

**ANÁLISE DE GRUPOS DE
COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E
MARCADORES RAPD EM *Colletotrichum
lindemuthianum***

QUÉLEN DE LIMA BARCELOS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

QUÉLEN DE LIMA BARCELOS

**ANÁLISE DE GRUPOS DE COMPATIBILIDADE
VEGETATIVA E MARCADORES RAPD EM
*Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Barcelos, Quélen de Lima

Análise de grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores rapd em
Colletotrichum lindemuthianum / Quélen de Lima Barcelos. -- Lavras :
UFLA, 2007.

62 p. : il.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1.Colletotrichum lindemuthianum. 2.Compatibilidade vegetativa.
3.Antracnose. 4.Faseolus vulgaris. I.Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD- 633.7394

QUÉLEN DE LIMA BARCELOS

**ANÁLISE DE GRUPOS DE COMPATIBILIDADE
VEGETATIVA E MARCADORES RAPD EM
*Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 13 de julho de 2007.

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa

UNILAVRAS

Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz

UFV/VIÇOSA

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

UFLA/DBI

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por me conceder a vida e ser fonte de força, paz e segurança;

Aos meus avós Pedro e Zilma (in memoriam),

por todo carinho e tantas lembranças lindas e inesquecíveis;

OFEREÇO

Aos meus pais, Carlos Adão e Paula Marta, por terem nos criado como borboletas delicadas, porém, nos ensinando a enfrentar a vida; por perceberem na hora certa, que temos asas fortes pra voar e por confiarem em mim e nos meus sonhos; às minhas irmãs Carla e Clarissa, por todo apoio, amor e compreensão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente, me guiando e dando força..

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza, pelos ensinamentos, apoio e orientação.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Maria Cristina Mendes Costa e Profa. Marisa Vieira de Queiroz, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas César Brasil, João Bosco dos Santos, João Cândido de Souza, Lisete Chamma Davide e Magno Antônio Patto Ramalho, pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

As funcionárias do DBI, Elaine, Zélia, Rafaela e Ironcina, pela convivência e auxílio durante o curso.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Cassius, Joice e Kaesel, pela ajuda e convivência diária.

Aos amigos Ana Luíza, Dheyne, Helton, Jerônimo, Lívia, Marcelo (Jacaré), Marciane, Osnil e Paula, pelas sugestões, conselhos e pelos ótimos momentos que passamos juntos e companheirismo durante esse período.

A amiga Francine, pelo auxílio na realização deste trabalho, sugestões e pelo companheirismo, em todas as horas.

A todos os colegas do GEN que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, pela ajuda nos estudos e pela excelente convivência.

Às amigas Bianca, Clarissa, Fabiane, Joelma e Monalize, pela amizade sincera, força e carinho, mesmo apesar da distância.

À colega de república, Luzia, pela amizade, compreensão e apoio.

A toda a minha família, meus pais, irmãs, tias, tios e primos, por todo o carinho e por sempre me apoiarem, me dando forças para que eu não desistisse nunca e alcançasse os meus objetivos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Colletotrichum lindemuthianum	3
2.2 Heterocariose, ciclo parassexual e compatibilidade vegetativa	4
2.3 Compatibilidade vegetativa no estudo da variabilidade genética	8
2.4 Marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Origem dos isolados.....	18
3.2 Obtenção dos mutantes <i>nit</i>	20
3.3 Caracterização fenotípica dos mutantes <i>nit</i>	20
3.4 Análise da autocompatibilidade vegetativa	21
3.5 Testes de compatibilidade vegetativa	23
3.6 Extração de DNA.....	23
3.7 Reação de RAPD	24
3.8 Eletrofores em gel.....	25
3.9 Análises estatísticas	25
4 RESULTADOS	27
4.1 Obtenção dos mutantes <i>nit</i>	27
4.2 Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i>	27
4.3 Análise da autocompatibilidade.....	29
4.4 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG).....	29
4.5 Análise de RAPD.....	30
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO	52

RESUMO

BARCELOS, Quélen de Lima. **Análise de grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD em *Colletotrichum lindemuthianum***. 2007. 63 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro, apresenta ampla variabilidade patogênica e genética, o que tem dificultado o desenvolvimento de cultivares resistentes. Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade dentro e entre raças por meio de grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD. Foram utilizados 47 isolados, pertencentes a várias raças, coletados em diferentes locais, hospedeiros e anos na recuperação de mutantes *nit* em meio mínimo (MM) + clorato de potássio. Mutantes *nit* são incapazes de utilizar o nitrato como única fonte de nitrogênio sendo usualmente utilizados em análises de compatibilidade vegetativa. Surgem espontaneamente quando isolados são cultivados em meio com clorato, análogo tóxico do nitrato. Em seguida, os mutantes foram submetidos à classificação fenotípica, sendo identificados como *nit1*, *nit3* e *nitM*. Foram obtidos 295 mutantes, sendo 279 mutantes *ni3*, 15 mutantes *nit1* e um *nitM*. Nos testes de complementaridade, foram obtidos 45 VCGs. Seis isolados foram auto-incompatíveis, houve complementaridade entre mutantes *nit3* de diferentes isolados e observou-se frequência de reversão de 4,41%. Para a análise de marcadores RAPD, foram utilizados 18 *primers* que amplificaram um total de 111 bandas polimórficas. Utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice, obtiveram-se as estimativas das similaridades genéticas que variaram de 0,42 a 0,97. O dendograma obtido pela análise de agrupamento permitiu identificar 18 grupos. As análises permitiram demonstrar a grande variabilidade existente dentro e entre raças desse patógeno. Não houve correlação entre VCGs e os agrupamentos obtidos por meio dos marcadores RAPD.

* Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA

ABSTRACT

BARCELOS, Quélen de Lima. **Analisis of vegetative compatibility groups and RAPD markers of *Colletotrichum lindemuthianum***. 2007. 63 p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The causal agent of common bean anthracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, presents a wide genetic and pathogenic variability that has complicated the development of resistant cultivars. The aim of this study was to identify the variability within and among races by vegetative compatibility groups and RAPD markers. Forty-seven isolates of many races collected in different counties, host cultivars and years were used to recover *nit* mutants, in minimal medium (MM) + potassium chlorate. NO₃-non-utilizing (*nit*) mutants usually are used in vegetative compatibility analyses and arise spontaneously when isolates are cultured on a medium containing chlorate, a toxic analog of nitrate. After that, the chlorate resistant sectors were submitted to phenotypic classification as *nit1*, *nit3* and *nitM*. This technique allowed recover 279 mutants *nit3*, 15 *nit1* and one *nitM*. In the complementation tests, 45 vegetative compatibility groups (VCG) were obtained. Six of the isolates examined were heterokaryon self-incompatible, complementation among mutants *nit3* of the different isolates were observed and the reversion frequency was 4.41%. For the molecular analisis 18 RAPD primers were used and amplified 111 polymorphic bands. The estimates of genetic similarities were obtained by Sorence-Dice's coefficient and ranged from 0.42 to 0.97. The dendrogram obtained by cluster analysis allowed to identify 18 groups. Both analyses allowed to demonstrate the great variability within and among races of this pathogen. No correlation was observed between results of vegetative compatibility groupings and RAPD analysis.

* Guidance Committee: Elaine Aparecida de Souza – UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produtividade da cultura do feijoeiro, destaca-se a ocorrência de doenças. A antracnose no feijoeiro, causada pelo *Colletotrichum lindemuthianum* f sp. *phaseoli*, está entre as doenças fúngicas de maior importância dessa cultura, ocasionando perdas que podem ser totais quando as condições ambientais são favoráveis.

Existe grande variabilidade entre os isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* quanto a morfologia, patogenicidade, fisiologia e produção de conídios, entre outras características, quando cultivados em laboratório (Roca, 2002; Silva et al., 2007).

O estudo da variabilidade em fungos fitopatogênicos torna-se importante, tanto para estudos genéticos como para facilitar a condução de trabalhos de melhoramento, visando resistência a doenças. Esse é um pré-requisito para o desenvolvimento de cultivares resistentes, capazes de manter essa característica por períodos prolongados de tempo (Rava et. al, 1993).

O conhecimento de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) entre diferentes linhagens é de particular interesse em fungos assexuados, como *Colletotrichum* spp., devido ao fato de os VCGs subdividirem a população em grupos que podem trocar informação genética via heterocariose (Brooker et al., 1991).

A formação de heterocários entre diferentes linhagens é um componente importante do ciclo de vida de muitos fungos, podendo servir como primeiro passo para o ciclo parassexual, um dos processos que levam à recombinação genética em fungos. Linhagens que são capazes de formar heterocários são conhecidas como vegetativamente compatíveis, sendo estas frequentemente descritas como membros do mesmo grupo de compatibilidade vegetativa ou VCG, do inglês *vegetative compatibility group* (Leslie, 1993).

Estudos com VCGs envolvem a obtenção de mutantes que são incapazes de utilizar o nitrato como única fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) e são resistentes ao clorato, um análogo tóxico do nitrato. A utilização dos mutantes *nit* na caracterização dos VCGs tem se mostrado uma ferramenta poderosa no estudo da diversidade genética em fungos fitopatogênicos (Vallaincourt & Hanau, 1994; Korolev et al., 2001; Kiprof, 2002, Leslie et al., 2006). Os VCGs têm sido frequentemente utilizados para a identificação do grau de parentesco entre fungos (Leslie, 1993; Korolev et al., 2001) e têm apresentado associação com a patogenicidade (Kiprof et al., 2002).

Entre as metodologias que podem ser empregadas para a quantificação da variabilidade genética, destacam-se os marcadores moleculares. Estudos moleculares vêm demonstrando que há grande variabilidade, dentro e entre raças, em *C. lindemuthianum* (Mahuku & Riascos, 2004; Talamini et al., 2006; Silva et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivos identificar a variabilidade em populações de *C. lindemuthianum*, por meio do estudo de grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magnus) causador da antracnose no feijoeiro (Sutton, 1992), é comumente encontrado na sua forma mitospórica ou conidial. Em sua forma meiospórica é conhecido como *Glomerella cingulata* (Stonem Spauld & V. Schrenck) f. sp. *phaseoli*, pertencente à classe dos Ascomicetos.

A classificação dos Ascomicetos baseia-se em sua forma de reprodução sexual (forma meiospórica = forma sexual = forma teleomórfica). Sob esta forma, o agente causal da antracnose do feijoeiro ainda não foi encontrado na natureza. Seu estado conidial foi descoberto primeiro (forma mitospórica = forma assexual = forma anamórfica) e o seu nome amplamente empregado e conhecido como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn). Pertence à classe dos Deuteromicetos a ordem Melanconiales (Rava et al. 1994a).

O *Colletotrichum lindemuthianum* se reproduz, portanto, de forma assexual, produzindo os conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo. Apresenta micélio septado e ramificado, com coloração variando de hialina a quase negra (Walker, 1959). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e oblongos ou cilíndricos (Sutton, 1992). Por ocasião da germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, que podem formar apressórios em seus ápices ou continuar crescendo, formando as hifas e micélios.

Os conídios germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o hospedeiro, se as condições lhes são favoráveis. Há formação do tubo germinativo, seguido do apressório, que penetra mecanicamente pela cutícula e

pela epiderme da planta. O aparecimento de sintomas pode ser observado a partir do sexto dia após o início da infecção (Kimati et al., 1997).

2.2 Heterocariose, ciclo parassexual e compatibilidade vegetativa

A heterocariose foi definida, por Hansen & Smith (1932), como um termo que descreve precisamente a condição de uma única célula conter dois ou mais núcleos diferentes, mesmo que exista apenas uma célula por talo. Permite que fungos haplóides possam desfrutar dos benefícios do diplóide, como complementação ou heterose (Leslie, 1993).

A anastomose entre hifas é importante para o início da mesma, que envolve: a fusão de hifas, o movimento de um ou mais núcleos para uma ou outra célula fundida e o estabelecimento de um estado heterocariótico compatível, o qual tem sido observado em *Colletotrichum lindemuthianum* (Mendes-Costa & Mendonça, 1996; Roca, 1997; Ishikawa, 2006).

A ocorrência do ciclo parassexual é possível por meio da heterocariose, descoberto em *Aspergillus nidulans*, por Pontecorvo & Roper (1952) e que compreende uma seqüência de eventos, como fusão de dois núcleos haplóides diferentes em um heterocário, permuta mitótica que pode ocorrer durante a multiplicação do núcleo diplóide e haploidização (Pontecorvo, 1956). Esse mecanismo possibilita a ocorrência de recombinação gênica e diploidização, sem passar pelas etapas da reprodução sexual, tendo grande importância para fungos assexuais (Roca, 1997).

A compatibilidade vegetativa refere-se à capacidade de uma hifa vegetativa formar anastomose e heterocário estável podendo ser utilizada na análise da diversidade genética e na estrutura de populações naturais. Isolados que são vegetativamente compatíveis são freqüentemente descritas como

membros do mesmo grupo de compatibilidade vegetiva ou VCG (Varzea, 2002a; Leslie, 1993).

Isolados dentro de um VCG são potencialmente capazes de trocar informação genética via ciclo parassexual. A importância dessa habilidade depende da estrutura da população e do número de parceiros com os quais o patógeno pode trocar informação. O fenômeno da heterocariose é um importante componente do ciclo de vida dos fungos anamórficos e serve para a transmissão de fatores de hipovirulência, tais como RNAs de fita dupla, diferindo assim os componentes de virulência ou gama de hospedeiros (Leslie, 1993).

A ocorrência da heterocariose entre linhagens auxotróficas de *Colletotrichum lagenarium* não foi conclusivamente demonstrada por Dutta & Garba (1960, 1962). Já Knox-Davies & Dickison (1960) e Tinline (1962) constataram a formação de heterocariose em *Helminthosporium turcicum* e *Cochliobolus sativus*, respectivamente. Além de estudar a heterocariose, Puhalla & Hummel (1983) e Elmer & Stephens (1989) classificaram as linhagens de *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, respectivamente, em grupos de compatibilidade vegetativa.

Embora sejam óbvios os benefícios da formação do heterocário, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (Glass et al., 2000). Em fungos filamentosos, existem o reconhecimento sexual, que é controlado por locos *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, que é controlado por um loco específico denominado *het* (incompatibilidade de heterocário ou também pode ser chamado de *vig*, de incompatibilidade vegetativa) (Saupe, 2000). Todavia, Leslie (1993) utiliza o termo *vic*, para se referir aos locos que governam a compatibilidade vegetativa.

Quando dois indivíduos se encontram, eles podem sofrer a fusão celular ou anastomose. Se os dois indivíduos tiverem o mesmo genótipo *vic*, ocorre a

heterocariose, porém, se eles diferirem geneticamente para o loco *vic*, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (Saupe, 2000).

Acredita-se que a incompatibilidade vegetativa funcione como um sistema de reconhecimento de genótipos diferentes para limitar a passagem de elementos infecciosos, prevenir a exploração por núcleos mal adaptados e ou como um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (Glass et al., 2000). Esses mesmos autores sugerem que a seleção atuaria sobre os locos *vic* para a manutenção do polimorfismo em populações de fungos. Saupe (2000) comenta que a função dos genes *vic* é preservar a individualidade genética.

Leslie & Zeller (1996) propuseram um modelo simples, no qual se distinguem quatro etapas diferentes na reação de incompatibilidade do heterocário. A etapa inicial é a pré-fusão e está sob o controle de genes, como aqueles envolvidos na produção do feromônio e receptores e genes que podem estar relacionados com a auto-incompatibilidade do heterocário (*hsi*). A etapa da fusão é controlada por genes de auto/não-auto-reconhecimento (*self/non-self-recognition*), como alguns genes de incompatibilidade do heterocário (*vic*). Após a fusão, uma cascata de reações ocorre, desde o não-auto-reconhecimento até a morte celular, devendo ser influenciada por diversos genes, entre eles os genes supressores (*sup*), que modificam o sinal. Finalmente, genes apoptóticos levam à morte celular (Figura 1).

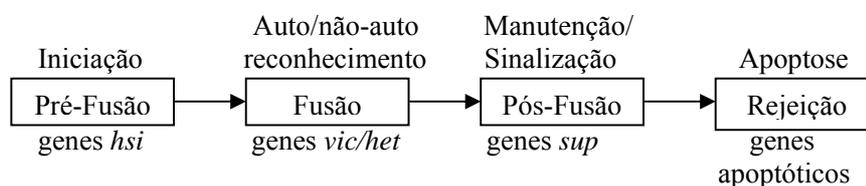


FIGURA 1 Modelo mostrando os quatro passos para atividade de VCG e os genes associados a esse processo (Leslie et al., 2006).

O fenômeno da auto-incompatibilidade do heterocário, controlada pelos genes *hsi*, tem significativa importância em estudos de compatibilidade vegetativa. Isso porque isolados auto-incompatíveis podem levar a um diagnóstico incorreto da compatibilidade vegetativa, visto que estes, usualmente, não formam heterocários com nenhum outro. Dessa forma, é importante identificar tais isolados para prevenir a superestimação do número de VCGs em uma população (Leslie, 1993).

Dois tipos de sistemas genéticos, um alélico e outro não alélico, foram descritos como reguladores da incompatibilidade vegetativa. Em sistemas alélicos, anastomoses entre os indivíduos que contêm um único loco *vic* diferente provocam a incompatibilidade vegetativa. Em interações não alélicas, uma interação entre alelos específicos em dois locos diferentes provoca a incompatibilidade. O número de genes *vic* em uma população determina o número dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs), dentro dos quais os heterocários podem ser prontamente formados (Leslie & Zeller, 1996).

Uma lista dos fungos nos quais já se estudou a compatibilidade vegetativa foi apresentada por Leslie (1993). O autor descreve as implicações genéticas que cercam a compatibilidade vegetativa em quatro ascomicetos: *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cryphonectria* e *Fusarium*. No controle da compatibilidade vegetativa, foram identificados dez locos *vic* em *Neurospora* e *Fusarium*, oito em *Aspergillus* e de cinco a sete em *Cryphonectria*. Esses fungos têm servido de modelo para o estudo dos mecanismos genéticos básicos que controlam a compatibilidade vegetativa e ilustram como ela pode ser usada em estudos de populações de patógenos.

2.3 Compatibilidade vegetativa no estudo da variabilidade genética

Recentemente, várias técnicas analíticas envolvendo fisiologia e compatibilidade vegetativa têm sido utilizadas para estudar taxonomia, filogenia e relações patogênicas. Em genética, os testes de compatibilidade vegetativa são bastante úteis para a caracterização da diversidade entre isolados fúngicos, permitindo a diferenciação entre populações patogênicas e não-patogênicas (Rosalle et al., 1999).

Dentro de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa os isolados são mais similares em relação àqueles pertencentes a outros VCGs, o que foi comprovado por estudos biométricos (Butcher, 1968; Butcher, 1969; Butcher et al. 1972) e por marcadores moleculares (Bosland & Williams, 1987; Gordon & Okamoto, 1992; Jacobson & Gordon, 1991; citados por Leslie, 1993; Korolev et al., 2001).

A distinção de VCGs pode refletir o isolamento geográfico de populações do patógeno, além da capacidade intra-específica de troca de material genético entre indivíduos (Correl, 1991). A compatibilidade vegetativa é mediada por múltiplos locos de incompatibilidade onde estão os genes *vic* ou *het*. Isolados que compartilham os mesmos alelos *vic* pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG). Uma vez formado o heterocário, sua estabilidade é governada por uma série de locos *vic*. Esta estabilidade será maior se a identidade alélica dentro do conjunto desses locos for maior (Leslie, 1995).

Os estudos de compatibilidade vegetativa podem ser realizados por meio de mutantes *nit*, os quais são incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio. A maioria dos fungos consegue utilizar o nitrato, reduzindo-o a amônia via nitrato redutase e nitrito redutase (Garraway & Evans, 1984). Porém, fungos, como alguns Basidiomycetos, Saprolegniaceae e os Blastocladales, são

incapazes de utilizá-lo, aparentemente por não sintetizarem a nitrato redutase. Um análogo do nitrato, o clorato, tem sido muito utilizado em estudos de assimilação do nitrato em fungos, bactérias, algas e plantas (Dunn-Coleman *et al.*, 1984).

Os passos da assimilação do nitrato em *Fusarium* seguem um padrão similar em outros fungos ascomicetos e foram descritos por Leslie *et al.* (2006) da seguinte forma: o nitrato (NO_3) é reduzido a nitrito (NO_2) pela nitrato redutase. Essa enzima também pode reduzir clorato (ClO_3) a clorito (ClO_2), porém, esse processo é tóxico. O nitrito (NO_2) é, então, reduzido a amônia (NH_4) pela nitrito redutase. A amônia (NH_4) pode ser usada pelas células em muitas vias diferentes.

O mesmo autor descreve que a enzima nitrato redutase é codificada pelo loco *nit1*. Isolados que possuem mutações no *nit1* não podem usar NO_3 como fonte de nitrogênio, mas não são afetados na sua capacidade de utilizar outros componentes nitrogenados como fonte de nitrogênio.

É necessário um cofator molibidênio para a enzima nitrato redutase ser ativa e existem cinco locos que codificam parte desse cofator em *Fusarium* (*nit2*, *nit4*, *nit5*, *nit6* e *nit7*). Esses cinco locos são chamados coletivamente de mutantes *NitM* e todos eles conferem o mesmo fenótipo. Mutantes em diferentes locos *NitM* podem complementar um ao outro. Este cofator também funciona como parte da purina desidrogenase. A nitrato redutase e a purina desidrogenase não podem funcionar se uma dessas partes do cofator estiverem alteradas. Desse modo, mutantes *NitM* não conseguem usar nitrato, tão pouco hypoxantina como fonte de nitrogênio, mas podem usar outros componentes nitrogenados, como fonte de nitrogênio, para seu crescimento.

Uma segunda proteína codificada pelo loco *nit3* é uma proteína regulatória específica que afeta somente a via de utilização do nitrato. Mutantes

no loco *nit3* não sintetizam nitrato e nitrito redutase, e não conseguem utilizar NO_3 nem NO_2 como fonte de nitrogênio.

A identificação de VCGs consiste na utilização de mutantes produzidos em meio de cultura contendo clorato de potássio (KClO_3), que são incapazes de utilizar o nitrato como única fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) (Correll et al., 1987; Brooker et al., 1991). Setores com crescimento rápido, resistentes ao clorato de potássio (KClO_3), são, então, selecionados. O modo de ação do clorato não é ainda perfeitamente conhecido, mas todos os mutantes resistentes ao clorato podem apresentar deficiência em qualquer dos genes que regulam a assimilação do nitrato (Varzea et al., 2002a).

Os mutantes *nit* apresentam, assim, crescimento ralo, com pouco ou nenhum micélio aéreo, em meios contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Esses mutantes podem conter alterações genéticas estruturais ou regulatórias no loco do catabolismo do nitrato ou em rotas correlatas (Marzluf, 1981; Klittich & Leslie, 1988 e Klittich & Leslie, 1989). Pelo crescimento em meio seletivo, mutantes *nit* são então classificados em quatro classes fenotípicas. Dois desses fenótipos são designados segundo mutações em um único loco, como: *nit1* – loco estrutural da nitrato redutase e *nit2* – loco regulador do metabolismo do nitrogênio. As outras duas classes fenotípicas podem ocorrer em mais de um loco, como: classe *NitM* – resultante da mutação dos vários locos responsáveis pela reunião do cofator molibdênio requerido durante a atividade da nitrato redutase e purina desidrogenase e classe *nit3* – loco regulador específico do metabolismo da nitrito redutase (Correll, 1987; Brooker et al., 1991).

Quando as colônias de dois mutantes *nit* de diferentes classes fenotípicas, crescendo em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, têm a capacidade de formar um heterocarionte (micélio normal na zona de contato entre as duas colônias), diz-se que os isolados correspondentes àqueles

mutantes *nit* pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (Leslie, 1993). Desse modo, os mutantes podem novamente apresentar crescimento robusto, pois ocorreu a complementação com outro isolado mutante do mesmo VCG, passando, assim, a utilizar o nitrato (Correll, 1987).

Brooker et al. (1991) adaptaram a técnica utilizada para identificação de VCGs em outros fungos filamentosos para *Colletotrichum*. Os autores testaram 7 linhagens de 5 diferentes espécies de *Colletotrichum* quanto à habilidade de produzir mutantes resistentes ao clorato e que não utilizam o nitrato quando cultivados em BDA ou MM contendo 1,5% de clorato de potássio. Seis das sete linhagens produziram mutantes que puderam ser classificadas nas quatro classes fenotípicas. Cinco das linhagens examinadas foram autocompatíveis, visto que os mutantes *nit* complementares formaram heterocário prototrófico. Porém, essas cinco linhagens estabeleceram distintos VCGs, pois os mutantes *nit* de diferentes linhagens não formaram heterocário prototrófico quando cultivados em meio mínimo com nitrato como única fonte de nitrogênio.

Wasilwa et al. (1993) examinaram 89 isolados de *C. orbiculare* e três de *C. magna* e identificaram dez VCGs por meio do uso de mutantes *nit*. Os autores concluíram que, na população estudada, não existiu correspondência entre hospedeiro de origem, VCG e virulência. Utilizando essa metodologia, mutantes *nit*, resistentes ao clorato foram recuperados de 25 isolados de *C. kahawae*, por Beynon et al. (1995), que identificaram cinco VCGs e não encontraram correlação com análises de marcadores RFLP.

Em estudo com 215 isolados de *C. dematium* patogênicos a espinafre, causando dois tipos de lesões provenientes de cebola e de tomate, Correll et al. (1993) puderam separá-los em quatro VCGs. Aqueles patogênicos a espinafre foram agrupados em dois grandes VCGs (VCG1 e VCG2) e o restante em dois grupos separados entre si (VCG3 – tomate e VCG4 – cebola). Somente VCG1 e VCG2 foram patogênicos ao espinafre e foi refutada a hipótese de que existam

duas espécies distintas de *Colletotrichum* que causam a antracnose em espinafre na América do Norte, em função dos tipos de sintomas encontrados.

Do mesmo modo, Chacko et al. (1994) utilizaram mutantes *nit* e observaram compatibilidade vegetativa entre 13 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* e os mesmos foram incompatíveis com outros 13 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de outros hospedeiros.

A compatibilidade vegetativa entre 44 isolados de *Colletotrichum kahawae*, um de *Colletotrichum gloeosporioides* e um de *Colletotrichum acutatum*, foi analisada por Gichuru et al. (2000). Os resultados mostraram que todos os isolados de *C. kahawae*, exceto por um setor mutante branco (VCG2) pertenceram a um VCG (VCG4), as outras espécies pertenceram a grupos únicos (VCG 1 e 3).

Estudando a variabilidade genética e patogênica de 110 isolados de *Colletotrichum coccodes* provenientes de países diferentes (França, Holanda, Israel), Nitzan et al. (2002) os separaram em quatro VCGs distintos e 27% dos isolados não puderam ser enquadrados em nenhum desses quatro grupos, perfazendo, assim, outros 30 VCGs. Segundo os autores, todos os grupos foram encontrados nos diferentes países amostrados, com exceção de dois VCGs, que são ausentes na França. Provavelmente, esse resultado se deve à menor adaptação daqueles VCGs não encontrados ou, ainda, devido a erros de amostragem. A presença dos quatro VCGs, tanto na Europa quanto em Israel, é explicada pelo alto intercâmbio de batatas semente entre ambos. Esses grupos puderam ainda ser separados quanto à patogenicidade de seus isolados.

Varzea et al. (2002a) classificaram, com base em testes de patogenicidade, características morfológicas e bioquímicas, os isolados provenientes de café em *C. kahawae*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Em seguida, agruparam os isolados de cada espécie num VCG distinto. *C. kahawae*,

representado por 18 isolados, foi agrupado em somente um VCG, indicando a baixa variabilidade genética dentro dessa espécie, possivelmente pela ausência de ciclo sexual em condições naturais. Os isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes países africanos e da China foram agrupados em três VCGs, indicando a sua elevada diversidade genética.

Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos em sistemas de produção de raiz de inhame na Nigéria, previamente caracterizadas quanto à morfologia básica, à virulência e à variação na seqüência de ITS (*internal transcribed spacer*) de DNA ribossômico, foram comparadas com a compatibilidade vegetativa por Abang et al. (2004). Os resultados indicaram a presença de vários genótipos dentro de um único campo, sugerindo limitada propagação clonal. Os 41 isolados estudados pertenceram a 28 VCGs e não foi encontrada correlação entre VCGs, morfologia e virulência. A descoberta de que um isolado de erva-daninha foi compatível com isolados de inhame indicou que a transferência de caracteres importantes, como a virulência, pode ocorrer entre isolados de inhame e outros hospedeiros. A diversidade de VCG revelada nesse estudo sugere que, além da reprodução assexuada, a reprodução sexual pode ter um papel importante na epidemiologia da antracnose em inhame.

A compatibilidade vegetativa de 22 isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro no estado de Minas Gerais foi estudada por Pereira (2005). Foi possível recuperar mutantes das classes fenotípicas *nit1*, *nit2* e *nit3*, havendo maior freqüência na recuperação de mutantes *nit1* e encontrados 16 VCGs, tendo a maioria sido formada por um único isolado.

A identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) dentro de uma população morfologicamente homogênea permite identificar subpopulações geneticamente isoladas com respeito aos locos *vic*, as quais podem ser relacionadas a características agronômicas distintas, como patogenicidade ou localização geográfica dos isolados (Leslie, 1993). Segundo

Varzea (2002a), a compatibilidade vegetativa pode ser útil para distinguir isolados patogênicos dos não patogênicos no gênero *Colletotrichum*.

Experimentos de compatibilidade vegetativa provêm informações sobre diversidade genética das espécies fúngicas e foram bastante utilizados, possibilitando a recuperação de mutantes *nit* e distinção de VCGs em *Fusarium oxysporum* (Puhalla 1985; Correl et al. 1987; Jacobsen e Gordon, 1988; Katan & Katan, 1988; Ploetz, 1988; Elmer & Sephens, 1989; Leslie, 1993; Pasquali et al. 2004; Monteiro, 2006; Elena & Pappas, 2006; Catti et al., 2007), em *Fusarium udum* (Kiprop et al. 2002), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines* (Oliveira & Costa 2003).

Do mesmo modo, a formação de grupos de compatibilidade vegetativa por meio de mutantes *nit* foi estudada em outras espécies de patógenos, como *Glomerella graminicola* (Vaillancourt & Hanau, 1994), *Verticillium dahliae* (Korolev et al. 2001; Zeise & Von Tiedemann, 2001; Zeise & Von Tiedemann, 2002; Tsrer & Levin, 2003; Cherrab et al. 2002) e *Aspergillus flavus* (Barros et al., 2006).

A correlação entre VCG e a patogenicidade a hospedeiros específicos, bem como a determinação de patótipos, é uma aplicação útil da compatibilidade vegetativa. Isso pode ser comprovado para algumas *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, como *F. oxysporum* f.sp. *apii* e *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* (Elmer & Stephens, 1989). No entanto, Elias & Schneider (1991) não encontraram correlações entre VCG e patótipos em *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e observaram a ocorrência de isolados de localidades diferentes no mesmo VCG, indicando que muitos determinantes genéticos responsáveis pela especificidade de patótipos podem existir dentro de populações clonais geneticamente isoladas.

Leslie (2006) cita que se dois isolados são clones de uma raça em comum, eles estarão sempre num mesmo VCG, mas, isolados em um mesmo

VCG não necessariamente serão clones. Em geral, o número de VCGs aumenta à medida que aumenta o número de isolados e a diversidade de regiões geográficas de origem dos mesmos.

Em *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, Kroon & Elgerma (1991), citados por Leslie (1993), obtiveram mudanças simultâneas de raça patogênica e VCG. Eles sugeriram que um (ou talvez mais) dos locos *vic* podem estar envolvidos no reconhecimento da planta hospedeira, e mudanças no genótipo *vic* poderiam também resultar em mudanças na patogenicidade.

2.4 Marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética

Outra metodologia que pode ser empregada no estudo da variabilidade genética são os marcadores moleculares, sendo freqüentemente utilizados para os estudos genéticos em fungos filamentosos. Marcas simples, com bastante repetibilidade, são obtidas quando se utilizam seqüências de DNA. Regiões homólogas são reconhecidas por iniciadores de DNA (“primers”). Com o uso de condições de reações específicas para a replicação do DNA, podem ser realizadas amplificações e o produto pode ser observado posteriormente. Essas amplificações ocorrem em condições de aumento e redução de temperaturas em que há a atuação da enzima taq DNA polimerase. Na reação ocorrem, então, desnaturação, anelamento e extensão do DNA (McPherson & Moler, 2000).

Um dos marcadores mais utilizados é o “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) que utiliza um único “primer” com seqüência aleatória e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida (Ferreira & Gratapaglia, 1998). Com isso, obtêm-se um elevado nível de polimorfismo e uma baixa repetibilidade dos resultados. No entanto, essa técnica apresenta uma série de vantagens em relação às demais técnicas moleculares, como a rapidez, o baixo

custo e a necessidade de pouco material, que a tornaram bastante viável e popular (Silva, 2004).

Análises de RAPD foram utilizadas, para avaliar a diversidade genética e a variação patogênica em 45 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* dos três centros de diversidade de feijoeiro, por Sicard et al. (1997). Foi observado polimorfismo, tanto para virulência, inoculando os isolados nas doze cultivares diferenciadoras, quanto para marcadores RAPD, identificando 45 marcas polimórficas. Não houve correlação entre os marcadores RAPD e a virulência dos isolados. No entanto, houve correlação positiva entre a distância geográfica e as distâncias do RAPD, sugerindo uma migração entre populações adjacentes. Os autores concluíram que os isolados andinos de *C. lindemuthianum* não refletem a real diversidade encontrada nos isolados de feijoeiro comum cultivados.

Ishikawa (2006) realizou análises de agrupamento por meio de marcadores RAPD e a formação de anastomoses e observou alta variabilidade genética entre isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Obteve 11 grupos de RAPD e anastomoses, porém, sem haver concordância entre os agrupamentos obtidos por meio das duas metodologias de estudo da variabilidade.

A divergência genética entre e dentro de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* foi determinada, usando marcadores RAPD, por Talamini et al. (2006). Os isolados analisados foram divididos em seis grupos com similaridade relativa de 0.75. Os autores observaram que não houve correlação entre a determinação de raças utilizando as cultivares diferenciadoras e os resultados obtidos utilizando marcadores RAPD.

Do mesmo modo, Silva et al. (2007) utilizaram as cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD para estudar a distribuição dos isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil. Os resultados

mostraram que os isolados pertencentes a uma mesma raça foram classificados em grupos diferentes e, pela análise de variância molecular, pôde-se constatar que a maior parte da variação foi encontrada dentro de raças (80,85%), evidenciando a elevada capacidade de variação do patógeno.

Mutantes resistentes ao clorato foram utilizados por Fávoro et al. (2007) para investigar os mecanismos envolvidos na instabilidade genética em isolados de *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo. Os mutantes foram caracterizados para o padrão de complementação, frequência de reversão e perfil de RAPD. Os resultados desse estudo mostraram que o controle genético do metabolismo do nitrogênio em *C. sublineolum* parece ser similar ao de outras espécies fúngicas, como *Aspergillus*, *Neurospora* e *Fusarium*. A alta frequência de reversão (10^{-4} a 10^{-5}) apresentada por mutantes *nit1* sugere que a instabilidade dos isolados avaliados no estudo pode ser resultado da atividade de elementos transponíveis. A análise de RAPD permitiu confirmar que mutantes *nit* possuem base genética similar à de seus isolados originais e que existe polimorfismo entre isolados selvagens, mutantes *nit1* e mutantes revertidos de *C. sublineolum*.

Estudos de variabilidade genética por meio de marcadores RAPD, grupos de compatibilidade vegetativa e sua relação com a patogenicidade também foram utilizados em outras espécies fúngicas, como *Fusarium poae* (Kerényi et al., 1997), *Fusarium avenaceum* (Satyaprasad et al., 2000) e *Fusarium oxysporum* (Zamani et al., 2004).

Diante do exposto, pode-se perceber que a identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) e marcadores RAPD é relevante para que sejam aprofundados estudos sobre a diversidade genética e a estrutura das populações naturais dos isolados, de forma a subsidiar trabalhos de resistência em programas de melhoramento de feijoeiro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados

Foram utilizados 47 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (Tabela 1) de várias raças fisiológicas e provenientes da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças do Departamento de Biologia da UFLA e um do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, o CNPAF/EMBRAPA. Para manutenção, os isolados foram mantidos em meio de cultura M3 (Junqueira et al., 1984).

TABELA 1 Descrição da raça, cultivar hospedeira, origem e ano de coleta dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

Nº	Isolado	Raça	Cultivar	Procedência	Ano
1	LV 5	81	9D-3 (mono 1)	Lavras – MG	-
2	LV 11	81	ALC 2970102	Viçosa – MG	2001
3	LV 13	81	ALC 2970026	Viçosa – MG	2001
4	LV 17	81	C III R3-19	Viçosa – MG	2001
5	LV 18	87	-	-	-
6	LV 24	64	-	-	-
7	LV 28	65	-	Lavras – MG	2001
8	LV 29	65	-	Lavras – MG	2001
9	LV 32	73	IAPAR 44	-	2002
10	LV 33	337	Talismã	Viçosa – MG	2002
11	LV 43	81	B1 P2 F(MONO1)	-	2002
12	LV 44	81	B1 P2 F(MONO2)	-	2002
13	LV 46	81	-	Lambari – MG	2002
14	LV 48	65	Pérola	Coromandel – MG	2002
15	LV 49	81	1002- MICOTECA	-	-
16	LV 50	72	Valente	Lavras – MG	-

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

17	LV 51	73	Valente	Lavras - MG	2004
18	LV 54	81	Linhagem H18	Lambari - MG	2004
19	LV 55	65	Olath Pinto	Ijaci - MG	2004
20	LV 57	65	Talismã	Lambari - MG	2004
21	LV 58	65	-	Nepomuceno - MG	2004
22	LV 59	65	Ouro Negro	Ijaci - MG	2004
23	LV 61	65	Olath Pinto	Ijaci - MG	2004
24	LV 66	89	-	-	-
25	LV 67	321	Valente	Pinhão - PR	2004
26	LV 68	81	Cultivar precoce	Lavras - MG	2004
27	LV 69	81	Pérola	Lambari - MG	2004
28	LV 70	81	UFV-75M	Viçosa - MG	2003
29	LV 72	81	-	Lambari - MG	2004
30	LV 73	65	OL-NS -331	Ijaci - MG	2004
31	LV 75	81	-	Heliadora - MG	2003
32	LV 76	2047	-	Micoteca	-
33	LV 77	89	-	Micoteca	-
34	LV 80	65	-	Lavras - MG	2004
35	LV 84	73	Valente	Lavras - MG	-
36	LV 86	337	-	Lavras - MG	2005
37	LV 88	337	H-126	Lavras - MG	2005
38	LV 89	65	F5.7 Pitoco x OPS 16 z-6	Lambari - MG	2005
39	LV 90	65	OPNS 331	Ijaci - MG	2005
40	LV 94	65	CNFP7720	Lambari - MG	2005
41	LV 95	81	-	Guarapuava - PR	2006
42	LV 96	71	-	Campinas - SP	2006
43	LV 97	64	-	Campinas - SP	2006
44	LV 99	73	-	Lambari - MG	2006
45	LV 100	-	-	Campinas - SP	2006
46	LV 101	08	-	Turvo - PR	2006
47	CL837*	65	Pérola	Buritis - MG	2000

(-) cultivar não identificada

(*) Isolado do CNPAF/EMBRAPA

3.2 Obtenção de mutantes *nit*

Para a recuperação de mutantes resistentes ao clorato, foi utilizado o método de Brooker et al. (1991) para *Colletotrichum* spp. Discos miceliais de 3 mm de diâmetro foram retirados das margens das colônias e transferidos para placas de Petri (60 mm) contendo meio mínimo modificado e clorato de potássio (MMC), nas concentrações de 1,5% a 2,5%. Para cada isolado foram transferidos 10 discos miceliais e as placas foram incubadas no escuro, a 22°C.

Foram adicionados ao meio MMC dois aminoácidos L-asparagina e L-treonina. Nos primeiros testes, adicionou-se 1,6 g/L de L-asparagina que, posteriormente, foi substituída por L-treonina na proporção de 1,4 g/L de MMC (Klittich & Leslie, 1988).

As placas foram examinadas semanalmente, a fim de se verificar a formação de setores. Após a formação dos mesmos, foram transferidos para placas contendo meio basal contendo nitrato de sódio (MM). Os isolados que tiveram crescimento ralo em meio MM, com pouca produção micelial, foram classificados como mutantes *nit*. Isolados que apresentavam crescimento robusto semelhante ao tipo selvagem após o cultivo em MMC foram descartados (Leslie et al., 2006).

3.3 Caracterização fenotípica dos mutantes *nit*

Os mutantes foram classificados nas quatro classes fenotípicas (Tabela 2), conforme a metodologia utilizada em estudos de *Colletotrichum* spp. (Brooker et al., 1991).

A morfologia das colônias foi observada em meio basal (MB) suplementado com três diferentes fontes de nitrogênio: nitrito de sódio (0,5 g/L e 0,4 g/L), hipoxantina (0,5 g/L) e tartarato de amônia (1,0 g/L).

Cada mutante *nit* foi transferido para três placas de 90 mm de diâmetro, uma contendo nitrito de sódio (MN), uma com hipoxantina (MX) e outra com tartarato de amônia (MA), dispostos em um arranjo de 3 colunas por 4 linhas, contendo 12 discos de micélio por placa, com o mesmo espaçamento (Figura 2). No verso de cada placa, foram marcados os pontos onde seriam colocados os discos de micélio. Os pontos na parte superior da placa foram utilizados para *nit1*, *nit3* e *nitM*, usados como testemunhas e os demais foram inoculados os discos miceliais dos mutantes *nit*, cujos fenótipos seriam identificados. As placas foram mantidas a 22°C por um período de 14 dias. Foram realizadas duas repetições e feitas duas avaliações, uma aos 7 dias e outra aos 14 dias.

Os mutantes *nit* que apresentaram crescimento robusto em MN e em MX foram denominados *nit1*; os mutantes que apresentaram crescimento robusto somente em MX foram denominados *nit3* e os mutantes que apresentavam crescimento robusto somente em MN foram denominados *nitM* (Correll et al., 1987). Os meios contendo tartarato de amônia e nitrato de sódio foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente (Leslie et al., 2006).

3.4 Análise da autocompatibilidade vegetativa

A autocompatibilidade vegetativa dos isolados que obtiveram mutantes *nit* de diferentes fenótipos foi testada, por meio do seu pareamento em meio MM, colocando-se os blocos miceliais afastados entre si em 1 cm. Foram realizadas duas repetições e as placas foram incubadas por, pelo menos, quatro semanas, observando-se a presença de micélio aéreo (tipo selvagem), na zona de contato entre as duas colônias.

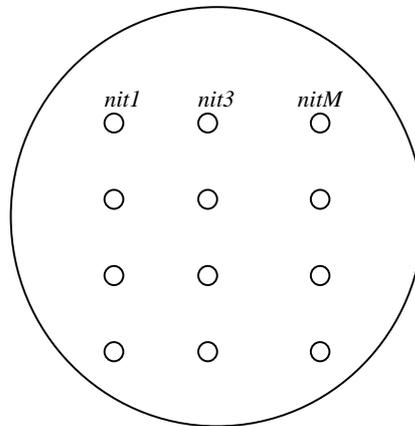


FIGURA 2 Arranjo dos mutantes *nit* para caracterização fenotípica. Os pontos na parte superior da placa foram utilizados para *nit1*, *nit3* e *nitM* e os demais foram inoculados os discos miceliais dos mutantes *nit*, cujos fenótipos seriam identificados.

TABELA 2 Caracterização dos mutantes *nit* por meio do crescimento em meios com diferentes fontes de nitrogênio (Brooker et al., 1991).

Mutantes	Fontes de nitrogênio			
	MA	MM	MN	MX
Selvagem	+	+	+	+
<i>nit1</i>	+	-	+	+
<i>nit2</i>	+	-	-	-
<i>nit3</i>	+	-	-	+
<i>nitM</i>	+	-	+	-

(MA) meio basal suplementado com tartarato de amônia

(MM) meio basal suplementado com nitrato de sódio

(MN) meio basal suplementado com nitrito de sódio

(MX) meio basal suplementado com hipoxantina

3.5 Testes de compatibilidade vegetativa

Foram realizados pareamentos entre os sete isolados nos quais se obtiveram mutantes das classes fenotípica *nit1* e *nit3* e todos os outros isolados nos quais se obtiveram somente mutantes *nit3*. Posteriormente, foram realizados pareamentos entre os mutantes de todos os isolados obtidos no presente trabalho e o mutante *nitM*.

Os testes de compatibilidade vegetativa foram realizados em placas de Petri (90 mm), de acordo com a metodologia de Leslie et al. (2006). Os pareamentos foram feitos em um arranjo contendo quatro mutantes *nit3* nas margens da placa e um mutante *nit1* ou *nitM* no centro da mesma. Discos miceliais dos mutantes complementares foram colocados em meio MM afastados 1 cm entre si e incubados no escuro, a 22°C. Foram realizadas duas repetições e após 15 dias de incubação, foi avaliada semanalmente a presença de heterocário.

De acordo com essa metodologia, isolados pertencentes ao mesmo VCG apresentam crescimento denso do micélio aéreo na linha de intersecção, entre *nit3* e *nit1* ou *nitM* do outro isolado. Isolados de VCGs diferentes apresentam crescimento ralo na linha de intersecção entre *nit3* e *nit1* ou *nitM* dos mesmos. No controle positivo, observa-se o crescimento de micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit3* e *nit1* ou *nitM* do mesmo isolado testado.

3.6 Extração de DNA

A extração foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida por Raeder & Broda (1895) modificada. Consistiu na transferência da massa micelial para um almofariz de porcelana e maceração em 10 ml de tampão de

extração (100 mM de TRIS pH 8.0, 20mM de EDTA pH 8.0, 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona – PVP) contendo 2% de CTAB a 65°C, mais 30µl de β-mercaptoetanol, com auxílio de areia esterilizada e nitrogênio líquido. O macerado foi mantido em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos e, logo após, resfriados em água corrente durante 5 minutos. Foram adicionados 10 ml de solução clorofórmio:álcool isoamil (24:1), homogeneizado gentilmente e centrifugado, durante 10 minutos, a 4.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e misturado 30 ml de uma solução de álcool etílico a 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1) e levado ao freezer (-20°C) por seis horas, no mínimo. O ácido nucléico precipitado foi seco e adicionados 300µl de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM pH 7,7). Uma segunda extração foi realizada com clorofórmio/álcool isoamil e o sobrenadante coletado foi misturado com o triplo do volume de álcool a 95%:acetato de amônio 3M (20:1) e mantido no freezer por, no mínimo, seis horas. Eliminou-se a solução de álcool acetato de sódio e dissolveu-se o DNA em 50-100µl de TE. Após esse processo, o material foi quantificado, utilizando-se um fluorímetro Hoeffler Scientific TKO 100. Para isso, foram utilizados 2 µl da solução de DNA em 2 ml de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1 mM e NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1µl.ml⁻¹ do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE para uma concentração de 10ng.ml⁻¹ para as reações de RAPD.

3.7 Reação RAPD

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica RAPD. Cada reação de amplificação de 12 µl continha 4,49µl de água, 2,25µl de DNA (10ng.ml⁻¹), 0,66µl de dNTP (mistura equitativa de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,25µl (0,4 mM) de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1,0 µl de tampão de reação e 0,4 unidades da enzima Taq polimerase. Foram testados 24 *primers*. As

reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. Cada ciclo de amplificação correspondeu a: desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento a 37°C por 15 segundos e alongação a 72°C, por um minuto. Após os 40 ciclos, procedeu-se a extensão final, por dois minutos, a 72°C.

3.8 Eletroforese em gel

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,45 M de tris-borato, 0,01 M de EDTA pH 8.0) a 80 volts, durante 3h30. Em seguida, foram tratados com brometo de etídio, à concentração de 0,5 µg.ml⁻¹ e visualizados em transluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados em câmara fotográfica EDA – 290, da Kodak.

3.9 Análises estatísticas

Os dados de RAPD foram submetidos à análise de similaridade e agrupamento utilizando o programa NTSYS – pc 2.1 (Rohlf, 2000). Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas presentes nas 40 amostras. As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de isolados, foram efetuadas pelo coeficiente de Sorensen-Dice, por meio da expressão $sg_{ij} = 2a / 2a + b + c$, sendo a presença da banda em ambos isolados i e j ; b presença da banda apenas no isolado i e c apenas no isolado j . O dendograma foi obtido por meio de análises de agrupamento de similaridades, utilizando-se o método da média das similaridades (UPGMA). Os erros associados a cada similaridade foram estimados utilizando-se a expressão $s_{gs} = \{sg_{ij} [(1-sg_{ij})/(n-1)]\}^{0,5}$, em que n é a

soma de a, b, e c para cada par de isolados. Os isolados pertencentes a diferentes grupos foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste de t, utilizando-se a expressão $sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{sg})$, em que t é o valor tabelado da distribuição de t de Student, a 1% de probabilidade, com n-2 graus de liberdade e \bar{s}_{sg} o erro médio das comparações consideradas no dendograma.

4 RESULTADOS

4.1. Obtenção de mutantes *nit*

Foram considerados mutantes *nit* os setores que apresentaram crescimento ralo em meio MM, com pouco ou nenhum micélio aéreo (Figura 3). Dos 47 isolados de *C. lindemuthianum* cultivados em meio mínimo com clorato (MMC), foram recuperados 295 mutantes *nit*.

Foi observado que 4,41% dos mutantes reverteram ao fenótipo selvagem após alguns dias de transferência para o meio mínimo, os quais foram descartados. A formação de setores variou entre os isolados; alguns apresentaram um único setor por colônia e outros produziram mais de um (Figura 4). Porém, muitos isolados não formaram setores, no entanto, quando transferidos para meio mínimo, apresentaram crescimento ralo do micélio, sendo considerados mutantes *nit*.

Foi observado aparecimento de setores após 21 dias, sendo mais freqüente após cinco ou seis semanas, a partir da repicagem para MMC. De modo geral, foi obtido maior número de mutantes na concentração de 2,0% de $KClO_3$ do que em 1,5% e a concentração de 2,5% foi tóxica para alguns dos isolados, não ocorrendo o crescimento de micélio.

4.2 Classificação fenotípica dos mutantes *nit*

O fenótipo dos mutantes *nit* foi identificado após o crescimento em meio base contendo hipoxantina (MX), nitrito (MN) e tartarato de amônia (MA) como fontes de nitrogênio (Figura 5). Foram recuperados 279 mutantes *nit3*, 15 mutantes *nit1* e um mutante *nitM*. Sete isolados apresentaram mutantes *nit1* e *nit3*, 39 isolados apresentaram somente mutantes *nit3* e um isolado apresentou somente um *nitM*.

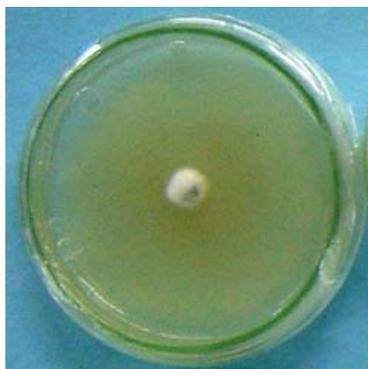


FIGURA 3 Crescimento ralo em meio MM, mutante *nit* do isolado LV59.

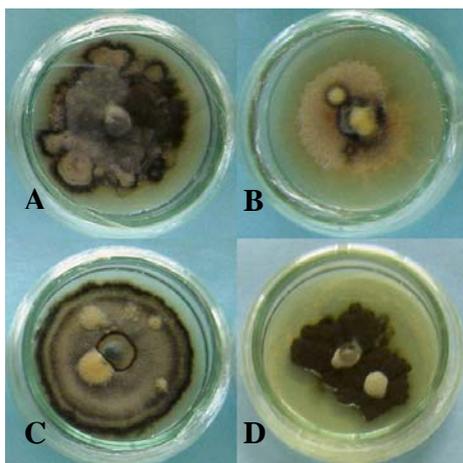


FIGURA 4 Produção de setores resistentes ao clorato de potássio apresentando micélio aéreo denso e coloração amarela e branca. A, B e C: isolado LV 75, D: isolado LV 69.

No presente estudo, a substituição do aminoácido L-asparagina por L-treonina no meio MMC não permitiu aumento significativo na obtenção de mutantes *nitM*. Inicialmente, foi utilizada a concentração de nitrito no meio MN de 0,5 g/L. Após a observação da grande proporção de mutantes *nit3*, foram realizados testes com concentração modificada para 0,4 g/L e avaliados novamente todos os mutantes nesse meio seletivo. Foi observado que quatro mutantes *nit3* mudaram fenótipo para *nit1*.

4.3 Análise da autocompatibilidade

Foram realizadas análises de autocompatibilidade entre os 7 isolados nos quais se obtiveram mutantes *nit1* e *nit3*. Seis isolados demonstraram ser auto-incompatíveis, não ocorrendo a formação de heterocário e crescimento de micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit3* e *nit1* do mesmo isolado testado e um isolado (LV97) demonstrou compatibilidade fraca, com pouco crescimento de micélio na linha de intersecção entre *nit3* e *nit1*.

4.4 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)

Os 47 isolados estudados formaram 45 VCGs, um grupo com os isolados LV13, LV68 e LV48, e 44 foram incompatíveis, constituindo membros únicos de VCGs diferentes. Houve complementação entre mutantes *nit3* dos isolados LV13 e LV68 (Figura 6).

Foi observada complementação fraca entre os isolados LV70 e LV51, LV68 e LV51, LV97 e LV73, visualizada por uma linha de pequenos tufo brancos de micélio. No entanto, não foram considerados do mesmo VCG por não ter sido observado crescimento de micélio aéreo abundante na linha de

intersecção. Nos pareamentos de todos os mutantes *nit3* com o mutante *nitM*, não foi observada complementação.

O tempo para a formação do heterocário variou entre as complementações observadas. Apenas as complementações entre os isolados LV13 e LV68 ocorreram na primeira semana, sendo a maioria observada após a segunda semana.

4.5 Análises RAPD

Dos 24 *primers* utilizados, 18 exibiram polimorfismo, amplificando um total de 111 bandas polimórficas, gerando, em média, 6,2 bandas polimórficas por *primer*. Com base nas 111 bandas polimórficas, foi construída uma matriz de similaridade genética e, utilizando-se o coeficiente de Sorensen-Dice, obtiveram-se as estimativas das similaridades genéticas que variaram de 0,42 a 0,96. Para melhor visualização, foi construído um dendograma (Figura 7). A linha de corte, dada pela estimativa de sg_m , a 1% de probabilidade pelo teste de *t*, foi de 0,889. Pela análise do dendograma foi possível verificar a formação de 18 grupos de similaridade.

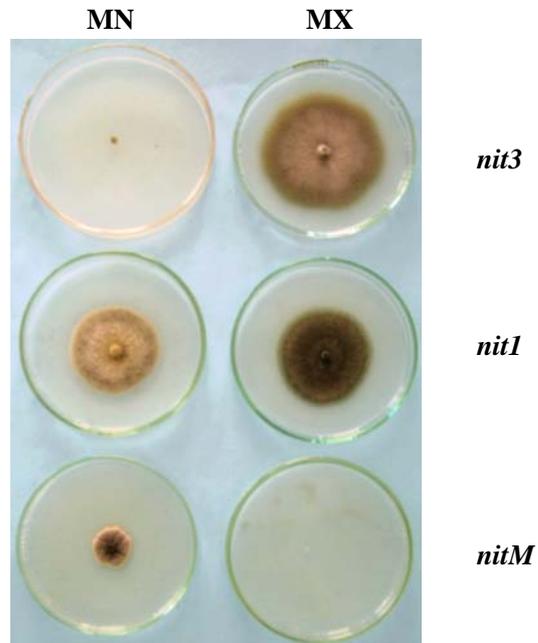


FIGURA 5 Classificação dos mutantes *nit* em meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio: nitrito de sódio (MN) e hipoxantina (MX).

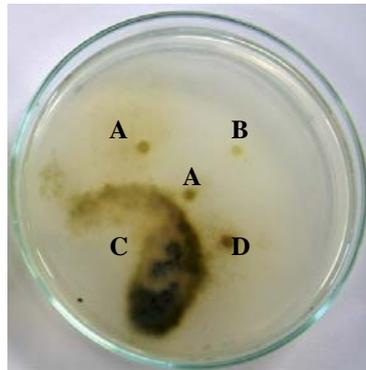


FIGURA 6 Pareamento entre os isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*. No centro, *nit1* (A.- LV48), nas margens *nit3* (A.- LV48, B - LV69, C - LV13, D - LV68).

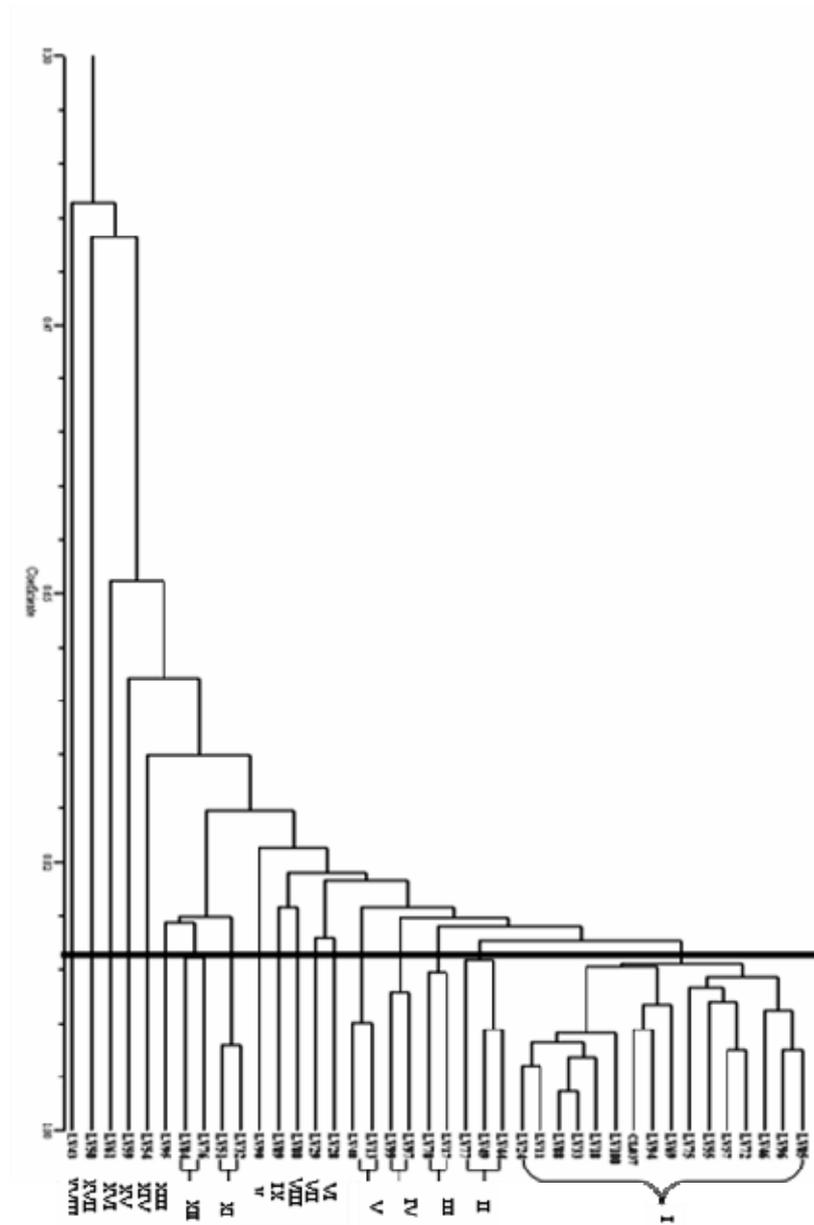


FIGURA 7 Dendrograma de similaridade genética dos 40 isolados de *C. lindemuthianum*.

5 DISCUSSÃO

Verificou-se que alguns mutantes *nit* reverteram ao tipo de crescimento selvagem após repicagem para meio mínimo. Leslie et al. (2006) citam que a base genética para tais reversões não tem sido estudada em detalhes, mas é comumente devido à presença de núcleo selvagem e mutante em um heterocário. Fávaro et al. (2007) observaram, em *Colletotrichum sublineolum*, alta frequência de reversão em mutantes *nit*, sugerindo que a instabilidade dos isolados pode ser resultado da atividade de elementos transponíveis. O envolvimento de elementos transponíveis na geração da instabilidade e variabilidade tem sido investigado em várias espécies fúngicas, especialmente em fungos fitopatogênicos que apresentam alto nível de variabilidade (Daboussi 1997; Daboussi & Capy 2003; Pereira, et al., 2003).

Foi observada variação na frequência de obtenção de setores e Brooker et al. (1991) citam que a frequência com a qual setores espontâneos surgem em culturas varia de espécie para espécie e, mesmo, entre isolados dentro de uma mesma espécie. Condições ambientais, como temperatura, nutrientes, meio de cultura e fonte de inóculo utilizados, tais como conídios, micélio ou mistura de ambas, também podem afetar esta variação.

O surgimento de setores ocorreu após 21 dias, sendo mais frequente após cinco ou seis semanas a partir da repicagem para MMC. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, verificam-se, em *C. lindemuthianum*, crescimento lento da colônia e maior tempo para a obtenção de setores do que em outras espécies desse patógeno. Booker et al. (1991) obtiveram a formação de setores a partir da primeira semana até a quinta após a repicagem para MMC em *C. destructivum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. malvarum* e *C. trifolii*. Outros estudos mostram a obtenção de setores entre 7 e 28 dias, em *C. orbiculare* (Wasilwa et al., 1993); aos 21 dias, em *C. coccodes* (Nitzan et al.,

2002) e aos 8 dias, para *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Várzea et al., 2002). Recentemente, em *Colletotrichum gloeosporioides*, Pereira (2005) obteve maior frequência dos setores aos 10 dias, porém, alguns isolados apresentaram setores somente a partir do 20º e do 30º dia de cultivo em MMC.

A concentração de clorato influenciou na obtenção de mutantes neste estudo. Do mesmo modo, Pereira (2005) obteve maior produção de mutantes em concentração de 2,0% para *Colletotrichum gloeosporioides*. Além disso, tem sido relatado que alguns isolados podem produzir setores na concentração de 1,5% de KClO₃ e outros requererem uma concentração maior para formar setores (Klittich & Leslie, 1988; Leslie, 1993).

A maior frequência de mutantes *nit3* obtidos neste trabalho estão de acordo com alguns estudos, por exemplo, na espécie *C. fragariae* (Brooker et al., 1991) e *C. kahawae* (Beynon et al., 1995). Tais resultados diferem dos obtidos em outros estudos em *Colletotricum*, nos quais foi observada a predominância da classe fenotípica *nit1*. Segundo Várzea et al. (2002), fenótipos *nitM* não foram produzidos por alguns isolados, mesmo após exaustivas tentativas. Em *C.coccodes*, a frequência foi de 84,3%, para as classes *nit1/nit3* e de 15,7% para *nitM* (Nitzan et al., 2002). Pereira (2005) obteve, em *C. gloeosporioides*, maior frequência de mutantes *nit1*, seguida por *nit3* e *nit2*, não obtendo mutantes *nitM*. Mais recentemente, Fávaro et al. (2007) obtiveram maior frequência de mutantes *nit1*, seguidos por *nitM*.

A relação entre o tipo de aminoácido e a recuperação de mutantes *nitM* tem sido observada em estudos anteriores (Klittich & Leslie, 1988; Leslie, 1993; Leslie et al., 2006). No entanto, neste estudo não foi verificado aumento de obtenção de mutantes dessa classe fenotípica, após a substituição do aminoácido.

A dificuldade em se obter mutantes *nit* de todas as classes fenotípicas, especialmente de *nitM*, já foi observada por Beyon et al. (1995) que, a partir de 27 isolados de *C. kahawae*, 7 isolados de *C. gloeosporioides* e 2 isolados de *C.*

acutatum, só obtiveram mutantes *nit* de 7 isolados e a maioria desses era da classe fenotípica *nit1* e *nit3* seguida por *nitM*. Brooker et al. (1993) citam que uma importante diferença entre estudos de VCG em *Colletotrichum* e outros patógenos, como *Fusarium* ou *Aspergillus*, é a falta de classes de mutantes *nit* resistentes ao clorato e que, nesse sentido, *Colletotrichum* assemelha-se mais a *Neurospora*.

Leslie et al. (2006) citam que o nitrito pode ser usado como fonte de nitrogênio, mas, em altos níveis é tóxico. No estudo realizado por Brooker et al. (1993), a espécie *C. malvarum* foi sensível ao nitrito e seus mutantes não puderam ser classificados como *nit1* ou *nit3*. No presente estudo, quatro mutantes *nit3* mudaram fenótipo para *nit1* após a redução da concentração de nitrito e isso reforça a possível toxicidade da concentração de MN 0,5 g/L para *C. lindemuthianum*.

O uso do arranjo de nove mutantes *nit* por placa de Petri (90 mm) possibilitou a classificação fenotípica dos mutantes *nit*, principalmente devido a facilidade, praticidade e rapidez desse método, como constatado por Leslie et al. (2006).

Verificou-se a existência de isolados auto-incompatíveis neste estudo. O fenômeno da auto-incompatibilidade foi relatado para *C. destructivum* e *C. fragarie* (Brooker et al., 1991), *C. orbiculare* (Wasilwa et al., 1993), nas espécies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. kahawae* (Beynon et al., 1995 e Várzea et al., 2002) e em *C. gloeosporioides* (Pereira, 2005).

A auto-incompatibilidade tem sido atribuída à mutação em um loco associado à esterelidade feminina em *Fusarium* (Correl et al., 1989) e que pode afetar aspectos do ciclo de vida, além da habilidade para formar heterocáριο, sendo esta uma característica inerente ao isolado (Brooker, et al., 1991). Este último autor cita, ainda, que esses isolados podem ser utilizados em estudos de

DNA recombinante ou controle biológico, nos quais é indesejável utilizar isolados que formam heterocário com qualquer outro na população.

A instabilidade genética devido a haploidização ou as sucessivas repicagens *in vitro* poderiam causar alterações que levariam a auto-incompatibilidade, porém, em *Colletotrichum*, ainda não foram realizados estudos a fim de explicar a origem e a função de tal característica.

A ocorrência da incompatibilidade entre os isolados do presente estudo, possivelmente, se deve ao fenômeno da auto-incompatibilidade, pois isolados auto-incompatíveis, usualmente, não formam heterocários com nenhum outro (Leslie, 1993). Todavia, alguns isolados formaram heterocário entre mutantes *nit3*, podendo-se argumentar que, provavelmente, não são auto-incompatíveis. Porém, a sua autocompatibilidade não pôde ser testada por não terem sido encontrados mutantes complementares para tais isolados. Segundo Leslie (1993), alguns isolados auto-incompatíveis podem formar heterocários fracos com raças autocompatíveis. Desse modo, tais isolados parecem ter a capacidade de formar heterocário somente diminuída em vez de uma inabilidade completa.

Brooker et al. (1993) observaram incompatibilidade entre os cinco isolados autocompatíveis que obtiveram, sugerindo que a troca de informação genética dentro e entre espécies está sujeita a limitações e que as diferenças genéticas em *Colletotrichum* sustentam a evidência da alta complexidade dentro desse gênero. Nitzan et al. (2002) observaram que 27% dos isolados de *C. coccodes* não eram compatíveis com mutantes complementares de outros isolados, constituindo VCGs diferentes. O padrão de complementariedade do heterocário identificado por Abang et al. (2004) mostrou que os 41 isolados de *C. gloeosporioides* foram divididos em 28 VCGs, tendo 23 sido constituídos de um único isolado. Pereira (2005) utilizou 23 isolados de *C. gloeosporioides* e obteve 16 VCGs, tendo a maioria sido formada por um único isolado.

Papa (1986) estudou a incompatibilidade do heterocário em *Aspergillus flavus* e sugeriu que a falta de complementação pode ser devido a mutação dupla em alguns mutantes *nit*. Correl et al. (1993) citam que a falta de complementação pode ser devido à incapacidade dos isolados de formar anastomose entre hifas, o que foi constatado em *Colletotrichum lindemuthianum*, por Ishikawa (2006). Esta autora observou que os isolados LV58, LV61 e LV73 pertenceram a um mesmo grupo de anastomose e diferentes grupos utilizando as estimativas de similaridade genética obtidas por meio dos marcadores RAPD. Portanto, esses indivíduos são geneticamente diferentes, mas têm a capacidade de formação da anastomose entre si, que é o primeiro passo para a ocorrência do ciclo parassexual. No entanto, no presente estudo foi verificado que esses mesmos isolados não pertenceram a um mesmo VCG e, portanto, devem possuir os mesmos genótipos para os genes que controlam os eventos de pré-fusão e diferenças alélicas entre os genes que controlam a compatibilidade vegetativa, de forma que possuem capacidade para formar anastomose, mas posteriormente não chegam a formar heterocário. O isolado LV73 demonstrou-se auto-incompatível. Nesse caso, a diferença alélica ocorre nos genes *het* que controlam o auto/não-auto-reconhecimento.

O agente causal da antracnose do feijoeiro ainda não foi encontrado na natureza na sua forma sexual (Mahuku & Riascos, 2004) Todavia, tem sido relatada a ocorrência da fase sexual em condições de laboratório (Camargo Júnior, 2004). Visto isso, é relevante citar que, se uma população se reproduz sexualmente, maior será a variação genética e, conseqüentemente, maior o número de VCGs, uma vez que as combinações entre os locos *vic* são inúmeras (Leslie, 1993). Este último autor cita que, em estudos de VCGs em *Fusarium*, ocorre o padrão de muitos isolados e VCGs com um ou poucos isolados por VCG. As conclusões de tais estudos indicam que existe grande quantidade de diversidade genética dentro da população e, que o mecanismo gerador de

variação genotípica que é comumente a recombinação sexual, precisa ser identificado (Leslie et al., 2006). A possível ocorrência da fase sexual também justificaria o fenômeno da auto-incompatibilidade, uma vez que quanto maior a variabilidade genética maior a possibilidade de isolados se tornarem auto-incompatíveis, devido à grande variabilidade nos locos *hsi* que governam os eventos de pré-fusão. Brygoo et al. (1998), estudando a reprodução e a estrutura populacional de fungos patogênicos, verificaram que, no caso de *C. lindemuthianum*, apesar da fase sexual nunca ter sido observada na natureza, a organização e a diversidade genética são mais semelhantes à de populações originadas de reprodução sexuada do que a de populações assexuadas.

A grande variação genética e a possibilidade da ocorrência do ciclo sexual ampliando a variação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* podem ser evidenciadas quando se observa que, no estudo de Ishikawa (2006), os isolados LV28, LV29, LV57, LV90, LV80, LV55, LV89, CL844 e LV59 não formaram anastomose com nenhum outro isolado. Do mesmo modo, no presente estudo, esses mesmos isolados foram incompatíveis, constituindo membros únicos de VCGs diferentes, sugerindo que, nesses isolados existam diferenças alélicas nos genes que controlam a pré-fusão e a compatibilidade vegetativa. Além disso, Ishikawa (2006) também observou que o isolado LV90 não formou anastomose com nenhum outro e, no presente estudo, este mesmo e cinco outros isolados foram auto-incompatíveis, o que pode sugerir que existe variabilidade entre os alelos dos genes *hsi*.

A ocorrência da complementaridade entre mutantes de mesmo fenótipo não é freqüente, porém, pode ocorrer. Em *Fusarium*, Correl et al. (1993) observaram que alguns mutantes *nit1* e *nitM* foram complementares entre si, porém, não foi observada complementação entre mutantes *nit3*. Também foi relatada complementaridade entre mutantes *nit1* e *nit3* de mesmo fenótipo, por Beynon et al. (1995), em *Colletotrichum*. Gichuru et al. (2000) observaram

complementaridade entre mutantes *nit3* em *Colletotrichum kahawae* e complementação entre mutantes *nit1* foram observadas por Abang et al. (2004), para *C. gloeosporioides*.

No presente estudo, os pareamentos foram realizados entre *nit3* e *nit1* ou *nitM* e Leslie et al. (2006) citam que mutantes *nit3* podem ser utilizados, mas pareamentos entre *nit1* com *nit3*, usualmente, não fornecem resultados tão claros quanto os obtidos por pareamentos entre *nit1* e *nitM*. Do mesmo modo, tem sido relatado, em *Colletotrichum* (Correl et al., 1987; Abang, et al., 2004) e em *Fusarium* (Correl et al., 1993), que a complementação entre mutantes *nit3* e *nit1* é fraca, podendo, inclusive, não ocorrer, e complementação forte frequentemente ocorre entre mutantes *nit1* ou *nit3* com *nitM*. Quando mutantes *nit1* e *nit3* foram pareados por Correl et al. (1993), a complementação não foi evidente por duas a três semanas, sendo frequentemente fraca e observada após a terceira semana.

O mesmo foi comprovado para *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, em que a complementação mais freqüente e que desenvolveu heterocário mais vigoroso ocorreu entre os pareamentos de *nitM* e *nit1* (Várzea et al., 2002).

A formação de heterocário foi detectada de forma geral na primeira semana, porém, após três semanas, observou-se início da formação de heterocário. No presente estudo, não foram detectadas complementações nos pareamentos com o mutante *nitM*, no entanto, deve-se ressaltar que o período para formação do heterocário pode se estender até quatro semanas após os pareamentos em meio MM. Observações similares foram relatadas por outros autores com espécies do gênero *Colletotrichum* (Brooker et al., 1991; Wasilwa et al., 1993; Beynon et al., 1995; Gichuru et al., 2000; Abang et al., 2004).

As análises de RAPD dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* demonstraram a grande variabilidade existente dentro e entre raças. A variação dentro e entre raças utilizando marcadores moleculares também foi observada

por outros autores (Mahuku & Riascos, 2004; Talamini et al., 2006; Silva et al., 2007).

O resultado obtido pela análise de similaridade dos isolados avaliados neste estudo, utilizando os marcadores RAPD, comprova essa ampla variabilidade, já que foram obtidos 18 grupos diferentes e as estimativas variaram de 0,42 a 0,96. Analisando-se o dendograma de similaridade genética (Figura 4), pode-se visualizar que não houve associação dos agrupamentos RAPD com local de origem, pois isolados de diferentes estados estão em um mesmo grupo.

De forma geral, os resultados evidenciam que não existiu associação entre o agrupamento por meio dos marcadores RAPD, a patogenicidade, região de coleta, e compatibilidade vegetativa, ocorrendo, no entanto, algumas exceções. Associações foram observadas com relação à patogenicidade e grupos RAPD para os isolados do grupo III (LV17 e LV70), que são da raça 81 e os isolados do grupo XI (LV32 e LV51), que pertencem à raça 73. Do mesmo modo, apenas algumas associações foram obtidas com relação a grupos de RAPD e a compatibilidade vegetativa, pois os isolados LV13 e LV48 foram agrupados em um mesmo VCG e grupo de similaridade (grupo 11). Além disso, os isolados LV28, LV29, LV80, LV89, LV90, LV95, LV54, LV59, LV61, LV50 e LV43 foram classificados em grupos individuais, tanto na análise de VCGs como a de marcadores RAPD.

A observação de uma tendência de agrupamentos por região de origem foi relatada por Sicard et al. (1997). Outros estudos com o *Colletotrichum lindemuthianum* não obtiveram concordância entre os resultados de RAPD e patogenicidade (Sicard et al., 1997; Talamini et al., 2006; Silva et al., 2007).

A falta de concordância entre resultados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e local de origem no gênero *Colletotrichum* foi

relatada em outros estudos (Wasilwa et al., 1993; Abang et al., 2004; Pereira, 2005;).

Dessa forma, as análises utilizando mutantes *nit* para identificar grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores moleculares RAPD apresentaram-se como ferramentas potenciais para a compreensão da estrutura e da dinâmica populacional desse patógeno.

5 CONCLUSÕES

1. A utilização de mutantes *nit* para estudos de compatibilidade vegetativa é eficiente para estudos de variabilidade e estrutura de populações desse patógeno e permitiu observar grande variabilidade dentro e entre raças.

2. Existe grande variabilidade genética entre e dentro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, comprovada por meio de marcadores RAPD.

3. Foi constatada baixa frequência de mutantes *nitM* entre os isolados avaliados.

4. De forma geral, não houve concordância entre os agrupamentos obtidos por meio dos grupos de compatibilidade vegetativa, marcadores RAPD, patogenicidade e local de origem dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANG, M. M.; HOFFMANN, P.; WINTER, S.; GREEN, K. R.; WOLF, G. A. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from Yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 1, p. 21-27, Jan. 2004.

BARROS, G.G.; TORRES, A. M.; RODRIGUEZ, M. I.; CHULZE, S. N.; Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 145-152, Jan. 2006.

BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VARZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 6, p. 457-476, June 1995.

BROOKER, N. L.; VESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Nitrate Non-Utilizing Mutants of *Colletotrichum* and their Use in Studies of Vegetative Compatibility and Genetic Relatedness. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 672-676, June 1991.

BRYGOO, Y. et al. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi, In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Eds.). **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 133-148.

BUTCHER, A. C. Non-allelic interactions and genetic isolation in wild populations of *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, Oxford, v.24, n. 4, p. 621-631, 1969.

BUTCHER, A.C. The relationship between sexual outcrossing and heterokaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 443-452, 1968.

BUTCHER, A. C.; CROFT, J. H.; GRINDLE, M. Use of genotype environmental interaction analysis in the study of natural populations of *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, Oxford, v. 29, p. 263-283, Dec. 1972.

CAMARGO JUNIOR, O.A. **Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD.** 2004, 60 p.
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CATTI, A.; PASQUALI, M.; GHIRINGHELLI, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Analysis of vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* from *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n.1, p. 61-64, Jan. 2007.

CHACKO, R.J.; WEIDEMANN, G.J.; TEBEEST, D.O.; CORRELL, J.C. The use of vegetative compatibility and heterokaryosis to determine potential asexual gene exchange in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biological Control**, v. 4, p. 382-389. Dec. 1994.

CHERRAB, M.; BENNANI, A.; CHAREST, P. M.; SERRHINI, M. N. Pathogenicity and vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* Kleb. Isolates from olive in Morocco. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 11-12, p. 703-709, Dec. 2002.

CORRELL, J.C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n.12, p. 1640-1646, Dec. 1987.

CORRELL, J.C. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility group in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 9, p. 1061-1064, Sept. 1991.

CORRELL, J. C.; MORELOCK, T. E.; GERBER, J. C. Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 7, p. 688-691, July 1993.

DABOUSSI, M. J. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetica**, Dordrecht, v. 100, n. 1-3, p. 253-260, 1997.

DABOUSSI, M. J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 275-299, 2003.

DUNN- COLEMAN, N.S., SMARRELLI, J., JR., GARRETT, R.H. Nitrate assimilation in eukaryotic cells. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 92, p. 50, 1984.

DUTTA, S. K.; GARBA, E. D. Genetics of phitopathogenic fungi. III. Attempt to demonstrate the parasexual cycle in *Colletotrichum lagenarium*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 122, n.1, p. 118-121, Jan/Feb. 1960.

DUTTA, S. K.; GARBA, E. D. Genetics of phytopathogenic fungi. IV. Fungicide resitance in *Colletotrichum lagenarium*.. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, n. 1, p. 35-38, Jan. 1962.

ELENA, K.; PAPPAS, A. C. Race distribution, vegetative compatibility and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* isolates in Greece. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 4, p. 250-255, Apr. 2006.

ELIAS, K.; SCHNEIDER, W. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 159-162, Feb. 1991.

ELMER, W. H.; STEPHENS, C. T. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *aspargii* into vegetatively compatible groups. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 1, p. 88-93, Jan. 1989.

FÁVARO, L. C. L.; ARAÚJO, W. L.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; AZEVEDO, J. L.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. **Mycological Research**, Oxford, v. 111, n. 1, p. 93-105, Jan. 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R. C. **Fungal Nutrition and Physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 401 p.

GICHURU, E. K.; VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; MASABA, D. M.; Vegetative compatibility grouping of *Colletotrichum kahawae* in Kenya. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 4, p. 233-237, Apr. 2000.

GLASS, N.L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo alto, v. 34, p. 165-186, 2000.

HANSEN, H. N.; SMITH, R. E. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*, **Phytopathology**, St. Paul, v. 22, p.953-964, 1932.

ISHIKAWA, F. H. **Variabilidade genética de isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses**. 2006. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

JACOBSEN, D. J.; GORDON, T. R. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 668-672, June 1988.

JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIN, L.; ROMERO, R.; GASPAROTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 31, n. 177, p. 322-331, Set. 1984.

KATAN, T; KATAN, J. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 852-855, June 1988.

KERÉNYI, Z.; TÁBORHEGYI, É.; POMÁZI, A.; HORNOK, L. Variability amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 882-889, Dec. 1997.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 774 p.

KIPROP, E. K.; MWANG'OMBE, A. W.; BAUDOIN, J. P.; KIMANI, P. M.; MERGEAI, G. Cultural characteristics, pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium udum* isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Kenya. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.108, n. 2, p.147-154, Feb. 2002.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Chlorate reduction mutants, nitrate-utilizing (crn) mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Journal of General Microbiology**, Washington, v. 135, n. 3, p. 721-727, Mar. 1989.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 417-423, Mar. 1988.

KNOX-DAVIES, P. S.; DICKISON, J. G. Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage *Trichometasphaeria turcica*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 47, p. 328-339, 1960.

KOROLEV, N.; PEREZ- ARTÉS, E.; BEJARANO- ALCÁZAR, J.; RODRÍGUEZ- JURADO, D.; KATAN, J.; KATAN, T.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of verticillium from cotton in Spain an Israel. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 4, p. 443-456, May 2001.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.2336-1342, 1993.

LESLIE, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 282-291, 1995. Supplement.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 75, n. 3, p. 415-424, Dec. 1996.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Malden, MA: Blackwell, 2006. 420 p.

MAHUKU G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n. 3, p. 253-263, Mar, 2004.

MARZLUF, G. A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 45, n. 3, p. 437-461, Sept. 1981

MCPHERSON, M.J.; MOLLER, S.G. **PCR: the basics**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. 276 p.

MENDES-COSTA, M.C.; MENDONÇA, H. A. Morfologia, Crescimento e Produção de Conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 475-479, out. 1996.

MONTEIRO, J. H. A. **Grupos de compatibilidade vegetative em isolados de *Fusarium* associados à malformação da mangueira no Brasil.** 2006. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSROR (LAHKIM), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 827-832, Aug. 2002.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 89-92, jan./mar. 2003.

PAPA, K. E. Heterocaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, New York, v. 78, n. 1, p. 98-101, Jan./Feb. 1986.

PASQUALI, M.; MARENA, L.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Vegetative compatibility grouping of the *Fusarium* wilt pathogen of Paris daisy (*Argyranthemum frutescens* L.). **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 5, p. 257-259, May 2004.

PEREIRA, J. F.; LIMA, J.O.; ROCHA, R. B.; MEDINA, P. X. L.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 5, n. 31, p. 74-85, mar./abr. 2003.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetative e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** 2005. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. **Jornal General Microbiology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 7-8, Jan. 1952.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 10, p. 393-400, Oct. 1956.

PUHALLA, J. E.; HUMMEL, M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 9, p. 1305-1308, Sept. 1983.

PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, n.2, p.179-183, Feb. 1985.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi, **Applied Microbiololy**, Washington, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan./Feb. 1985.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* em Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.388-391, set.1993.

RAVA, A. C.; SARTORATO, A Antracnose. In: RAVA, A. C.; SARTORATO, A. (Ed). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994a. p. 17-40

RAVA, A.C.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p.167-172, jun. 1994b.

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

ROCA, M. M. G. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios**. 2002. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROSALEE, A.; COELHO, N.; DHINGRA, O. D. Grupos de compatibilidade vegetative entre isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 546-548, dez. 1999.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 2000. 470 p.

SATYAPRASAD, K.; BATEMAN, G. L.; WARD, E. Comparisons of isolates of *Fusarium avenaceum* from White Lupin and other crops by pathogenicity

tests, DNA analyses and vegetative compatibility tests. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n.4, p. 211-219, Apr. 2000.

SAUPE, S. J. Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, Sept. 2000.

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**, St. Paul, v. 87, n. 8, p. 807-813, Aug. 1997.

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

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p. 1-26.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; SILVA, G. F.; ISHIKAWA, F. H.; CAMARGO JUNIOR, O. A. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 545-550, nov./dez. 2006.

TINLINE, R.D. *Cochliobolus sativus*. Heterokaryosis na parasexuality. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 425-437, 1962.

TSROR, L.; LEVIN, A. G. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* Kleb. Isolates from olive in Israel. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 7-8, p. 451-455, Aug. 2003.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU R. M. Nitrate-Nonutilizing Mutants Used to Study Heterokaryosis and Vegetative Compatibility in *Glomerella gram Nicola* (*Colletotrichum gram Nicola*). **Experimental Micological**, San Diego, v. 18, n. 4, p. 311-319, Dec. 1994.

VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum caraway* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002a.

VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; SILVA, M. C. M. L. Resistência do cafeeiro à antracnose-dos-frutos-verdes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002b. p. 321-368.

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

WASILWA, W. A.; CORREL, L.; MORECLOCK, T.; McNEW, R. E. Re-examination of races the cucurbit anthracnose pathogen, *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1190-1198, Nov. 1993.

ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M.; ROSTAMIAN, A. Characterization of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of RAPD analysis, virulence and vegetative compatibility. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 8-9, p. 449-453, Sept. 2004.

ZEISE, K.; VON TIEDEMANN, A. Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation *V. longisporum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 7-8, p. 469-475, Aug. 2001.

ZEISE, K.; VON TIEDEMANN, A. Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 112-119, Mar. 2002.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	53
Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas RAPD dos 40 isolados.	

TABELA 1A Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas RAPD dos 40 isolados avaliados.

Bandas	AQ12a	AQ12b	AQ12c	AQ20a	AQ20b	AQ20c	AQ20d	AQ20e	AR06a	AR06b
LV05	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
LV17	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV32	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
LV44	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV43	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
LV46	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
LV51	9	9	9	0	0	1	1	0	0	9
LV54	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
LV49	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV69	9	9	9	0	1	0	0	1	1	9
LV70	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
LV72	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV76	9	9	9	1	0	1	0	0	1	9
LV75	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV77	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV84	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
LV95	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
LV96	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
LV97	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
LV61	9	9	9	0	0	0	0	1	0	9
LV57	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV59	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
LV28	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
LV55	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
LV29	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
LV13	9	9	9	0	1	1	0	1	1	9
LV48	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
LV50	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
LV100	9	9	9	0	1	1	0	1	9	9
LV18	0	1	1	0	1	1	0	1	9	0
LV11	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
LV24	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
LV33	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
LV99	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
LV88	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
LV94	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
CL837	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
LV80	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
LV89	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
LV90	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AR06c	AR06d	AR06e	AR06f	AR06g	AR12a	AR12b	AR12c	AS03a	AS03b
LV05	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV17	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV32	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV44	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
LV43	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
LV46	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV51	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
LV54	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
LV49	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV69	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
LV70	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV72	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV76	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
LV75	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV77	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV84	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV95	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
LV96	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
LV97	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
LV61	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
LV57	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV59	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
LV28	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
LV55	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV29	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
LV13	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV48	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV50	1	1	0	1	0	9	9	9	1	0
LV100	9	9	9	9	9	1	1	1	1	0
LV18	9	9	9	9	9	1	1	1	0	0
LV11	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV24	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
LV33	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
LV99	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
LV88	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV94	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
CL837	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV80	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
LV89	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
LV90	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS03c	AS03d	AS06a	AS06b	AS06c	AS06d	AS06e	AS06f	AS06g	AS08a
LV05	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV17	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
LV32	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
LV44	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
LV43	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
LV46	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV51	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
LV54	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
LV49	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
LV69	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
LV70	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
LV72	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
LV76	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
LV75	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
LV77	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
LV84	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
LV95	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
LV96	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV97	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
LV61	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
LV57	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV59	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
LV28	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
LV55	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV29	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
LV13	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
LV48	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
LV50	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
LV100	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV18	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV11	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV24	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV33	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV99	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
LV88	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
LV94	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
CL837	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
LV80	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
LV89	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
LV90	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS08b	AS08c	AS08d	AS08e	AS08f	AS08g	AS08h	AS08i	AS08j	AS10a
LV05	0	0	1	1	1	1	0	0	0	9
LV17	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV32	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
LV44	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV43	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
LV46	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV51	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
LV54	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV49	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV69	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV70	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV72	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV76	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
LV75	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV77	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV84	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
LV95	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
LV96	0	1	1	1	1	1	0	1	0	9
LV97	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
LV61	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
LV57	1	0	1	0	1	1	0	1	0	9
LV59	0	0	1	1	1	1	1	1	1	9
LV28	1	0	1	1	1	0	0	1	0	9
LV55	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
LV29	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
LV13	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
LV48	1	0	1	1	1	1	0	0	0	9
LV50	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
LV100	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
LV18	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
LV11	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
LV24	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV33	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV99	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
LV88	0	0	1	1	1	1	0	1	0	9
LV94	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
CL837	0	0	1	1	1	1	0	0	0	9
LV80	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
LV89	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
LV90	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS10b	AS10c	AS10d	AS10e	AS10f	AS10g	AS12a	AS12b	AS12c	AS12d
LV05	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV17	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
LV32	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
LV44	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
LV43	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
LV46	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
LV51	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
LV54	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
LV49	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
LV69	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
LV70	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
LV72	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
LV76	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
LV75	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
LV77	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
LV84	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
LV95	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
LV96	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV97	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
LV61	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
LV57	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV59	9	9	9	9	9	9	0	0	0	1
LV28	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV55	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
LV29	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LV13	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
LV48	9	9	9	9	9	9	0	0	1	0
LV50	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
LV100	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
LV18	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
LV11	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
LV24	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
LV33	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
LV99	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
LV88	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV94	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
CL837	9	9	9	9	9	9	0	0	1	1
LV80	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
LV89	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
LV90	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS12e	AS12f	AS12g	AS12h	AS14a	AS14b	AS14c	AS14d	AS14e	AS14f
LV05	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
LV17	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
LV32	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
LV44	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
LV43	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
LV46	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
LV51	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV54	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
LV49	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
LV69	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
LV70	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
LV72	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
LV76	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
LV75	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
LV77	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
LV84	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
LV95	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
LV96	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
LV97	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
LV61	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
LV57	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
LV59	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
LV28	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
LV55	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
LV29	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0
LV13	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
LV48	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
LV50	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
LV100	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV18	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
LV11	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV24	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV33	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV99	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
LV88	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
LV94	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
CL837	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
LV80	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
LV89	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
LV90	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS14g	AS15a	AS15b	AS15c	AS15d	AS15e	AS17a	AS17b	AS17c	AS17d
LV05	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV17	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
LV32	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV44	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
LV43	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
LV46	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV51	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV54	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
LV49	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV69	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV70	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV72	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV76	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV75	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV77	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV84	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV95	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV96	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV97	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV61	0	0	0	1	1	0	9	9	9	9
LV57	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV59	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
LV28	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV55	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV29	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV13	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV48	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV50	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
LV100	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
LV18	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV11	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV24	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV33	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV99	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV88	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV94	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
CL837	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV80	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV89	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
LV90	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS17e	AS17f	AS17g	AS17h	AS17i	AS17j	AS17l	AS18a	AS18b	AS18c
LV05	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV17	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV32	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LV44	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
LV43	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
LV46	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV51	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LV54	1	1	1	1	1	1	0	9	9	9
LV49	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV69	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
LV70	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV72	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
LV76	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LV75	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV77	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV84	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LV95	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
LV96	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV97	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV61	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
LV57	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
LV59	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
LV28	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV55	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV29	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV13	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV48	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV50	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
LV100	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV18	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV11	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV24	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LV33	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV99	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
LV88	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV94	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
CL837	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
LV80	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LV89	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
LV90	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AS18d	AS18e	AS18f	AS18g	AS18h	AT08a	AT08b	AT08c	AT08d	AT08e
LV05	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV17	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV32	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
LV44	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV43	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
LV46	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV51	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV54	9	9	9	9	9	0	0	1	1	0
LV49	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
LV69	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV70	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV72	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV76	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV75	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
LV77	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV84	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
LV95	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
LV96	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV97	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV61	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0
LV57	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV59	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
LV28	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
LV55	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV29	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
LV13	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
LV48	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
LV50	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
LV100	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV18	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV11	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV24	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LV33	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV99	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV88	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
LV94	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
CL837	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
LV80	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LV89	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
LV90	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	AT08f	AT08g	AT08h	AT08i	AT08j	AT08l	BB07	BB09a	BB09b	BB09c
LV05	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV17	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV32	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LV44	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV43	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LV46	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV51	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LV54	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV49	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
LV69	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV70	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
LV72	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV76	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
LV75	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
LV77	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV84	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
LV95	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LV96	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV97	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV61	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
LV57	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1
LV59	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
LV28	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV55	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV29	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV13	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV48	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV50	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
LV100	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV18	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV11	1	0	0	1	1	0	1	9	9	9
LV24	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV33	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV99	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LV88	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV94	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
CL837	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV80	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV89	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
LV90	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

“...continua...”

“TABELA 1 A CONT”

Bandas	BB09d	BB09e	BB09f	BB10a	BB10b	BB10c	BB10d	BB10e	BB16a	BB16b	BB16c
LV05	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV17	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV32	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV44	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV43	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
LV46	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV51	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV54	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
LV49	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV69	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV70	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV72	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV76	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
LV75	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV77	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV84	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV95	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV96	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV97	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV61	1	0	1	9	9	9	9	9	0	0	1
LV57	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV59	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
LV28	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
LV55	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV29	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
LV13	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
LV48	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV50	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
LV100	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV18	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
LV11	9	9	9	0	1	1	1	0	1	0	1
LV24	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV33	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV99	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV88	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
LV94	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CL837	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV80	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
LV89	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
LV90	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1

* cada banda indicada pelo nome do primer seguida de um letra do alfabeto. A letra “a” corresponde a banda de maior tamanho e as demais letras em ordem alfabética, indicam as bandas de tamanhos decrescentes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)