

- to Citrus Variegated Chlorosis In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1996, Cape Town. **Proceedings...** p.280-282.
14. LIMA, O.J.; MIRANDA, V.S.; ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; PALMA, R.R.; PIZZOLITTO, A.C. Diagnose da Clorose Variegada dos Citros por microscopia óptica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.370-374, 1997.
15. LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JUNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da Clorose Variegada dos Citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.343, 1996. Suplemento.
16. MACHADO, M.A.; SILVÉRIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CRISTOFANI, M.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.515-531, 1992.
17. PALAZZO, D.A. Estimativas de perdas de laranja Natal por Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.211-226, 1993.
18. PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.489-502, 1992.
19. POMPEU JUNIOR, J.; LARANJEIRA, F.F.; HARAKAVA, R.; BERETTA, M.J.G. Primeira constatação de sintomas foliares de Clorose Variegada dos Citros em tangerinas e híbridos de tangerina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.318, 1994. Suplemento.
20. ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, n.2, p.263-284, 1998.
21. ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.517-518, 1996.
22. THOMPSON, S.K. **Sampling**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 343p.

Análises do DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos

Ana L. Alzate-Marin¹, Silvia Nietzsche¹, Marcia R. Costa¹, Krystiano A. de Souza¹,
Aloisio Sartorato², Everaldo G. de Barros^{1,3}, Maurilio A. Moreira^{1,4}

¹Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36.571-000 - Viçosa, MG, Brasil.

²EMBRAPA Arroz e Feijão, CP 179, CEP 75.375-000 - Santo Antônio de Goiás, GO.

³Departamento de Biologia Geral, UFV - Viçosa, MG, Brasil.

⁴Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV - Viçosa, MG, Brasil.

Enviar correspondência para Ana Lilia Alzate Marin, e-mail: aalzate@alunos.ufv.br.

Aceito para publicação em: 01/04/2001.

RESUMO

Alzate-Marin, A.L.; Nietzsche, S.; Costa, M.R.; Souza, K.A. de; Sartorato, A.; Barros, E.G. de; Moreira, M.A. Análises do DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos. **Summa Phytopathologica**, v.27, p. 197-203, 2001.

A antracnose e a mancha-angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causadas por *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, respectivamente, estão entre as doenças fúngicas de maior importância no Brasil. Trabalhos anteriores nos quais amostras de DNA de isolados dos patótipos 64, 65, 73 e 89 de *C. lindemuthianum*, procedentes de diversas regiões brasileiras, foram extraídas e amplificadas pela técnica de RAPD, demonstraram que os primers OPA09, OPAT18, OPAT09 e OPA007 amplificavam bandas de DNA patótipo-específicas. Os objetivos deste trabalho foram: (i) confirmar a presença de bandas patótipo-específicas em 41 isolados de 20 patótipos de *C. lindemuthianum*, (ii) amplificar amostras de DNA de isolados dos patótipos 63.23, 63.31, 63.39 e 63.55 de *P. griseola* com os primers OPA07, OPG05 e OPA11, para determinar sua possível especificidade com os patótipos 63.23

(OPA07e e OPA11) e 63.55 (OPG05), e, (iii) realizar estudos de variabilidade genética de isolados de patótipos de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. Os resultados não demonstraram a existência de bandas RAPD específicas nem para os patótipos de *C. lindemuthianum* e nem para os de *P. griseola*. É provável que nos trabalhos preliminares o número de patótipos e isolados testados de cada patótipo tenha sido demasiadamente pequeno. A variabilidade genética dos patógenos testados é extremamente grande. Os resultados obtidos permitiram identificar um extenso polimorfismo entre isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, o qual pode ser usado como auxílio em estudos de diversidade genética entre patótipos. Os dados de distância genética gerados pelas análises classificaram os patótipos em grupos distintos e podem auxiliar na identificação de similaridades genéticas entre os isolados.

ABSTRACT

Alzate-Marin, A.L.; Nietsche, S.; Costa, M.R.; Souza, K.A. de; Sartorato, A.; Barros, E.G. de; Moreira, M.A. DNA analyses of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaeoisariopsis griseola* aiming at pathotype identification. *Summa Phytopathologica*, v. 27, p. 197-203, 2001.

Anthrachnose and angular leaf spot caused by Colletotrichum lindemuthianum and Phaeoisariopsis griseola, respectively, are among the major common bean (Phaseolus vulgaris L.) diseases in Brazil. Preliminary work in which DNA samples extracted from isolates from C. lindemuthianum pathotypes 64, 65, 73 and 89 collected in different Brazilian regions were amplified by the RAPD technique demonstrated that primers OPAR09, OPAT18, OPAT09 and OPA007 showed pathotype specific DNA fragments. The objectives of this work were (i) to confirm the presence of pathotype specific bands in 41 isolates of 20 C. lindemuthianum pathotypes, (ii) to amplify DNA samples from P. griseola pathotypes 63.23, 63.31, 63.39 and 63.55 with primers OPA07, OPG05 and OPA11 to determine possible pathotype specificity,

and (iii) to study the genetic variability of isolates of C. lindemuthianum and P. griseola. Results did not demonstrate the existence of specific RAPD bands neither for C. lindemuthianum nor for P. griseola pathotypes. It is possible that in the preliminary works the number of pathotypes and isolates tested for each pathotype was too small. In addition, the genetic variability of the pathogens tested is extremely high. The results identified extensive polymorphisms among the isolates of C. lindemuthianum and P. griseola, which can be used as a tool for genetic diversity studies among pathotypes. The genetic distance data generated by the analyses classified the pathotypes in distinct groups and could be useful for the identification of genetic similarities among isolates.

Additional keywords: molecular markers, Phaseolus vulgaris, anthracnose, angular leaf spot.

Entre as doenças fúngicas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) consideradas de maior importância no Brasil, merecem destaque a antracnose e a mancha-angular cujos agentes causais são os fungos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. e *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, respectivamente (9, 11).

Devido à existência da grande variabilidade genética apresentada por *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* e às diferentes metodologias e nomenclaturas utilizadas para caracterizar os seus patótipos, foram estabelecidos conjuntos de 12 cultivares diferenciadoras e o uso de um sistema de numeração binária de nomenclatura para cada patógeno (6, 7). No entanto, nos dois conjuntos de diferenciadoras, alguns das cultivares carregam os mesmos genes (5, 14). Assim, eles dificilmente representam todos os genes do hospedeiro dificultando a classificação precisa dos patótipos.

MESQUITA et al. (3) utilizaram isolados dos patótipos 64, 65 e 73 e a técnica de RAPD com o objetivo de identificar bandas de DNA raça-específicas em *C. lindemuthianum*. Os primers OPAR09, OPAT18 e OPAT09 evidenciaram bandas de 900, 1500 e 780 pb características dos patótipos 64, 65 e 73, respectivamente. Em outro trabalho similar MESQUITA et al. (4), observaram que uma banda de 1300 pb gerada pelo primer OPA007 era monomórfica para todos os isolados da raça 89 de *C. lindemuthianum*. Em trabalhos prévios (não publicados) para *P. griseola*, utilizando bulks de isolados das raças 63.23, 63.31, 63.35 e 63.55 e sua amplificação com cem primers pela técnica de RAPD, foram observadas bandas de 1375 e 500 pb dos primers OPA07 e OPA11, respectivamente, como aparentemente ligadas ao patótipo 63.23, e uma banda de 700 pb do primer OPG05 como aparentemente ligada ao patótipo 63.55.

O presente trabalho apresentou os seguintes objetivos: (i) amplificar amostras do DNA de 41 isolados de 20 patótipos de *C. lindemuthianum* com os primers OPAR09, OPAT18, OPAT09 e OPA007 visando verificar a presença ou ausência das bandas de

900, 1500, 780 e 1300 pb que foram relatadas como específicas dos patótipos 64, 65, 73 e 89, (ii) amplificar amostras do DNA de 28 isolados dos patótipos 63.23, 63.31, 63.39 e 63.55 de *P. griseola* com os primers OPA07, OPA11 e OPG05 visando verificar sua especificidade com isolados dos patótipos 63.23 (OPA07 e OPA11) e 63.55 (OPG05) e, (iii) realizar estudos de variabilidade genética de isolados de patótipos de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

De um total de 41 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* analisados, trinta e sete isolados foram obtidos junto à micoteca da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia (GO) e quatro isolados foram obtidos da micoteca do programa de melhoramento do feijoeiro comum do BIOAGRO/UFV (Quadro 1). De um total de 28 isolados de *Phaeoisariopsis griseola* analisados, vinte e cinco isolados foram obtidos da micoteca do programa de melhoramento do feijoeiro comum do BIOAGRO/UFV e três isolados foram cedidos pela micoteca da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia (GO) (Quadro 2). Os isolados de *C. lindemuthianum* foram mantidos em placas de petri contendo meio BDA e incubados a 22°C. Os isolados de *P. griseola* foram mantidos em placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA) incubadas a 24°C.

A obtenção de massa micelial dos isolados dos dois patógenos (Quadros 1 e 2) foi realizada utilizando-se o meio líquido de Kado (1, 8) em agitação a 108 rpm, a 24°C, por 8 dias. A massa micelial obtida foi centrifugada (EXCELSA BABY II, modelo 206-R FANEM) a 4500 rpm em presença de EDTA 50 mM, pH 8,0 por dez minutos. Posteriormente, foi filtrada, lavada com água destilada, seca e mantida a -80°C.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se a metodologia de ROADER & BRODA (10). As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD (13). Os isolados de *C. lindemuthianum* relacionados no Quadro 1 foram amplificados com os primers (OPERON = OP) OPAR09, OPAT18, OPAT09 e OPA007. Os isolados de *P. griseola* relacionados no Quadro 2 foram amplificados com os primers OPA07, OPG05 e OPA11.

Quadro 1- Patótipos, cultivares de origem e origem geográfica dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Número do isolado	Patótipo	Identificação do Isolado (Embrapa, Arroz e Feijão)	Cultivar de origem	Origem geográfica
1	23	33		
2	23	79	Mul. Simétrico 810515	Goiás
3	55	264	Iguaçu	Paraná
4	64	458	Capixaba Precoce	Espírito Santo
5	64	459	Capixaba Precoce	Espírito Santo
6	64	464	Capixaba Precoce	Espírito Santo
7	64	466	Capixaba Precoce	Espírito Santo
8	64	468	Capixaba Precoce	Espírito Santo
9	65	247	Black Turtle soup	Goiás
10	65	315	-	Paraíba
11	65	400	Bagajó	Bahia
12	65	579	FT 120	Mato Grosso do Sul
13	65	451	RH 5-08	Goiás
14	67	490	Capixaba Precoce	Espírito Santo
15	69	5A1*	CI-107 grão pqno	Minas Gerais
16	72	474	Capixaba precoce	Espírito Santo
17	73	420	RH 5-27	Goiás
18	73	452	RH 5-08	Goiás
19	73	470	Cap. Precoce	Espírito Santo
20	73	477	Cap. Precoce	Espírito Santo
21	73	487	Cap. Precoce	Espírito Santo
22	73	495	Cap. Precoce	Espírito Santo
23	73	497	Cap. Precoce	Espírito Santo
24	81	401	CNF 4181	Pernambuco
25	81	538	Carioca	Bahia
26	81	5416*	-	São Paulo
27	81	9253*	-	São Paulo
28	83	501	LO 202	Goiás
29	87	471	Capixaba precoce	Espírito Santo
30	89	1A2*	Carioca	Minas Gerais
31	89	265	Iguaçu	Paraná
32	89	397	Carioca 80	Mato Grosso do Sul
33	89	540	Carioca	Minas Gerais
34	95	390	Iraí	Rio Grande do Sul
35	97	478	Carioca	Goiás
36	102	389	Iraí	Rio Grande do Sul
37	117	484	Feijão-vagem	Goiás
38	339	507	FT-120	Mato Grosso do Sul
39	343	506	FT-120	Mato Grosso do Sul
40	453	457	Cepa 85/91	Rio Grande do Sul
41	585 ?	521	Roxinho/roxo	Espírito Santo

(-) Cultivar desconhecida. (*) Isolados classificados no BIOAGRO/UFV. (?) Dúvida na classificação.

Para as análises de variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* foram usados os *primers* OPAR09, OPAT18, OPAT09 e OPAO07. Para as análises de *P. griseola* foram usados os *primers* OPA01, OPA11, OPA07, OPB08, OPC08 e OPG05. As análises de agrupamento e dendrogramas foram realizados com base em distâncias genéticas calculadas pelo método Euclidiano para dados binários, com auxílio do programa STATISTCS (StatSoft, Inc., 1995).

Como resultado das amplificações com o *primer* OPAR09, foi observado que a banda de 900 pb está presente nos isolados do patótipo 64 (2) (Fig. 1a), mas também se apresenta nos patótipos 23 isolado 33 (23-33), 23-79, 55-264, 65-247, 65-315, 65-400, 65-579, 69-5A1, 81-538, 83-501, 87-471, 89-265, 89-540, 95-390, 102-389, 117-484 e 339-507. Nas amplificações com o *primer* OPAT18 cuja banda de 1500 pb marcava o patótipo 65 (2) (Fig. 1a), foi verificado que esta banda também está presente na maioria dos isolados

amplificados com exceção de alguns isolados dos patótipos 81 e 89. Como resultado das amplificações do DNA dos isolados de *C. lindemuthianum* com o *primer* OPAT09, observou-se que a banda de 780 pb apareceu nos isolados do patótipo 73, 65 (isolado 451), 72 (474) e 585 (521) (2), mas também foi observada no DNA dos isolados 490 (67) e 389 (102) (Fig. 1a). Com relação a classificação do isolado 521 (patótipo 585) foi obtida a informação de que tal isolado havia perdido a capacidade de infectar a diferenciadora TU, sugerindo que no presente, outra podia ser sua identificação (informação pessoal pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão (GO)). De acordo a resultados de MESQUITA (2) o isolado 521 pertence ao patótipo 73 de *C. lindemuthianum*. Quando os isolados foram analisados com o *primer* OPAO07 cuja banda de 1300 pb marcava o patótipo 89 (4), foi verificado que esta banda também está presente nos isolados dos patótipos 23, 64, 65 (247, 315, 400), 69, 81, 83, 87, 95, 97, 102 e 339 (Fig. 1a).

Estes resultados comprovam a não ligação exclusiva entre os marcadores gerados pelo *primers* OPAR09, OPAT09, OPAT18 e OPAR07 e os patótipos 64, 73, 65 e 89, respectivamente. No entanto, estes *primers* geraram outras bandas presentes ou ausentes tanto nos isolados do patótipo 73, quanto em alguns isolados dos patótipos 65, 67, 72, 117, 343, 453 e 585. É importante mencionar que nos resultados obtidos por MESQUITA (2) 20 dos 44 *primers* utilizados na abertura dos três *bulks*, evidenciaram

pelo menos uma banda de DNA, cada uma capaz de distinguir o patótipo 73 dos demais. Outros estudos deverão ser realizados para encontrar a relação entre a presença destas bandas comuns a estes patótipos aparentemente diferentes quando na sua classificação são utilizados cultivares diferenciadoras. Propõe-se a hipótese de que a presença e ausência destas bandas esteja mostrando pelo menos dois grupos de genes de virulência comuns.

Quadro 2 - Patótipo, número do isolado e local de origem dos isolados de *Phaeoisariopsis griseola* coletados nos Estados de Minas Gerais, Paraíba e Goiás.

Número do isolado	Patótipo	Identificação do isolado (BIOAGRO/CNPAF)	Cultivar de origem	Origem geográfica
1	63.23	94-1	-	Coimbra - MG
2	63.23	58-1	-	Coimbra - MG
3	63.23	158-1	-	-
4	63.23	47-1	-	Coimbra - MG
5	63.23	83-1	-	Coimbra - MG
6	63.23	104-1	-	Coimbra - MG
7	63.23	57-4	-	Coimbra - MG
8	63.23	144-1	-	Coimbra - MG
9	63.23	158-1	-	-
10	63.39	21-3	-	Lavras - MG
11	63.39	12-3	-	Lavras - MG
12	63.39	10-2	-	Lavras - MG
13	63.39	7-3	-	Lavras - MG
14	63.39	113-1	-	Pocrane - MG
15	63.31	113-2	-	Pocrane - MG
16	63.31	110-4	-	Pocrane - MG
17	63.31	112-1	-	Pocrane - MG
18	63.31	122-5*	carioca	Camp. Grande - PB
19	63.31	110-3	-	Pocrane - MG
20	63.31	291-6	-	Unai
21	63.31	110-2	-	Pocrane - MG
22	63.55	41-1	-	Lavras - MG
23	63-55	568-1*	carioca	Rio Verde - GO
24	63-55	36-2	-	Patos de Minas - MG
25	63-55	594-2*	carioca	Anãpolis - GO
26	63-55	184-6	-	Paracatu
27	63-55	29-3	-	Lambari
28	63.55	58-1	-	Coimbra - MG

(-) Cultivar desconhecida. (*) Isolados classificados na Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia (GO).

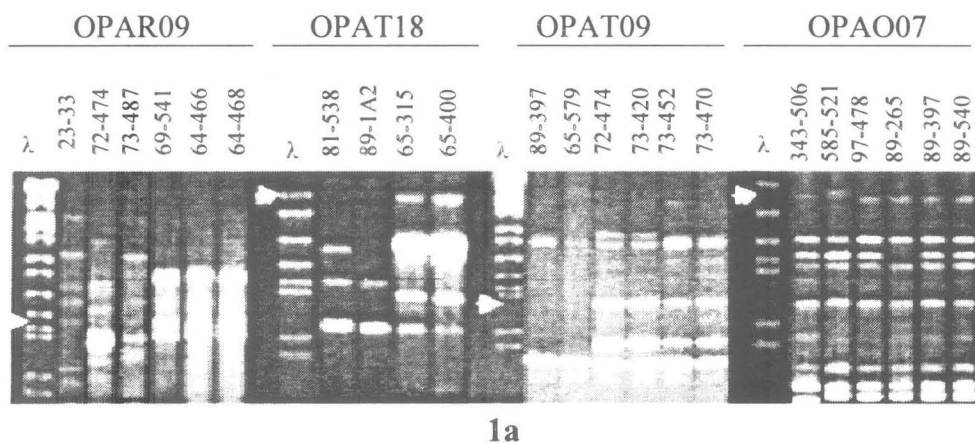
De maneira similar aos resultados observados nas análises com *C. lindemuthianum*, nenhum dos *primers* OPA07 (banda de 1375 pb), OPA11 (banda de 500 pb) e OPG05 (banda de 700 pb) apresentou banda exclusiva a um determinado patótipo de *P. griseola*. No entanto, nas análises realizadas com o *primer* OPA07 foi observado que a banda forte de 1375 pb que se apresenta nos isolados do patótipo 63.23 se apresenta mais fraca nos outros isolados (Fig. 1b). Quando o DNA de cada patótipo das raças 63.23 e 63.55 foi amplificado com os *primers* OPA11 e OPG05, foi observado que as bandas de 500 e 700 pb que apresentaram polimorfismo nos *bulks*, estavam presentes em apenas alguns isolados dos mesmos patótipos (Fig. 1b).

A análise de variabilidade genética dos 41 isolados de *C. lindemuthianum* foi realizada a partir das 19 bandas polimórficas resultantes das amplificações com os *primers* OPAR09, OPAT18, OPAT09 e OPA007. Como resultado, foram observados dois agrupamentos. O primeiro agrupamento está formado por um

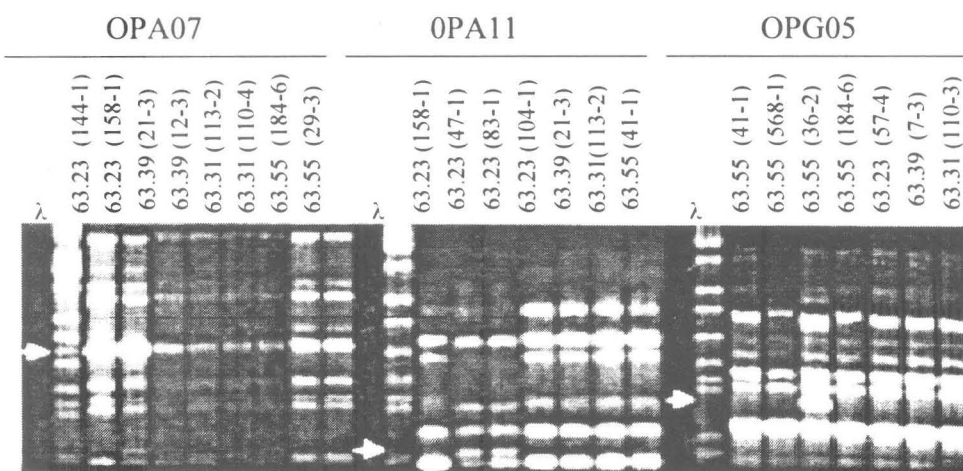
isolado dos patótipos 55, 69, 81, 83, 87, 89, 95, 102, 117 e 339, dois isolados do patótipo 23 e 4 isolados dos patótipos 64 e 65. O segundo agrupamento está formado por um isolado dos patótipos 64, 65, 67, 72, 97, 343, 453 e 585, 3 isolados dos patótipos 81 e 89 e 7 isolados do patótipo 73 (Figura 2a).

No primeiro agrupamento, quatro isolados do patótipo 64 mostraram distância genética zero. No segundo agrupamento, 6 isolados do patótipo 73 também apresentaram distância genética zero. De acordo com estes dados pode-se deduzir que estes isolados previamente classificados por virulência correspondem a réplicas dos isolados dos patótipos 64 e 73, respectivamente.

As amplificações dos 28 isolados dos 4 patótipos de *P. griseola* com os *primers* OPA01, OPA11, OPA07, OPB08 e OPG05 geraram 26 bandas polimórficas. As análises da variabilidade genética dos 28 isolados de *P. griseola* definiram dois agrupamentos, um sendo formado por quatro isolados do patótipo 63.23 e o outro formado por 5 isolados dos patótipos



1a



1b

Figuras 1a e 1b – 1a). Análise eletroforética dos produtos de amplificação com os *primers* OPAR09, OPAT18, OPAT09 e OPAO07 cujas bandas (assinaladas com setas) de 900, 1500, 780 e 1300 pb estariam supostamente ligadas a isolados dos patótipos 64, 65, 73 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum*, respectivamente. **1b).** Análise eletroforética dos produtos de amplificação com os *primers* OPA07, OPA11 e OPG05 cujas bandas (assinaladas com setas) de 1375, 500 e 700 pb estariam supostamente ligadas a isolados dos patótipos 63.23 (OPA07, OPA11) e 63.55 (OPG05) de *Phaeoisariopsis griseola*. Além de isolados das raças específicas, as duas figuras também mostram a amplificação com cada *primer* do DNA de outros isolados dos dois patótipos. Em cada figura a coluna I corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de tamanho dos fragmentos de DNA).

63.23 e 63.39 e 7 isolados dos patótipos 63.31 e 63.55 (Quadro 2, Figura 2b). O par de patótipo/isolado 63.55/29-3 vs. 63.55/58-1 mostrou distância genética zero indicando que estes isolados podem ser réplicas de um só isolado do patótipo 63.55.

Como principal conclusão pode-se ressaltar que a análise molecular de poucos isolados pertencentes a poucos patótipos podem evidenciar resultados diferentes quando comparados a análises resultantes de um maior número de isolados/patótipos. Também resultados com base na análise molecular de vários patótipos, representados por um único indivíduo, podem sofrer mudanças quando maior número de isolados do mesmo patótipo são analisados.

De acordo com os dados observados, embora a técnica do uso de *bulks* de DNA não tenha sido eficiente na identificação de marcadores moleculares ligados a genes de virulência dos patótipos, o método foi na identificação de regiões que

apresentam polimorfismos entre isolados e grupos de patótipos. É possível que com o uso dos *Bulks* tenham-se atingido regiões polimórficas que podem ou não estar ligadas à virulência, mas que também possuem similaridades entre diferentes patótipos (no caso das bandas geradas nas amplificações do patótipo 73). De acordo com os resultados obtidos, a técnica de *bulks* de DNA foi eficiente para identificar polimorfismos entre isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, os quais podem ser usados como uma ferramenta na análise de diversidade genética entre patótipos.

Com relação às análises de diversidade genética dos patótipos, seus resultados, além de mostrar os agrupamentos e dados de distância entre os diferentes isolados, podem auxiliar na identificação de isolados idênticos (distância genética igual a zero) entre isolados classificados como do mesmo patótipo. Neste último caso se recomenda o uso de um número maior de *primers* polimórficos.

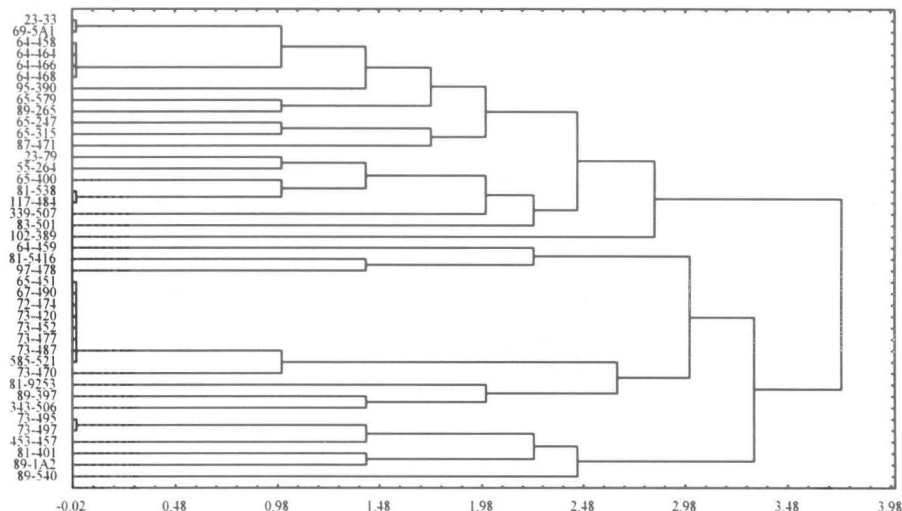


Figura 2a

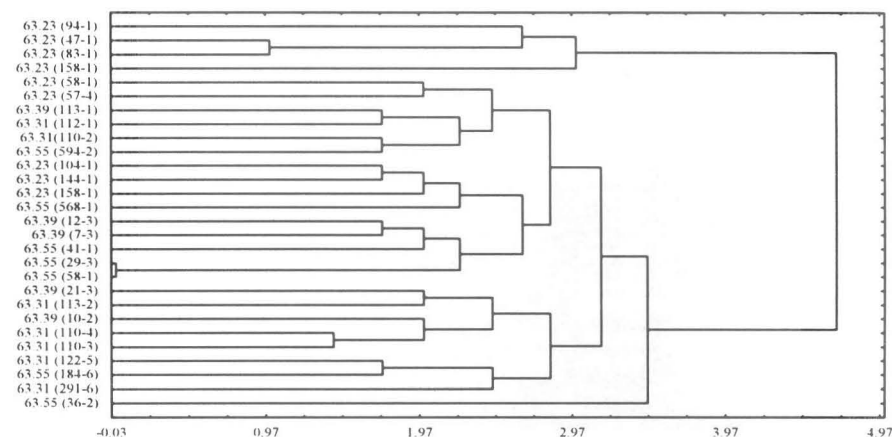


Figura 2b

Figuras 2a e 2b - Dendrogramas obtidos da análise genética de isolados de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* (2a) e *Phaeoisariopsis griseola* (2b).

AGRADECIMENTOS

Ana Lilia Alzate-Marin foi financiada pelo IICA. Este trabalho teve o suporte financeiro da Embrapa Arroz e Feijão. Silvia Nietzsche foi financiada por uma bolsa de doutorado do CNPq e, Maria Regina Costa e Krystiano A. de Souza foram financiados por bolsas de IC da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
02. MESQUITA, A. Análise Molecular de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* por marcadores RAPD. 1997. 51f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, MG, Viçosa, 1997.
03. MESQUITA, A.; PAULA JR., T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Identification of Races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Disease*, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1084-1087, 1998a.
04. MESQUITA, A.; FALEIRO, F.; PAULA JR., T.J.; RAGAGNIN, V.; MOREIRA, M.; BARROS, E.G. Use of molecular markers to differentiate *Colletotrichum lindemuthianum* races 89 and 69. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, n.1, p.58-61, 1998b.
05. NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO G. A.; ROCHA, R. C.; PAULA JR., T. J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 148, n. 2, p. 117-122, 2000.
06. PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del primer taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.) *La antracnosis del frijol común, Phaseolus vulgaris, en América Latina*. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1992. p. 240-250. (Documento de trabajo, 113).
07. PASTOR-CORRALES, M.A.; JARA, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. *Fitopatologia Colombiana*, Palmira, Colômbia, v. 19, n. 1, p.15-22,

- 1995.
08. PAULA Jr., T.J.; FREITAS, M.A.S.; ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; ALEXANDRE, A.B.A.; ZAMBOLIM, L. Produção de inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum* visando extração de DNA para caracterização de raças. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 20, Suplemento, p.314, 1995.
09. RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Antracnose. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 17-39. (Documentos, 50).
10. ROAEDER, V.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p.17-20, 1987.
11. SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Mancha angular. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 41-68. (Documentos, 50).
12. STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows (Computer program manual)**. Tulsa, OK, 1995.
13. WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
14. YOUNG, R.; MELOTTO, M.; NODARI, R. O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G2333". **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 96, n. 1, p. 87-94, 1998.

Variabilidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* da Região Agreste de Pernambuco

Domingos E.G.T. Andrade^{1*}, Sami J. Michereff^{2*}, Maria Menezes^{2*}

¹Estação Experimental de Vitória de Santo Antão, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, CEP 55.600-000 - Vitória de Santo Antão - PE. e-mail: degta@uol.com.br.

²Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52.171-900 - Recife, PE. e-mail: michereff@uol.com.br

*Bolsista do CNPq.

Aceito para publicação em: 20/03/2001.

RESUMO

Andrade, D.E.G.T.; Michereff, S.J.; Menezes, M. Variabilidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* da Região Agreste de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 203-207, 2001.

A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, constitui uma importante doença do tomateiro na Região Agreste do Estado de Pernambuco. A variabilidade de 36 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, oriundos dessa região, foi estudada em relação a raças e componentes epidemiológicos. Na inoculação, plantas de tomateiro tiveram suas raízes cortadas e imersas por 5 minutos na suspensão de conídios do patógeno, ajustada para 10⁶ conídios/mL. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para vasos e adicionou-se 10 mL da suspensão de conídios ao solo, em torno da base da planta. No estudo de raças, as cultivares de tomateiro 'Ponderosa' (suscetível às raças 1 e 2), 'IPA-5' (resistente à raça 1 e suscetível a raça 2), 'Floradade' (resistente às raças 1 e 2) e 'BHRS-2,3' (resistente às raças 1, 2 e 3) constituíram a série de genótipos diferenciadora. No estudo

dos componentes epidemiológicos foi utilizada a cv. Santa Clara I-5.300. Apenas um isolado pertenceu a raça 1, sendo todos os restantes pertencentes a raça 2. Em relação aos componentes epidemiológicos, quando considerada a incidência da murcha-de-fusário aos 21 dias após a inoculação, foi possível a distinção de dois grupos de similaridade entre os isolados, aumentando para três grupos quando consideradas a taxa de progresso da doença e a área abaixo da curva de progresso da doença. Considerando conjuntamente os componentes epidemiológicos, foi possível a separação de isolados em cinco grupos de similaridade. A baixa variabilidade encontrada entre os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* em relação a raças, sugere a possibilidade de utilizar os componentes epidemiológicos para a seleção de cultivares de tomateiro resistentes a este patógeno.

Palavras-chave adicionais: Murcha-de-fusário, tomateiro, componentes epidemiológicos.