 65 encontram-se descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, identificação e locais de coleta

Isolado	Identificação do Isolado	Município	Estado
1	CI 65-01	Primavera do Leste	Mato Grosso
2	CI 65-02	Primavera do Leste	Mato Grosso
3	CI 65-03	Primavera do Leste	Mato Grosso
4	UFV 65-01	-	Minas Gerais
5	CI 65-04	Maringá	Paraná
6	CI 65-05	Guatambú	Santa Catarina
7	CI 65-06	Guatambú	Santa Catarina
8	CI 65-07	Ponte Serrada	Santa Catarina
9	CI 65-08	Ponte Serrada	Santa Catarina
10	CI 65-09	Campos Novos	Santa Catarina
11	CI 65-10	Campos Novos	Santa Catarina
12	CI 65-11	Ituporanga	Santa Catarina
13	CI 65-12	Botucatu	São Paulo
14	CI 65-13	Jaú	São Paulo
15	CI 65-14	Botucatu	São Paulo
16	CI 65-15	Campinas	São Paulo
17	CI 65-16	Campos Novos	Santa Catarina

Na construção do diagrama de similaridade e comparação da sequência consensus, foram utilizadas sequências obtidas no banco de dados GenBank - NCBI

BLAST (Altschul et al., 1997). Estas sequências foram selecionadas por apresentarem alta similaridade, variando de 90 a 100%, com os isolados da raça 65 presentes neste trabalho (Quadro 2).

Quadro 2 - Isolados, espécies, identificação e número de acesso no GenBank das sequências obtidas do banco de dados

Isolados	Espécies	Identificação dos isolados	Nº de acessos – GENBANK
18	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 2	EU400129
19	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 17	EU400130
20	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 23	EU400131
21	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 31	EU400132
22	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 73	EU400133
23	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 89	EU400134
24	<i>Glomerella lindemuthiana</i>	Race 1096	EU400135
25	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	R23	KF414695
26	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	R23.19	KF414696
27	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Rec15	KF414697
28	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	R2047	KF414694
29	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	MAFF 303590	AB087222
30	<i>Colletotrichum trifolii</i>	BBA70709	AJ301941
31	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	MAFF 306685	AB269941
32	<i>Glomerella lagenaria</i>	BBA71046	AJ301965

Fonte: GenBank - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

3.2. Obtenção da massa micelial

As culturas monospóricas de *C. lindemuthianum* foram primeiramente repicadas para placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) (Menezes e Silva-Hanlin, 1997) e incubadas em câmara de crescimento BOD 20 ± 2°C por um período de 12 dias. Em seguida, discos de esporos (ascósporos) foram repicados e transferidos para erlenmeyers, contendo meio líquido BD (batata e

dextrose), conforme metodologia proposta por Kado e Heskett (1970). Posteriormente, foram incubados a 22°C por 15 dias em agitação constante (90 rpm) em agitador automático. A massa micelial produzida foi, então, filtrada em gaze esterilizada, lavada com água destilada autoclavada e seca com o auxílio de papel filtro autoclavado. Após secagem, o micélio foi embalado em papel alumínio, sendo devidamente identificado e armazenado à temperatura de -20°C.

3.3. Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA da massa micelial foi realizada conforme o protocolo SDS modificado, proposto por Cárdenas et al. (2012). Posteriormente, o teste de qualidade foi realizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com 10 µL de solução de DNA (5 µL de DNA + 5 µL de corante azul bromofenol - *Loading buffer*). A quantificação do DNA foi realizada em fluorímetro Quant-iT™ e diluído com TE para uma concentração final de 40ng/µL. Após a diluição, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C, para posteriores reações.

3.4. Amplificação das regiões ITS

As regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram submetidas a PCR para a amplificação, utilizando os iniciadores ITS1F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990). A escolha do iniciador ITS1F foi devido a este ser específico para fungos, de acordo com Gardes e Bruns, 1993.

As amplificações foram realizadas em termociclador Techne, modelo TC-412; o programa utilizado foi nas seguintes condições: uma fase de desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguidos por 30 ciclos, consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 s, uma etapa de anelamento a 55-58°C por 15 s e uma etapa de extensão a 72°C por 15 s e, por fim, uma extensão final de 72°C por 7 min e mantidas em 4°C. Para cada reação foram utilizados os componentes conforme estão descritos no Quadro 3. Desta forma, a reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 4 µL da reação de PCR e 3 µL de corante *Loading buffer*.

Quadro 3 - Condição ótima de reação de amplificação do DNA e respectivas concentrações

Reagentes	Concentração do estoque	Volume (μL)	Concentração final
H ₂ O ultra pura	–	26,8	–
Buffer	10X	5,0	1X
MgCl ₂	50 mM	3,0	3 mM
dNTPs	100 mM	5,0	0,2 mM
Iniciador ITS1F	100 mM	2,5	5 mM
Iniciador ITS4	100 mM	2,5	5 mM
<i>Taq</i> polimerase	5U/ μL	0,2	1U
DNA	–	5,0	40ng
TOTAL	–	50,0	–

Um marcador de 100 pb foi utilizado (*Ladder - Invitrogen*) como padrão. O gel foi submetido a um campo elétrico, até a completa migração do DNA. Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com sybr® safe e as amplificações foram visualizadas sob luz UV e fotografadas com o sistema de fotodocumentação L-PIX Image EX Model (Loccus Biotecnologia, Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

3.5. Purificação dos fragmentos amplificados

Os produtos de amplificação correspondentes às regiões ITS do rDNA dos isolados de *C. lindemuthianum* foram purificados utilizando-se o Kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento. Após a purificação, os fragmentos de DNA foram fracionados em gel de agarose a 2%, contendo 1 μL de corante *Loading buffer* e 4 μL dos produtos purificados, utilizando 4 μL do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder e 1 μL de Loadind Dye, para a visualização da qualidade.

3.6. Sequenciamento e análises das sequências das regiões ITS

No sequenciamento das regiões ITS do rDNA foi utilizado o Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Duas reações foram feitas por amostra: uma utilizando o iniciador ITS1F e outra o iniciador ITS4 para sequenciamento da fita complementar.

O volume total da reação por amostra foi de 7,5 µL, contendo 5 µL do produto purificado e 2,5 µL de cada iniciador (Forward e Reverse), adicionados em tubos de 0,2 mL. As amostras foram enviadas para sequenciamento, no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

As sequências foram obtidas pelo uso do sequenciador ABI 3730 DNA Analyser com a tecnologia Life Technologies – Applied Biosystems. Após o sequenciamento, através do Programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (Hall, 1999), cada sequência foi editada para a visualização da sequência do DNA e, após a inversão da sequência complementar, esta foi alinhada para gerar o arquivo de sequência FASTA, para análise posterior.

Estas sequências FASTA foram utilizadas para encontrar homologia de até 100% com as sequências obtidas no banco de dados GenBank, através do Programa Mega 5.2.2 (Tamura et al., 2011), mediante a opção BLAST, para posterior alinhamento das sequências múltiplas.

Os alinhamentos das sequências múltiplas foram processados no Programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5, para a comparação de dados das sequências, que permitiu posicionar e identificar as diferenças como SNPs. Posteriormente, mediante o programa Mega 5.2.2 procedeu-se a construção da árvore filogenética, com um “bootstrap” de 10.000 replicações pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987). Na construção da matriz de distâncias utilizou-se do método de Tamura et al. (2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos de PCR obtidos através da amplificação das regiões ITS1, gene 5.8S e ITS2 do rDNA, dos isolados de *C. lindemuthianum* apresentaram fragmentos com tamanho de 600 pares de base (pb) (Figura 2). Resultados similares foram obtidos na amplificação de regiões ITS de isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de várias localidades dos continentes americano e europeu (Balardin et al., 1999).

As sequências de DNA das regiões ITS obtidas dos 17 isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65 foram comparadas às sequências de outros organismos disponíveis em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que propiciou a obtenção das relações filogenéticas entre os isolados obtidos. A ferramenta BLAST foi utilizada para esta comparação (Altschul et al., 1997). As regiões ITS1 e ITS2 apresentaram um tamanho de 154 e 159 nucleotídeos, respectivamente. A região 5.8S apresentou tamanho de 159 nucleotídeos. Através do BLAST foi possível observar similaridade de 99% entre os 17 isolados e entre os isolados obtidos no BLAST.

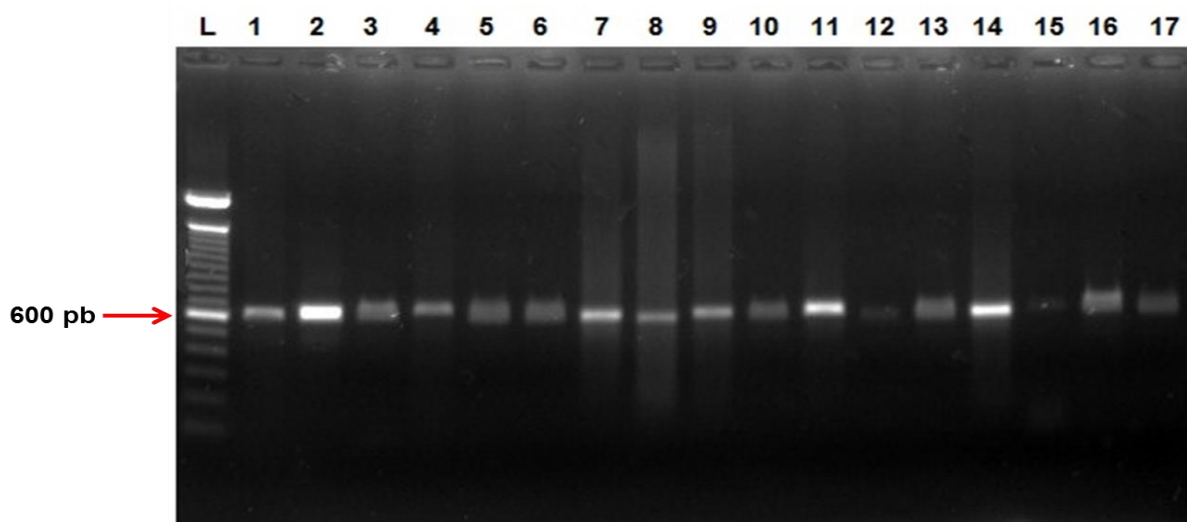


Figura 2 - Produtos de PCR amplificados das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 dos 17 isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65. L: Ladder 100 pb; isolados 1 a 3: estado do Mato Grosso; isolado 4: Minas Gerais; isolado 5: Paraná; isolados 6 a 12: estado de Santa Catarina; isolados 13 ao 16: estado de São Paulo; isolado 17: Santa Catarina.

As sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 dos 17 isolados da raça 65 que foram geradas pelos dados de sequenciamento, foram comparadas com as

sequências obtidas do banco de dados do GenBank que apresentaram, no mínimo, 90% de similaridade (Figura 3).

4.1. Identificação de SNPs – *Single nucleotide polymorphisms*

A Figura 3 apresenta os resultados do alinhamento das sequências de DNA dos 17 isolados da raça 65 analisados no presente estudo e as sequências obtidas do GenBank. A sequência da raça 23 foi escolhida como referência, porque apresentou 100% de similaridade com os isolados 2, 6, 7, 10 e 11 pertencentes à raça 65 e 99% de similaridade com os demais 12 isolados presentes neste estudo.

Na região ITS1 o isolado 3 do estado do Mato Grosso apresentou um SNP na posição 79, onde ocorreu a troca de **C** por **T**. O isolado 8 de Santa Catarina, apresentou 3 SNPs, uma troca de **C** por **A** na posição 83, uma troca de **G** por **T** na posição 119 e uma troca de **G** por **A** na posição 199. O isolado 4 do Paraná apresentou um SNP na posição 120, onde ocorreu a troca de **G** por **C** e o isolado 14 de São Paulo apresentou 3 SNPs, uma troca de **G** por **T** na posição 119, uma troca de **A** por **G** na posição 156 e uma troca na posição 199 de **G** por **A**. As sequências dos isolados 9, 12, 15, 17, Raça 2, isolados R23 e R23.19 apresentaram na região ITS1 um SNP, sendo na posição 119, onde ocorreu a troca de **G** por **T**. Considerando a posição 199 na Figura 3, observa-se que os isolados 9, 12, 13, 15, Raça 2, R23 e R23.19 apresentaram um SNP na região ITS1, ocorrendo a troca de **G** por **A**.

Balardin et al. (1997) reportaram que isolados pertencentes à mesma raça fisiológica de regiões distintas podem apresentar variabilidade genética. Analisando a figura 3, verificamos na região ITS2 a troca de **C** por **A**, na posição 501, nas sequências dos isolados 8, 9, 12, 14, 15, 17, Raça 2, R23 e R23.19. O isolado 4 do Paraná na posição 480 apresentou uma troca de **G** por **A** e o isolado 16 de São Paulo apresentou 3 SNPs, um na posição 435, uma troca de **C** por **G**, na posição 436, uma troca de **G** por **A** e na posição 470 uma troca de **A** por **C**.

Resultados similares foram obtidos por Balardin et al. (1999) que, ao analisarem sequências de 14 isolados de *C. lindemuthianum* detectaram variabilidade na região ITS2. Os referidos autores observaram que isolados de *C. lindemuthianum*, com o mesmo fenótipo de virulência, diferiram quanto à

variabilidade molecular como, por exemplo, as raças 7, 17, 31 e 73, coletadas em diferentes localidades da Argentina, Brasil, Canadá, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Honduras, México, Holanda, Peru e Estados Unidos.

O Quadro 4 apresenta um resumo com as posições dos SNPs que foram identificados nas regiões ITS1 e ITS2 dos isolados da raça 65 e das sequências obtidas do GenBank. Os isolados 9 e 12 do estado de Santa Catarina e o isolado 15 de São Paulo apresentaram os mesmos SNPs nas posições 119, 199 e 501.

Os isolados 1, 2, 5, 6, 7, 10, 11, Raça 17, Raça 23, Raça 31, Raça 73, Raça 89, Raça 1096, Rec15, R2047 e MAFF 303590 não exibiram a presença de SNPs; portanto, não se observou divergências entre eles e entre os demais isolados.

Quadro 4 - SNPs identificados nas sequências das regiões ITS dos isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* e das sequências obtidas do GenBank

Posição	Isolados Raça 65											Raça 2	Isolado R23	<i>Glom. lagenaria</i>	<i>Coll. trifolii</i>	SNP		
	Raça 23	3	4	8	9	12	13	14	15	16	17							
58	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T/C
79	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C/T
80	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	A/T
83	C	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C/A
119	G	-	-	T	T	T	-	T	T	-	T	T	T	T	T	T	-	G/T
120	G	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/C
199	G	-	-	A	A	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	G/A
435	C	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C/G
436	G	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G/A
470	A	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	A/C
480	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/A
501	C	-	-	A	A	A	-	A	A	-	A	A	A	A	A	A	-	C/A
519	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A/C

Os isolados 1 e 2, pertencentes ao estado de Mato Grosso, foram similares entre si, enquanto que o isolado 3 obteve 1 SNP na região ITS1 diferente dos demais isolados da raça 65. Os isolados 1, 2 e 3 são provenientes do mesmo Município, o que demonstra ocorrer variabilidade genética no fungo *C. lindemuthianum*, mesmo quando oriundos da mesma região.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Race 23	1	AGGGATCATT	ACTGA			GTT	TACGCTCTAT	AACCCCTTGT	GAACATACCA	AACCGTTGCT	TCGGCGGGCG
1	1	TCATTA.TGA									
2	1	TAAC.AGG.C	T.C.TTGGTG	AACCAGCGGA	GGGATCATT	CTGA					
3	1	GATC..T.C.	GA						T		
4	1	TAACGAAGG.	CA.C.CGTTG	GTGAACCAGC	GGAGGGATCA	TTACTGA					
5	1	TAAC.AGG.C	T.C..TTGGT	GAACCAGCGG	AGGGATCATT	ACTGA					
6	1	.ACA.GGTC.	C.GTTGGTGA	ACCAGCGGAG	GGATCATTAC	TGA					
7	1	TAAC.AGG.C	T.C.TTGGTG	AACCAGCGGA	GGGATCATT	CTGA					
8	1	.TCAT.AC.G							A		
9	1	.TCAT.AC.G									
10	1	GATC..T.C.	GA								
11	1	C..AGGG..C	.T.ACTGA								
12	1	.TCAT.AC.G									
13	1	GC..GGGA.	CA.T.CTGA								
14	1	.TCAT.AC.G									
15	1	.TCAT.AC.G									
16	1	GTAAACAAGG.	CTCCGTTGGT	GAACCAGCGG	AGGGATCATT	ACTGA					
17	1	.TCAT.AC.G									
Race 2	1	CA.CGGAGGG	.TCATTACTG	A							
Race 17	1	.TCAT.AC.G									
Race 31	1	G..ATCAT.A	CTGA								
Race 73	1	G..ATCAT.A	CTGA								
Race 89	1	.CT..									
Race 1096	1	G..ATCAT.A	CTGA								
Isolate R23	1										
Isolate R23.19	1	CT.A									
Isolate Rec15	1	CT.A									
Isolate R2047	1										
Isolate MAFF:303590	1	GA									
Coll. orbiculare	1	.CT..							T		
Glom. lagenaria	1	.CT..							T		
Coll. trifolii	1	TATCGA							T		

		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Race 23	69	GGAGGTCCGC	CTCCCCCGG	CCCCGCTCGC	GGGCGCCCCG	CCGGAGGAAA	ACCCAACTCT	ATTTTAACGA	CGTCTCTTCT	GAGTGGCACA	AGCAAATAGT
1	64										
2	98										
3	66										
4	101		C								
5	99										
6	97										
7	98										
8	65		T								A
9	65		T								A
10	66										
11	72										
12	65		T								A
13	73										A
14	65		T								A
15	65		T				G				A
16	99										A
17	65		T								A
Race 2	75		T								A
Race 17	65										
Race 31	68										
Race 73	68										
Race 89	59										
Race 1096	68										
Isolate R23	55										A
Isolate R23.19	58		T								A
Isolate Rec15	58										
Isolate R2047	55										
Isolate MAFF:303590	56										
Coll. orbiculare	59		C.	G..CGCTCG	C..GCG..C	G.C.GA.G..	AA.CCAA..	C..A.TTTA..	A.GTC..	TCTGA.TGGC	CA.GCA.A
Glom. lagenaria	59		C.	G..CGCTCG	C..GAG..C	G.C.GA.G..	AA.CCAA..	C..A.TTTA..	A.GTC..	TCTGA.TGGC	CA.GCA.A
Coll. trifolii	60		C.	G..CGCTCG	C..GCG..C	G.C.GA.G..	A..CCAA..	C..A.TTTA..	A.GTC..	TCTGA.TGGC	CA.GCA.A

		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Race 23	169	C AAAACTTTT	AACAACGGAT	CTCTTGGTTC	TGGCATCGAT	GAAGAACGCA	GCGAAATGCG	ATAAGTAATG	TGAATTGCAG	AAATTCAGTGA	ATCATCGAAT
1	164
2	198
3	166
4	201
5	199
6	197
7	198
8	165
9	165
10	166
11	172
12	165
13	173
14	165
15	165
16	199
17	165
Race 2	175
Race 17	165
Race 31	168
Race 73	168
Race 89	159
Race 1096	168
Isolate R23	155
Isolate R23.19	158
Isolate Rec15	158
Isolate R2047	155
Isolate MAFF:303590	156
Coll. orbicularis	159	A.TC.AAAC	TTT...AACG	GATC.CT.GG	TCTGG.ATC	T...GAAC	..AGCGAAAT	GCG.TA.G.A	ATGTGAATT	C.GAATTCAG	TGA...ATCG
Glom. lagenaria	159	A.TC.AAAC	TTT...AACG	GATC.CT.GG	TCTGG.ATC	T...GAAC	..AGCGAAAT	GCG.TA.G.A	ATGTGAATT	C.GAATTCAG	TGA...ATCG
Coll. trifolii	160	A.TC.AAAC	TTT...AACG	GATC.CT.GG	TCTGG.ATC	T...GAAC	..AGCGAAAT	GCG.TA.G.A	ATGTGAATT	C.GAATTCAG	TGA...ATCG
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Race 23	269	CTTTGAACGC	ACATTGCGCC	CGCCAGCATT	CTGGCGGGCA	TGCCGTGTTG	AGGCTCATT	CAACCCTCAA	GCACCGCTTG	GCGTTGGGGC	TTCCACGGCT
1	264
2	298
3	266
4	301
5	299
6	297
7	298
8	265
9	265
10	266
11	272
12	265
13	273
14	265
15	265
16	299
17	265
Race 2	275
Race 17	265
Race 31	268
Race 73	268
Race 89	259
Race 1096	268
Isolate R23	255
Isolate R23.19	258
Isolate Rec15	258
Isolate R2047	255
Isolate MAFF:303590	256
Coll. orbicularis	259	AA.CTTTGAA	CGCACATTG	GC..GC..GC	A.TCT..CGG	GCATGCC.GT	TCGAG.G.CA	TTT.AAC.CT	CA.G.A.CGC	TT.GC.TT.G	GG.TT.CA.G
Glom. lagenaria	259	AA.CTTTGAA	CGCACATTG	GC..GC..GC	A.TCT..CGG	GCATGCC.GT	TCGAG.G.CA	TTT.AAC.CT	CA.G.A.CGC	TT.GC.TT.G	GG.TT.CA.G
Coll. trifolii	260	AA.CTTTGAA	CGCACATTG	GC..GC..GC	A.TCT..CGG	GCATGCC.GT	TCGAG.G.CA	TTT.AAC.CT	CA.G.A.CGC	TT.GC.TT.G	GG.TT.CA.G



Figura 3 - Alinhamento das seqüências das regiões ITS (direção 5'-3') dos isolados de *C. lindemuthianum*. (.) Indica similaridade em relação à raça 23; (~) Indica introdução de gap. As seqüências do ITS1, gene 5.8S e ITS2 encontram-se na posição: 48-201, 202-360 e 361-519, respectivamente.

Estudos conduzidos por Talamini et al. (2006) demonstraram a presença de variabilidade genética entre e dentro de isolados pertencentes à raça 65 provenientes do estado de Minas Gerais. Da mesma forma, Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006) relataram que um isolado da raça 65 superou a resistência da cultivar BAT93, a qual diferiu da raça 65, utilizada por Alzate-Marin et al. (2007), para o qual BAT93 mostrou resistência.

Ao comparar a sequência das regiões ITS1 e ITS2 do isolado R23.19 com as sequências dos isolados 8, 9 e 12 do estado de Santa Catarina, constatou-se que estes isolados são similares. As sequências da raça 2047 foram similares às sequências dos isolados 5 do estado do Paraná e os isolados 6, 7, 10 e 11 do estado de Santa Catarina, demonstrando a existência de similaridade entre os diferentes isolados. Resultados similares foram obtidos por Moriwaki et al. (2002), em estudos envolvendo o isolado MAFF 305390.

O isolado 16 do estado de São Paulo apresentou apenas um SNP na região ITS2 e, dessa forma, se mostrou divergente de todos os isolados da raça 65 e as demais sequências obtidas no BLAST. Por sua vez, o isolado 4 do estado de Minas Gerais obteve 1 SNP na região ITS1 e 1 SNP na região ITS2, sendo este isolado dissimilar a todos os isolados.

O gene 5.8S apresentou uma troca de nucleotídeo nos isolados 9 (**T** por **G** na posição 266) e 16 (**C** por **A** na posição 296) dos estados de Santa Catarina e São Paulo, respectivamente. Os isolados de Santa Catarina, 6 e 7 do município Guatambú, 10 e 11 do município Campos Novos, foram similares entre si, e os isolados 8 e 9 do município Ponte Serrada e o isolado 12 de Ituporanga, apresentaram as mesmas divergências entre os demais isolados da raça 65; apenas o isolado 8 apresentou um SNP na região ITS1, que evidencia a presença da variabilidade genética dentro da raça 65.

A espécie *Colletotrichum orbiculare*, seu teleomorfo *Glomerella lagenaria* e a espécie *Colletotrichum trifolii* apresentaram 99% de similaridade com os isolados 1 e 3 do estado de Mato Grosso e isolado 6 de Santa Catarina, porém apresentaram inserção de 3 nucleotídeos na região ITS1, podendo esta diferença ser observada na Figura 3.

De acordo com Liu et al. (2007), a espécie *Colletotrichum orbiculare* que causa antracnose em cucurbitáceas e o *C. lindemuthianum* apresentam uma estreita

relação filogenética, porém são diferentes quando comparado o DNA mitocondrial. Todos os membros do grupo *Colletotrichum* são caracterizados por conídios reto, curtos e largos e com pequeno apressório (Sutton, 1980), porém, divergências ocorreram com relação à classificação de *C. lindemuthianum*, devido ao alto nível de diferenciação na morfologia dos esporos. Mordue (1971) e Cannon et al. (2000) caracterizaram os conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* como longo e estreito de vários tamanhos, enquanto Sutton (1980) relatou conídios curtos, largos e esféricos no grupo *Colletotrichum*, que são universalmente considerados típicos do complexo *orbicular*.

A maior variabilidade entre os 17 isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65 foi observada na região ITS1. De um total de 11 SNPs detectados, seis SNPs ocorreram na região ITS1, enquanto cinco alterações de nucleotídeos foram encontradas na região ITS2. Sherriff et al. (1994; 1995) encontraram resultados similares em relação à região ITS2, comparando espécies de *Colletotrichum*.

4.2. Similaridade e dissimilaridade

Os resultados das análises das sequências ITS, tendo como base a metodologia proposta por Tamura et al. (2011), com o auxílio do Programa Mega, demonstraram que a maior distância genética ocorreu entre os isolados 10 e 11 da raça 65, provenientes de Santa Catarina, cuja magnitude foi de 0,772 (Quadro 5). Elevada dissimilaridade também foi observada entre os isolados 3 e 11, oriundos do Mato Grosso e de Santa Catarina, respectivamente, da mesma magnitude de 0,772. Por sua vez, os isolados mais similares foram 2 e 7, coletados no Mato Grosso e em Santa Catarina, cuja distância genética foi de 0,002 (Quadro 5). Estes resultados permitem concluir que existe ampla variabilidade genética entre e dentro da raça 65 de *C. lindemuthianum*.

Davide e Souza (2009) realizaram um estudo para avaliar a variação patogênica dentro da raça 65. Seis isolados coletados no estado de Minas Gerais foram inoculados nas 12 cultivares diferenciadoras para a antracnose e em sete cultivares comerciais, para avaliar a resistência genética. As sete cultivares comerciais utilizadas apresentavam-se ora como resistentes ora como suscetíveis à

raça 65, dependendo do isolado inoculado, evidenciando a existência da variação patogênica dentro da raça 65.

Os isolados 15 do estado de São Paulo e 9 do estado de Santa Catarina apresentaram distância de 0,004. Os isolados 15 e 8, respectivamente, coletados em São Paulo e em Santa Catarina e os isolados 15 e 14, coletados em São Paulo, apresentaram distância de 0,006. Três isolados da raça 65 coletadas no estado de Santa Catarina (8, 9 e 12) e dois de São Paulo (14 e 15) apresentaram as distâncias 0,009 entre eles (Figura 4). Os isolados 9, 12 e 15 foram agrupados no grupo filogenético II, com base nas regiões ITS, o que demonstra serem geneticamente similares (Quadro 5). Os isolados da raça 65, pertencentes ao estado de São Paulo 13, 14, 15 e 16, apresentaram diferenças entre eles, sendo o isolado 16 o mais dissimilar, pois apresentou SNPs na região do gene 5.8S e na região ITS2 diferenciando este de todos os isolados desta raça, o que confirma a alta variabilidade genética dentro da raça 65.

Carbonell et al. (1999) realizaram um trabalho visando avaliar a reação à antracnose de cultivares recomendadas para o estado de São Paulo e identificar diferentes raças de *C. lindemuthianum*. Foram identificadas nove raças, com o predomínio das raças 65, 81 e 89. No entanto, ao inocularem dois isolados da raça 31, dois da raça 65 e três da raça 81, em cultivares recomendadas para o plantio no estado, verificaram diferenças dentro de raças, sugerindo que o conjunto de cultivares diferenciadoras de *C. lindemuthianum* não era suficiente para a diferenciação da diversidade de patogenicidade dos isolados avaliados, devido a possíveis interações e combinações gênicas existentes entre os genes para resistência ao patógeno.

De acordo com Alzate-Marin et al. (2001), em estudos de variabilidade genética de patótipos de *C. lindemuthianum*, um amplo polimorfismo foi encontrado entre os isolados, o qual pode ser utilizado em estudos de diversidade genética entre patótipos.

4.3. Agrupamentos

A árvore filogenética baseada nas sequências das regiões ITS1 e ITS2

revelou a separação dos isolados em dois grupos distintos, com a presença de um subgrupo.

O Grupo I foi composto pelos isolados 2, 5, 6, 7 e 16 da raça 65, os isolados das raças R23, R2047, Raça 89 e *Colletotrichum orbiculare* e *C. trifolii*. Por sua vez, o Grupo II foi formado pelos isolados 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 17 da raça 65, o isolados Raça 17, Raça 2, MAFF 305390, R23.19, Rec15 e um subgrupo formado pelo isolado 11, oriundo do estado de Santa Catarina, e às Raças 23, 31, 73 e 1096.

Balardin et al. (1997), em estudos feitos com 138 isolados, demonstraram que a raça 65 estava presente em 14% das amostras coletadas no Brasil e Estados Unidos. Polimorfismo molecular foi observado entre os isolados das raças 65 e 73, dentro e entre os países, exceto entre os isolados brasileiros da raça 65.

No grupo I os isolados 2 e 7 estão muito próximos, fato confirmado pela distância genética estimada entre eles. Pode-se observar na Figura 4, que no grupo II os isolados 3 e 10, pertencentes ao estado de Mato Grosso e Santa Catarina, respectivamente, estão próximos entre si e distantes do isolado 11 de Santa Catarina. Ishikawa et al. (2008), trabalhando com 13 isolados da raça 65 do estado de Minas Gerais, oriundos de diversas regiões e de diferentes anos de cultivos, verificaram a formação de 11 grupos distintos por meio da árvore filogenética, o que demonstra a existência da variabilidade dentro da raça 65.

Damasceno e Silva et al. (2007) utilizaram cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD a fim de verificar se a grande variabilidade do patógeno é devido a diferenças entre ou dentro de raças e, adicionalmente, estudar a distribuição de isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões produtoras de feijão do estado de Minas Gerais. Os autores identificaram 10 raças, incluindo a raça 337, até então não detectada no Brasil, entre os 48 isolados estudados. A raça 65, seguida das raças 81 e 73, foram as mais frequentes nas regiões produtoras. A partir de dados obtidos por meio de um dendrograma, verificaram isolados pertencentes à mesma raça, classificados em grupos diferentes, como no caso dos isolados da raça 65, encontrados nos grupos II e III. Estes autores relatam que a maioria da variabilidade foi detectada dentro de raças, o que demonstra a alta diversidade genética do patógeno causador da antracnose.

No presente estudo, verificou-se que a maior diferença foi revelada no isolado 16 da raça 65, oriundo do estado de São Paulo, apresentando 3 SNPs na região ITS2 e 1 SNP no gene 5.8S, diferente de todos os demais isolados da raça 65 e das sequências obtidas no banco de dados GenBank. Segundo Carbonell et al. (1999) e Davide e Souza (2009), algumas cultivares de feijão comum são resistentes a certos isolados e suscetíveis a outros de *C. lindemuthianum* pertencentes a uma mesma raça.

Este fato permitiu concluir que existe divergência genética dentro das raças, inclusive na raça 65. Assim sendo, os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que o estudo com base no padrão de virulência não é suficiente para determinar a variabilidade do patógeno.

5. CONCLUSÕES

Na avaliação dos 17 isolados de *C. lindemuthianum* da raça 65 a maior variabilidade foi observada na região ITS1. De um total de 11 SNPs detectados, seis SNPs ocorreram na região ITS1, enquanto que cinco alterações de nucleotídeos foram encontradas na região ITS2.

Os isolados mais dissimilares, em relação a todos os outros isolados da raça 65 e das sequências obtidas no banco de dados GenBank, foram o isolado 16 da raça 65 (São Paulo), que apresentou 3 SNPs na região ITS2 e 1 SNP no gene 5.8S, e o isolado 4 (Minas Gerais), que apresentou 2 SNPs, sendo um na região ITS1 e um na região ITS2.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram elevada variabilidade a nível molecular entre isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum* estudados. Ressalta-se, também, a importância das regiões ITS para a caracterização e diferenciação de isolados de *C. lindemuthianum* em nível molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to are, a simple dominant gene conferring resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:865-870, 1994.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, 25:3389-3402, 1997.

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M. A single gene or complex locus of linked resistance genes confer resistance to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, 89:281-285, 1999.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:125-133, 2001.

ALZATE-MARIN, A.L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:241-242, 2004.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, K.A.; SILVA, M.G.; OLIVEIRA, E.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-4³* and *Co-9* in common bean cultivar Tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, 154:1-8, 2007.

ANDRUS, C.F.; WADE, B.L. The factorial interpretation of anthracnose resistance in beans. **USDA Technical Bulletin**, 310:1-29, 1942.

ANGIOI, S.A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, V.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:829-843, 2010.

ANSARI, K.I.; PALACIOS, N.; ARAYA, C.; LANGIN, T.; EGAN, D.; DOOHAN, F.M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology**, 53:635-642, 2004.

ARAÚJO, I.D. Identificação da raça alfa do *Colletotrichum lindemuthianum* e a reação de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 8:159-162, 1973.

AUGUSTIN, E.; COSTA, J.G.C. Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. no melhoramento do feijoeiro no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 6:265-272, 1971.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, 15:243-245, 1990.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, 87:1184-1191, 1997.

BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:1038-1047, 1998.

BALARDIN, R.S.; SMITH, J.J.; KELLY, J.D. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycological Research**, 103:841-848, 1999.

BALDWIN, B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 1:3-16, 1992.

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

BEEBE, S.E.; SKROCH, P.W.; TOHME, J.; DUQUE, M.C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, 40:264-273, 2000.

BEEBE, S. E. Common bean breeding in the tropics. **Plant Breeding**, 36:357-426, 2012.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia I**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. 919p.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. 333-349p.

BLONDET, A. **L'anthracnose du haricot: Etude des races physiologiques du *Colletotrichum lindemuthianum***. Paris: Faculté de Science, 1963. 160p. Ph.D. Thesis.

BONETT, L.P.; SCHEWE, I.; SILVA, L.I. Variabilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro comum no Oeste do Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, 9:207-210, 2008.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (eds.). **Feijão: Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa: UFV, 1998. p. 13-17.

BORÉM, A.; ROMANO, E.; GROSSI DE SÁ, M.F. **Fluxo gênico e transgênicos**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2007. 199p.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant Soil**, 252:55-128, 2003.

BURKHOLDER, W.H. The gamma strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Brit et Cav. **Phytopathology**, 13:316-323, 1923.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:801-813, 2010.

CAMARGO JÚNIOR, O.A.; SOUZA, E.A.; MENDES-COSTA, M.C.; SANTOS, J.B.; SOARES, M.A. Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 3:607-615, 2007.

CANNON, P.F.; BRIGDE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (eds.). ***Colletotrichum* host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Minnesota: APS Press. 2000. p. 1-19.

CARBONELL, S.A.M.; ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; FRANCISCO, F.G.; RAVAGNANI, S.; ALMEIDA, A.L.L. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e reação de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 24:60-65, 1999.

CÁRDENAS, G.M.; GALVÁN, M.; BARRERA, V.; CARMONA, M. First report of target spot of tobacco caused by *Rhizoctonia solani* (AG-2.1) in Argentina. **Plant Disease**, 96:456, 2012.

CARVALHO, L.M.J.; CORREA, M.M.; PEREIRA, E.J.; NUTTI, M.R.; CARVALHO, J.L.V.; RIBEIRO, E.M.G.; FREITAS, S.C. Iron and zinc retention in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after home cooking. **Food and Nutrition Research**, 56:1-6, 2012.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; QUEROL, C.B.; SAN'TANNA, J.R.; MIYAMOTO, C.T.; FRANCO, C.C.S.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum* a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, 6:634-642, 2007.

CHÁVES, G. La *antracnosis*. In: SCHWARTZ, H.F.; GALVEZ, G.E. (eds.). **Problemas de producción del frijol; enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p. 37-54.

CHEN, Y.Y.; CONNER, R.L.; GILLARD, C.L.; BOLAND, G.J.; BABCOCK, C.; CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; BALASUBRAMANIAN, P.M. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. **Plant Disease**, 91:1271-1276, 2007.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira grãos–décimo primeiro levantamento safra 2013/2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf. Acesso em: 14, janeiro, 2015.

CÓRDOBA, A.S.; MENDONÇA, M.M.; ARAÚJO, E.F. Avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em três estádios de estabilização de dunas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 26:931-937, 2002.

CRUICKSHANK, I.A.M. Strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) in Eastern Australia. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, 32:134-135, 1966.

DAMASCENO E SILVA, K.J.; SOUZA, E.A.; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Phytopathology**, 155:241-247, 2007.

DAVIDE, L.M.C.; SOUZA, E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9:23-30, 2009.

DÍAZ, L.M.; BLAIR, M.W. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) as determined by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:143-154, 2006.

DILLARD, H.R.; COBB, A.C. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. **Plant Disease**, 77:1233-1238, 1993.

EMBONG, Z.; HILTAM, W.H.; YEAN, C.Y.; ABDUL RASHID, N.H.; KAMARUDIN, B.; ABIDIN, S.K.; OSMAN, S.; ZAINUDDIN, Z.F.; RAVICHANDRAN, M. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. **Ophthalmology**, 8:7, 2008.

FAO. **Faostat database gateway**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 14, janeiro, 2015.

FIERRO, F.; MARTÍN, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, 25:1-17, 1999.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, 9:275-296, 1971.

FOUILLLOUX, G. L'antracnose du haricot: Étude des relations entre les pathotypes anciens et nouveaux. Étude de nouvelles sources de résistance totale. In: RÉUNION EUCARPIA HARICOT. Versailles, 1975. **Proceedings...** Versailles: Centre National de Recherches Agronomiques, 1975. p. 81-92.

FOUILLLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DISEASES OF TROPICAL FOOD CROPS. Louvain la Neuve, 1978. **Proceedings...** Louvain la Neuve: Université Catholique de Louvain, 1979. p. 221-235.

FREIRE, C.N.S.; SILVA, K.J.D.; SOUZA, E.A. Formação de anastomoses entre isolados do agente causal da antracnose do feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, Goiânia, 2005. **Resumos Expandidos...** Goiânia: EMBRAPA, 2005. p. 193-196.

FREYTAG, F.G.; DEBOUCK, G.D. Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. **Botanical Research Institute of Texas**, 298p., 2002.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 14:12-16, 2000.

GAN, P.; IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R.J.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Pathology**, 197:1236-1249, 2013.

GANAL, M.W.; ALTMANN, T.; RÖDER, M.S. SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 12:211-217, 2009.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, 2:113-118, 1993.

GEPTS, P. A middle american and an Andean common bean gene pool. In: GEPTS, P. (eds.). **Genetic resources of *Phaseolus* beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization**. London: Kluwer, 1988. p. 375-390.

GEPTS, P.; DEBOUCK D.G. Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In: VOYSEST, O.; VAN SCHOONHOVEN, A. (eds.). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1991. p. 7-53.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **American Society for Horticultural Science**, 33:1124-1130, 1998.

GEPTS, P.; ARAGÃO, F.; BARROS, E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P.; MING, R. (eds.). **Genomics of tropical crop plants**, New York: Springer, 2008. p. 113-143.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C.; ARAÚJO, E.F. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, 25:477-483, 2002.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, J.D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, 151:411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; THOMAZELLA, C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KVITSCHAL, M.V.; ELIAS, H.T. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates using differential cultivars of common bean in Santa Catarina State, Brazil. **Brazil Archives of Biology and Technology**, 51:883-888, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; NUNES, M.P.; CRUZ, A.S.; ALVES, M.A.; SOUSA L.L.; VIDIGAL FILHO P.S. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mato Grosso state, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 52: 52-53, 2009.

GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; ZAVALA, M.E.; JACOBO, J.L.; HERNÁNDEZ, F.; ACOSTA, J.; MARTÍNEZ, O.; SIMPSON, J. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, 88:292-299, 1998.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, S.R.; MANDALA, D.; MKANDAWIRE, A.B.C.; GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggest coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, 85:600-607, 1995.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, 227:1268-1269, 1970.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41:95-98, 1999.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 119:122-125, 1994.

HERNÁNDEZ-GODINEZ, F.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; SIMPSON, J. La variación patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y su importancia en los programas de mejoramiento genético del frijol. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 16:63, 1998.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, 66:411-453, 1991.

HUBBELING, N. Selection for resistance to anthracnose particularly in respect to the "ebnet" race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 19:49-50, 1976.

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

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

KADO, C.I.; HESKETH, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60:969-976, 1970.

KAUSERUD, H.; HOGBERG, N.; KNUDSEN, H.; ELBORNES, S.A.; SCHUMACHER, T. Molecular phylogenetics suggest a North American link between the antropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. **Molecular Ecology**, 13:3137-3146, 2004.

KELLY, J.D.; AFANADOR, L.; CAMERON, L.S. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Michigan and implications in dry bean resistance breeding. **Plant Disease**, 78:892-894, 1994.

KIMATI, H. **Algumas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et. Magn.) Scrib. que ocorrem no Estado de São Paulo**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1966. 28p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

KIMATI, H. Doenças do feijão (*Phaseolus vulgaris*). In: GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KRUGUER, T.L.; CARDOSO, E.S.B.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 297-318.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ª Edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 761-785.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3ª Edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 774p.

KLEEMANN, J.; RINCON-RIVERA, L.J.; TAKAHARA, H.; NEUMANN, U.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; VAN DER DOES, H.C.; HACQUARD, S.; STÜBER, K.; WILL, I.; SCHMALENBACH, W.; SCHMELZER, E.; O'CONNELL, R.J. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **Plos Pathogens**, 8:1002643, 2012.

KOCH, S. **Colletotrichum spp. on dry beans and lupines in South Africa**. South Africa: University of Pretoria, 1996. Ph.D. thesis.

KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: Further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 78:809-817, 1989.

KRÜGER, J.; HOFFMANN, G.M.; HUBBELING, N. The Kappa race of *Colletotrichum lindemuthianum* and sources of resistance to anthracnose in *Phaseolus* beans. **Euphytica**, 26:23-25, 1977.

KWAK, M.; GEPTS, P. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, 118:979-992, 2009.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* Species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, 9:636-653, 1992.

LIN, L.Z.; HARNLY, J.M.; PASTOR-CORRALES, M.S.; LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, 107:399-410, 2008.

LIU, B.; WASILWA, L.A.; MORELOCK, T.E.; O'NEILL, N.R.; CORRELL, J.C. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility and host specificity. **Phytopathology**, 97:1305-1314, 2007.

MAHUKU, G.S.; JARA, C.E.; CAJIAO, C.; BEEBE, S. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, 86:1383-1387, 2002.

MAHUKU, G.S.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, 110:253-263, 2004.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>. Acesso em: 25, agosto, 2014.

MASTENBROEK, C.A. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, 9:177-184, 1960.

McCARTNEY, H.A.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pesticide Management Science**, 59:129-142, 2003.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolution potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 40:349-379, 2002.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, 116:143-149, 2000.

MENDES-COSTA, M.C.; SOUZA, E.A. Genética de *Glomerella cingulate* (Stonem) Spauld & Schrenk f. sp. *phaseoli*: Caracterização genotípica. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, Águas de Lindóia, 2005. **Resumos**. São Paulo: Águas de Lindóia, CD-ROOM, 2005.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106p.

MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum lindemuthianum*. **IMI Descriptions of Fungi and Bacteria**, 32:316, 1971.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, 68:307-320, 2002.

MUTH P.; LIEBENBERG, M.M. Resistance of dry bean to South African races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 52:40-41, 2009.

NUNES, M.P.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; PEDROSO, J.; COIMBRA, G.K.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SOUSA, L.L. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* oriundos do Estado do Paraná. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Búzios, 2011. **Resumos expandidos...** Búzios: CD-ROM, 2011.

NUNES, M.P.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; COIMBRA, G.K. Comprehension of genetic variability and virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. In: Biennial Meeting of the Bean Improvement Cooperative, 2013, Portland, State Oregon/USA. **Biennial Meeting of the Bean Improvement Cooperative**, 2013.

O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S.G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M.F.; DAMM, U.; BUIATE, E.A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, 44:1060-1065, 2012.

OLIARI, L.; VIEIRA, C.; WILKINSON, R.E. Physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Plant Disease Report**, 57:870-872, 1973.

OLIVEIRA, E.A.; ANTUNES, I.F.; COSTA, J.G.C. Bean anthracnose race survey in South Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 16:42-43, 1973.

O'SULLIVAN, D.; TOSI, P.; CREUSOT, F.; COOKE, M.; PHAN, T.H.; DRON, M.; LANGIN, T. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, 33:291-298, 1998.

PALLOTTINI, L.; GARCIA, E.; KAMI, J.; BARCACCIA, G.; GEPTS, P. The genetic anatomy of a patented yellow bean. **Crop Science**, 44:968-977, 2004.

PARADELA FILHO, O.; POMPEU, A.S. Ocorrência do Grupo Brasileiro I de *Colletotrichum lindemuthianum* da antracnose do feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 1:195-198, 1975.

PASTOR-CORRALES, M.A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. In: PASTOR-CORRALES, M. A. (ed.). **La antracnosis del frijol**

común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Cali: CIAT, 1988. p. 212-239. (Documento de Trabajo, 113).

PASTOR-CORRALES, M.A. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, 81:694, 1991.

PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M.; MAYA, M.M. Diversidad de la virulencia de *Colletotrichum lindemuthianum* en Mesoamerica y la region Andina. **Fitopatología Colombiana**, 17:31-37, 1993.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ERAZO, O.A.; ESTRADA, E.I.; SINGH, S.P. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. **Plant Disease**, 78:959-962, 1994.

PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (eds.). **Feijão**. Viçosa: UFV, 2006. p. 359-414.

PEREIRA, R.; ISHIKAWA, F.H.; PINTO, J.M.A.; SOUZA, E.A. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais – Brasil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 53:224-225, 2010.

PINTO, J.M.A.; PEREIRA, R.; ISHIKAWA, F.H.; SOUZA, E.A. Pathogenicity and virulence structure of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 53:228-229, 2010.

PINTO, J.M.A.; PEREIRA, R.; MOTA, S.F.; ISHIKAWA, F.H.; SOUZA, E.A. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, 102:490-497, 2012.

RAVA, C.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19:167-172, 1994.

RENAUT, S.; NOLTE, A.W.; BERNATCHEZ, L. Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. *Salmonidae*). **Molecular Ecology**, 19:115-131, 2010.

REY, M.S.; BALARDIN, R.S.; PIEROBOM, C.R. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira de Agrociência**, 11:113-116, 2005.

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

RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; RAMÍREZ-RUEDA, M.T.; MARTÍNEZ de la VEGA, O.; SIMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from México. **Plant Pathology**, 52:228-235, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406-425, 1987.

SANTOS, J.; ANTUNES, I.F.; REY, M.S.; ROSSETTO, E.A. Virulência das raças 65, 73 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris* L. **Agrociência**, 14:115-124, 2008.

SARTORATO, A. Determinação da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: VII CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. Viçosa, 2002. **Resumos Expandidos...** Viçosa: UFV, 2002. p. 114-116.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, 11:513-522, 1994.

SCHNOCK, M.G.; HOFFMANN, G.M.; KRÜGER, J. A new physiological strain of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L. **Horticultural Science**, 10:140, 1975.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; LEVESQUE, C.A.; WEN, C. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Science**, 109:6241-6246, 2012.

SCHREIBER, F. Resistenzzüchtung bei *Phaseolus vulgaris* L. **Phytopathology**, 4:415-454, 1932.

SHARMA, P.N.; KUMAR, A.; SHARMA, O.P.; SUD, D.; TYAGI, P.D. Pathogenic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* and evaluation of resistance in *Phaseolus vulgaris* in the north-western Himalayan region of India. **Journal of Phytopathology**, 147:41-45, 1999.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; LAFAY, J.F.; BRYGOO, Y.; BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, 18:121-138, 1994.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, 99:475-478, 1995.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 87:807-813, 1997.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 45:379-396, 1991.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. **Crop Science**, 50:2199-2223, 2010.

SOMAVILLA, L.L.; PRESTES, A.M. Reação de cultivares de feijoeiro a alguns patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE FEIJÃO. Porto Alegre, 1998. **Anais...** Porto Alegre: FEPAGRO, 1998. p.299.

STEWART, E.L.; ZAOWEI, L.; CROUS, P.W.; SZABO, L.J.; Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. **Micological Research**, 103:1491-1499, 1999.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata**. England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY P.H.; JEGER, M.J. (eds). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB Internacional. 1992. p. 1-26.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D.; OLIVEIRA, F.A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, 30:371-375, 2004.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; SILVA, G.F.; ISHIKAWA, F.H.; CAMARGO JÚNIOR, O.A. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, 31:545-550, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28:2731-2739, 2011.

THAN, P.P.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P.W.J.; HYDE, K.D. Chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal of Zhejiang University Science**, 9:764-778, 2008.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA, J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 43:82-83, 2000.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SAKIYAMA, N.S.; BARELLI, M.A.A.; SILVÉRIO, L. Genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* races using RAPD markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 45:44-45, 2002.

TU, J.C. Occurrence and characterization of the epsilon race of bean anthracnose in Ontário. **Plant Disease**, 68:69-70, 1984.

USECHE, F.J.; GAO, G.; HANAFEY, M.; RAFALSKI, A. High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences. **Genome Informatics**, 12:194-203, 2001.

VIDIGAL FILHO, P.S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, J.D.; KIRK, W.W. Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. **Journal of Phytopathology**, 155:108-113, 2007.

VIEIRA, R.R.; VIEIRA, C.; EUCLYDES, R.F.; SILVA, C.C. **Avaliação preliminar do germoplasma de *Phaseolus vulgaris* L. da Microrregião Homogênea 192 (Zona da Mata, Minas Gerais)**. Viçosa: UFV, 1983. p. 419-50.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1988. 231p.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 76p.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. **Technical Bulletin**, 1957. 262p.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, 12:563-584, 2003.

ZIMMERMANN, M.J.O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (eds.). **Cultura do feijoeiro no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 57-99.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: INNIS, M.A.; GELFALD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, Academic Press, 1990. p. 315-322.

YERKES Jr., W.D.; ORTIZ, M.T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. **Phytopathology**, 46:564-567, 1956.

YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 1-21.