



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Diversidade genética e patogênica em populações de
Sclerotium rolfii infectando feijão-caupi e feijão-
comum no Agreste de Pernambuco**

João Victor Jansen de Queiroz

**Recife – PE
2014**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA EM
POPULAÇÕES DE *SCLEROTIUM ROLFSII* INFECTANDO
FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-COMUM NO AGRESTE DE
PERNAMBUCO**

JOÃO VICTOR JANSEN DE QUEIROZ

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

JOÃO VICTOR JANSEN DE QUEIROZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA EM
POPULAÇÕES DE *SCLEROTIUM ROLFSII* INFECTANDO
FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-COMUM NO AGRESTE DE
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Orientador

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Coorientador

Dr. Juan Antonio Navas-Cortés (IAS/CSIC) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA EM
POPULAÇÕES DE *SCLEROTIUM ROLFSII* INFECTANDO
FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-COMUM NO AGRESTE DE
PERNAMBUCO**

JOÃO VICTOR JANSEN DE QUEIROZ

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 14/02/2014

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade (IPA)

Profa. Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

Às mulheres da minha vida: minha esposa Railma
e minha filha Laura.

AGRADECIMENTOS

Ao **Deus** criador e redentor pelo dom da vida e amor inaudito;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro que possibilitou a conclusão desse projeto;

Às minhas amadas **Railma Vilanova** e **Laura Queiroz**, por tornarem os meus dias cheios de alegria e esperança;

Aos meus pais, **João Queiroz** e **Alice Jansen** (*in memorian*), pelo apoio e amor incondicionais;

Aos meus sogros, **José Maria Rocha** e **Raimunda Vilanova**, pela confiança e dedicação;

A minha família, em especial, às minhas irmãs, **Adriana** (*in memorian*), **Ana Paula** e **Auri**, pelo carinho e incentivo a todo o momento;

Ao Dr. **Sami Jorge Michereff**, pela orientação e amizade valiosa;

Ao meu coorientador, Dr. **Marcos Câmara**, pelo entusiasmo e bom humor;

À Dr^a **Antônia Alice Costa Rodrigues**, por me fazer acreditar que esse sonho era possível;

À coordenadora, Dr^a **Sônia Oliveira** e a todo o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos preciosos;

Aos discentes do curso de Fitopatologia da UFRPE pelas experiências compartilhadas, em particular às minhas amigas **Alice Gonçalves**, **Carmem Virgínia**, **Kamila Câmara** e **Mayumi Inokuti (Japa)** por fazerem parte da minha vida profissional e pessoal de maneira tão especial;

À família 2010-2014 do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, em especial a **Ana Paula Oliveira**, **Cíntia Conforto**, **Hugo Padilha**, **José Garcete (Pablito)**, **Leandro Velez**, **Leonardo**, **Litervaldo Machado**, **Marcondes Araújo**, **Moara Bandeira**, **Rômulo**, **Soraia**, **Susan Tsuji** e **Yana**, pela cumplicidade e amizade;

Aos parceiros do Laboratório de Micologia, **Marília Marques**, **Mariote Netto**, **Nelson Lima**, **Willie Anderson** e **Waléria**, pela troca de conhecimentos e generosidade;

A todos os funcionários da UFRPE, em especial ao Sr. **Luiz** que muito contribuiu para a realização dos experimentos, **Romildo** e **Darcy** pela eficiência e dedicação;

A todos aqueles que contribuíram para que a execução deste trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	11
Referências Bibliográficas	30
 CAPÍTULO II – Grupos de compatibilidade micelial e diversidade patogênica em populações de <i>Sclerotium rolfsii</i> de cultivos de feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco	41
Resumo	43
Abstract	43
Introdução	44
Materiais e Métodos	46
Resultados	50
Discussão	53
Referências	56
 CAPÍTULO III – Diversidade molecular de populações de <i>Sclerotium rolfsii</i> de feijão-caupi e feijão-comum com base em duas sequências gênicas	70
Sumário	72
Summary	72
Introdução	73
Materiais e Métodos	75
Resultados	77
Discussão	78
Referências	81
 CONCLUSÕES GERAIS	92
 NORMAS DOS PERIÓDICOS	94

RESUMO GERAL

A estrutura populacional de *Sclerotium rolfsii* de feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste do Estado de Pernambuco (Brasil), foi determinada pelas análises de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) e virulência a seis espécies de plantas economicamente importantes. Dezesete GCMs (I-XVII) foram identificados entre 169 isolados de *S. rolfsii*. O GCM II foi o mais prevalente e abundante, representando 33,1% dos isolados e sendo detectado em 13 das 24 áreas amostradas. Nove GCMs (VI, VII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV e XVII) foram identificados em apenas uma área. Nenhuma diferença foi constatada entre as hospedeiras de origem em relação à diversidade de GCMs. A maior riqueza de GCMs foi encontrada no município de São João, enquanto Lajedo apresentou reduzida riqueza, baixa equidade e alta dominância de GCMs. Quatro das seis espécies de plantas (feijão-caupi, feijão-comum, girassol e soja) testadas foram infectadas por todos os isolados dos 17 GCMs. Em algodão, a virulência dos GCMs foi bem inferior à observada nas outras espécies vegetais. Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os GCMs quanto aos níveis de virulência a todas as espécies de plantas. Com base na virulência, a análise de agrupamento permitiu a seleção de seis agrupamentos de GCMs e cinco agrupamentos de espécies de plantas. Visando determinar a diversidade molecular, sequências parciais dos genes fator de alongação 1 α (EF1- α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) foram obtidas de 65 isolados, representando todos os GCMs detectados. Com base no polimorfismo dos nucleotídeos, o gene EF1- α apresentou maior variabilidade entre os GCMs quando comparado com o gene RPB2. Com a utilização do gene EF1- α foi possível a caracterização de 15 dos 17 GCMs, enquanto o gene RPB2 propiciou a separação de 10 GCMs. Contudo, a análise combinada das sequências dos genes EF1- α e RPB2 possibilitou a separação de todos os 17 GCMs em agrupamentos distintos. Os resultados dos estudos indicaram uma ampla diversidade genética nas populações de *S. rolfsii* em áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco, bem como demonstraram que a variação nas sequências dos genes EF1- α e RPB2 pode ser explorada como ferramenta para a determinação dos GCMs.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, GCM, Virulência, RPB2, EF1- α .

GENERAL ABSTRACT

The population structure of *Sclerotium rolfsii* from cowpea and common bean crops in region Agreste of Pernambuco State (Brazil) was determined by analyses of mycelial compatibility groups (MCGs) and virulence to six economically important plant species. Seventeen MCGs (I-XVII) were identified among 169 *S. rolfsii* isolates. MCG II was the most prevalent and abundant, representing 33.1% of the isolates and being detected in 13 of 24 sampled areas. Nine MCGs (VI, VII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV e XVII) were identified in only one area. No differences between hosts of origin were found in relation to the diversity of MCGs. The highest richness of MCGs was found in the municipality of São João, while Lajedo showed reduced richness, low equity and high dominance of MCGs. Four of the six species tested plants (cowpea, common bean, sunflower and soybean) were infected by all isolates of the 17 MCGs. In cotton, the virulence of MCGs was well below that observed in other plant species. There was a significant difference ($P \leq 0.05$) among MCGs for levels of virulence to all plant species. Based on virulence, cluster analyses allowed selection into six MCG groupings and five plant species groupings. To determine the molecular diversity, partial sequences of elongation factor 1 α (EF1- α) and the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) gene were obtained from 65 isolates representing all detected MCGs. Based on nucleotide polymorphism, the EF1- α gene showed greater variability among MCGs compared with the RPB2 gene. Using the EF1- α gene has been possible to characterize 15 of 17 MCGs, while RPB2 gene allowed the separation of 10 MCGs. However, the combined sequences of EF1- α and RPB2 gene analysis allowed the separation of all 17 MCGs in distinct clusters. The results of the studies showed a wide genetic diversity in populations of *S. rolfsii* in cultivated areas with cowpea and common bean in the Agreste region of Pernambuco, and showed that the variation in the sequences of EF1- α and RPB2 genes can be exploited as a tool for determining the MCGs.

Key-words: *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, MCG, Virulence, RPB2, EF1- α .

Capítulo I



Introdução Geral

DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA EM POPULAÇÕES DE *SCLEROTIUM ROLFSII* INFECTANDO FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-COMUM NO AGRESTE DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Botânica do feijão-caupi e do feijão-comum

A família Fabaceae é uma das mais importantes entre as dicotiledôneas. É mundialmente distribuída, sendo mais abundante nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família se divide em três subfamílias, Cesalpinioideae, Mimosoideae e Papilonoideae, sendo que a última abriga os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* (BROUGHTON et al., 2003).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada principalmente nas regiões tropicais. A espécie tem recebido diferentes denominações populares nas regiões produtoras brasileiras, sendo conhecida como feijão-macassar, feijão-de-corda, caupi, feijão de praia, feijão miúdo, feijão frade, entre outras (FREIRE FILHO, 2011; FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983).

A planta de feijão-caupi apresenta flores completas, sendo os órgãos masculinos e femininos bem protegidos pelas pétalas, em número de cinco, de coloração branca, amarela ou violeta. Apresenta 10 estames, sendo nove concrecidos, formando um tubo estaminal, e um livre. O estilete termina com um estigma recurvado, úmido e coberto de pelos com a finalidade de aderir melhor os grãos de pólen. O ovário é estreito e alongado, com óvulos distribuídos em linha. A ântese ocorre normalmente nas primeiras horas da manhã, condicionada à ocorrência da fecundação, que se dá basicamente por autopolinização, podendo ocorrer, em menores taxas, a polinização cruzada, por intermédio de insetos. O sistema radicular é pivotante, alcançando até 0,80 m de profundidade, tendo, como as demais leguminosas, a capacidade de fixação do nitrogênio do ar em associação com bactérias do gênero *Rhizobium* (ARAÚJO, 1988; SOARES et al., 2007).

O gênero *Phaseolus* é composto por 55 espécies botânicas, todas de origem americanas, das quais *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman são cultiváveis (DEBOUCK, 1991). O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta anual herbácea e autógama, cuja taxa de polinização cruzada pode variar de 1% até mais de 50%, de acordo com o ambiente de cultivo e as épocas de semeadura (BURLE et al., 2010).

A planta de feijão-comum pode apresentar forma de crescimento determinado ou indeterminado. Suas folhas são simples e opostas nas folhas primárias e compostas, constituídas de três folíolos, com disposição alternada, nas folhas definitivas. Suas flores estão agrupadas em ráculo axilar (quando em hábito de crescimento indeterminado) e ráculo terminal (quando em hábito determinado), apresentando-se na forma de um eixo composto de pedúnculo e ráculo, brácteas e botões florais. A coloração das flores pode ser branca, rósea ou violeta uniformemente para toda a corola ou bicolor. O fruto é um legume, deiscente, constituído de duas valvas unidas por duas suturas, uma dorsal e outra ventral, e abriga sementes com alto teor de carboidratos e proteínas, constituídas, de um tegumento, hilo, micropila e rafe (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

O feijão-comum é uma espécie de grande interesse agronômico mundial e elevada importância socioeconômica no Brasil, pois além de ser um dos alimentos mais consumidos na dieta humana e uma fonte barata de proteínas, ferro, cálcio, zinco, vitaminas do complexo B, carboidratos e fibras, cumpre a função social de gerar renda para classes menos favorecidas (MESQUITA et al., 2007; ANGIOI et al., 2010).

2. Importância do feijão-caupi e do feijão-comum

O feijão-caupi é uma cultura de grande importância econômica devido à sua versatilidade e valor nutricional (SINGH et al., 2002). A temperatura mais adequada para o desenvolvimento do feijão-caupi encontra-se na faixa entre 21-30°C (OLIVEIRA; CARVALHO, 1988). No que se refere aos solos, pode ser cultivado em quase todos os tipos, incluindo aqueles com baixa fertilidade, desde que sejam feitas as devidas correções de acidez e/ou fertilidade (MELO; CARDOSO; SALVIANO, 2005). Esta leguminosa pode ser consumida na forma de vagem verde e grão verde ou seco, além de outras formas de preparo. Para o consumo como vagem verde, a colheita é feita quando as vagens estão bem desenvolvidas, mas ainda com baixo teor de fibras. Para o consumo na forma de grãos verdes, as vagens são colhidas no ponto de maturação de campo (VIEIRA; RAVA, 2000). Além da utilização na alimentação humana, o feijão-caupi pode também, ser utilizado na alimentação animal, como forragem verde, feno, ensilagem e farinha, e ainda para adubação verde, na recuperação de solos degradados e cobertura do solo (TEIXEIRA; MAY; SANTANA, 1988).

O feijão-caupi é uma cultura manejada em praticamente todos os continentes, sendo a Nigéria o principal produtor mundial, com 2,9 milhões de toneladas, seguida de Níger, com

1,5 milhões de toneladas e Brasil, com 1,3 milhões de toneladas de grãos produzidos (PERRINO et al., 1993; SINGH et al., 2002). A região Nordeste brasileira apresenta as maiores áreas plantadas de feijão-caupi, com 1,2 milhões de hectares cultivados, onde a cultura desempenha importante papel sócioeconômico como principal fonte de proteína vegetal e na geração de emprego, renda e fixação do homem no campo. Além disso, a concepção de cultivares com características agronômicas favoráveis à mecanização da cultura têm permitido o avanço desta na região Centro-Oeste. No Brasil, o feijão-caupi contribui com 35,6% da área plantada e 15% da produção de feijão total (feijão-caupi + feijão-comum). Entretanto, os órgãos oficiais que coletam e divulgam dados de produção agrícola brasileira não fazem separação entre a produção do feijão-caupi e feijão-comum, o que reduz a visibilidade da cultura no cenário mundial e dificulta a exportação (FREIRE FILHO, 2011; SILVA, 2011).

O Brasil destaca-se como grande produtor mundial e consumidor de feijão-comum, produzindo em média 1.049 kg/ha em uma área total de 3,16 milhões de hectares nos últimos dois anos, resultando em 3,3 milhões de toneladas/ano (CONAB, 2014). A produtividade média é considerada baixa, principalmente pelo uso de sementes não-certificadas, por problemas climáticos e pelo manejo inadequado da cultura em relação às doenças e pragas (SANTOS et al., 2009). O feijão-comum é cultivado na região Nordeste, em maior escala nos estados da Bahia e Pernambuco (CONAB, 2014).

O Agreste Meridional do estado de Pernambuco, juntamente com o Sertão do Araripe, respondem por 98,7% das 68.742 toneladas da produção de feijão do estado, sendo o Agreste o maior produtor, com 59,7% do total. Dentre os municípios do Agreste, Angelim, Calçado, Canhotinho, Ibirajuba, Jucati, Jupi, Jurema, Garanhuns, Lajedo, São Bento do Una e São João se destacam com a produção de 24,1% do total, que representa 16.565 toneladas de grãos. Nessa região, são cultivados cerca de 12.000 ha de feijão-caupi e 15.000 ha de feijão-comum, sendo a maioria da produção oriunda de unidades de agricultura familiar. O município de São João apresenta a maior área plantada (12.000 ha), seguido de Lajedo (5.000 ha). O feijão-caupi é cultivado predominantemente na estação seca (setembro-dezembro), em sucessão ao cultivo de feijão-comum, cultivado na estação úmida (abril-julho) (PLANO TERRITORIAL DE REDE PRODUTIVA, 2012). No Agreste Meridional de Pernambuco, a produtividade média do feijão-caupi é de 320 kg/ha, enquanto do feijão-comum de 460 kg/ha. Apesar do potencial produtivo da região, as produtividades dessas leguminosas são muito baixas quando comparadas às obtidas em outras regiões brasileiras, como na Centro-Oeste, em que a produtividade média do feijão-caupi é de 1.233 kg/ha (SILVA, 2011).

3. Doenças do feijão-caupi e do feijão-comum

Além dos fatores abióticos, existe uma variedade de estresses bióticos que influenciam negativamente sobre o rendimento do feijão-caupi e do feijão-comum na região Nordeste brasileira, tais como a ocorrência de doenças (CARVALHO et al., 2005). Dentre as doenças mais associadas à redução da produtividade do feijão-caupi no Nordeste brasileiro destacam-se a murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kühn), murcha-de-fusário [*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Snyder & Hansen], podridão-cinzenta do caule [*Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.], cercosporioses [(*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton e *Cercospora canescens* Ellis & Martin)], ferrugem [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger], antracnose [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Biosi & Cavara], mancha-café [*Colletotrichum truncatum* (Schewin.) Andrus & Moore], crestamento bacteriano [*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Vauterim et al.], mosaico severo (*Cowpea severe mosaic comovirus*), o mosaico comum (*Cowpea mosaic comovirus*), mosaico dourado (*Cowpea golden mosaic bigeminivirus*), mosaicos de potyvirus (*Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus* e *Blackeye cowpea mosaic potyvirus*) e meloidoginoses [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood] (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; COELHO, 2001; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005).

O feijão-comum é susceptível a muitas doenças, dentre as quais se destacam no Nordeste brasileiro a murcha-de-esclerócio, rizoctoniose, murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder), podridão-cinzenta do caule, mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), antracnose, mancha angular [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris)], ferrugem, crestamento bacteriano [*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterim et al.], mosaico comum (*Bean common mosaic potyvirus*), mosaico dourado (*Bean golden mosaic begomovirus*) e meloidoginoses (BARROS, 2012).

4. Murcha-de-esclerócio

A murcha-de-esclerócio é uma das doenças mais freqüentes em nível mundial nos cultivos de feijão-caupi (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; EMECHEBE; LAGOKE, 2002; RIOS, 1990; SINGH; ALLEN, 1979) e feijão-comum (CARDOSO, 1990; CARDOSO, 1994; SCHWARTZ et al., 2005). Essa doença é extremamente importante nos cultivos de feijão-caupi e feijão-comum do Agreste Meridional de Pernambuco, tendo em vista o plantio sucessivo dessas culturas, sendo ambas altamente suscetíveis a *S. rolfsii*. Além disso, como outras doenças radiculares, a murcha-de-esclerócio é responsável pela decadência de culturas tradicionais em certos locais, provocando o abandono de terras e gerando um grande impacto sócio-econômico (MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005).

A murcha-de-esclerócio pode ocasionar perdas nos cultivos pela redução do número de plantas durante o ciclo da cultura, diminuição do número de vagens e subsequente decréscimo no rendimento dos grãos (FERY; DUKES, 2002). As perdas econômicas nos cultivos afetados por *S. rolfsii* não foram quantificadas com precisão, contudo, estima-se que sejam elevadas. Esse patógeno pode ocasionar desde danos pouco severos até a perda total da colheita, dependendo da hospedeira e das condições ambientais. No entanto, tem sido atribuído a *S. rolfsii* a responsabilidade por 5% das perdas totais das colheitas no sul dos Estados Unidos (AYCOCK, 1966), de 5 a 10% das perdas em amendoim (*Arachis hipogea* L.) no Alabama, Estados Unidos (STURGEON, 1986), de 40% das perdas em feijão-caupi no Benim (ADANDONON et al., 2005) e até 80% das perdas em beterraba-açucareira (*Beta vulgaris* L.) no sul da Espanha (AIMCRA, 2005).

5. *Sclerotium rolfsii*

5.1. Nomenclatura e gama de hospedeiros

Sclerotium rolfsii é classificado como pertencente ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Agaricomycetes, Subclasse Agaricomycetidae, Ordem Atheliales e Família Atheliaceae (MYCOBANK, 2014). A primeira referência sobre *S. rolfsii* é atribuída a Peter Henry Rolfs, em 1892, e refere-se à podridão de raízes em cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) na Florida (Estados Unidos da América), provocando elevada perda econômica. Entretanto, apenas em 1911 o fungo foi classificado como *S. rolfsii* por Per Andrea Saccardo, para agrupar todos os fungos que produziam micélio estéril e esclerócios.

Durante alguns anos, houve sucessivas descrições de patógenos similares que receberam diferentes denominações taxonômicas, ainda que muitas vezes aparentemente se tratassem do mesmo organismo (AYCOCK, 1966).

A forma sexual ou teleomórfica de *S. rolfsii* não é de ocorrência comum na natureza, embora tenha sido induzida em condições de laboratório (PUNJA; GROGAN, 1983b). A primeira descrição da forma basidial de *S. rolfsii* em meio de cultivo é atribuída a Goto, em 1930, sendo conferida a denominação de *Corticium rolfsii* Curzi (CURZI, 1932). Posteriormente, o teleomorfo foi descrito como *Pellicularia rolfsii* (Sacc.) (WEST, 1947) e depois como *Botryobasidium rolfsii* (Sacc.) Vankatar. (VENKATARAYAN, 1950). Atualmente, a nomenclatura aceita para a forma perfeita de *S. rolfsii* é *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbrough (MYCOBANK, 2014).

Sclerotium rolfsii é um fungo habitante do solo, parasita facultativo, agente causal de doenças em cultivos de grande importância econômica devido à magnitude das perdas e à dificuldade no controle (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1985). A gama de hospedeiros de *S. rolfsii* inclui mais de 750 espécies de plantas, a maioria dicotiledôneas e também algumas monocotiledôneas (FARR; ROSSMAN, 2014). Dentre as dicotiledôneas, mais de 75 famílias são hospedeiras do fungo, com destaque para as leguminosas (PUNJA, 1985, 1988). A incidência de infecções de *S. rolfsii* em leguminosas tem grande importância econômica, devido estas serem cultivadas extensamente em escala mundial. Entre os cultivos suscetíveis a *S. rolfsii* de maior interesse agrícola destacam-se o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), o arroz (*Oryza sativa* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), a beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.), café (*Coffea* spp.), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), a cenoura (*Daucus carota* L.), a fava (*Vicia faba* L.), o feijão-caupi, o feijão-comum, o meloeiro (*Cucumis melo* L.), o pepino (*Cucumis sativus* L.), a pimenta (*Capsicum annuum* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o tomate (FARR; ROSSMAN, 2014; PUNJA, 1988).

5.2. Infecção da hospedeira, patogenicidade e sintomatologia

A infecção pode ocorrer em qualquer órgão da planta sempre que as condições ambientais forem favoráveis, já que não existe especialização do fungo pelos diferentes órgãos vegetais (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1988). O contato das hifas de *S. rolfsii* com a planta, estimula o fungo a produzir compostos extracelulares como ácido oxálico e

poligalacturonases que ocasionam a morte dos tecidos vegetais antes da penetração micelial (BATEMAN; BEER, 1965). Nesse processo, o papel do ácido oxálico é sequestrar o cálcio das paredes celulares para formar oxalato de cálcio, acidificando os tecidos, gerando um pH ácido ótimo para a atividade das endopoligalacturonases. Além disso, a produção de celulases e a pressão mecânica exercida pelos agregados miceliais na superfície dos tecidos vegetais, possuem um papel importante no processo de infecção (BATEMAN; BEER, 1965; PUNJA et al., 1985; SELLAM; AMEIN; E-SHABRAWY, 1982; SMITH; PUNJA; JENKINS, 1986; VAN ETTEN; BATEMAN, 1969).

O crescimento rápido das hifas, assim como a produção conjunta de uma ampla gama de enzimas, pode explicar a diversidade de plantas que *S. rolfsii* é capaz de infectar (PUNJA, 1985). Em geral, transcorridos 2-4 dias após a infecção aparecem os primeiros sintomas, consistidos de lesões no colo da planta ao nível do solo e/ou murcha foliar. Ao longo do desenvolvimento da doença, os órgãos das plantas afetadas apresentam o aspecto típico de necrose, maceração e podridão. Posteriormente, há formação dos esclerócios na superfície do tecido infectado, podendo passar em seguida para o solo e permanecer na ausência de hospedeira durante longo período de tempo até que as condições sejam novamente favoráveis para germinar e dar origem a um novo ciclo infeccioso. *Sclerotium rolfsii* também pode persistir no solo na forma de micélio sobre matéria orgânica morta. Em algumas culturas hospedeiras ocorrem ciclos secundários de infecção em plantas suscetíveis sob condições favoráveis (AYCOCK, 1966; JORDÁN-RAMÍREZ; JIMÉNEZ-DÍAZ; NAVAS-CORTÉS, 2009; SMITH et al., 1988).

O sucesso ou fracasso dos processos de infecção primária depende da distância à que se encontram os esclerócios de *S. rolfsii* da superfície da hospedeira. Gilligan (1985) propôs o termo “patozona” para definir a área circundante ao órgão vegetal suscetível de onde um propágulo do patógeno pode causar infecção. Este conceito é similar ao de rizosfera com a ressalva de que frequentemente se estende além da zona de influência da raiz, em particular, para aqueles patógenos que não requerem estímulo da hospedeira para germinar e para aqueles cuja extensão da patozona depende de sua capacidade da habilidade saprofítica (GILLIGAN; BAILEY, 1997).

O processo de patogênese está diretamente relacionado ao modo de germinação dos esclerócios que, pode ser de dois tipos, hifal ou eruptiva (PUNJA; GROGAN, 1981a), e que é determinada pelo tipo de substrato, umidade, temperatura, presença de compostos voláteis, aeração e atividade dos microrganismos do solo (PUNJA; GROGAN, 1981b; PUNJA; JENKINS, 1984; PUNJA; JENKINS; GROGAN, 1984). A germinação hifal caracteriza-se

pelo crescimento individual das hifas das células da médula do esclerócio, dependendo do desenvolvimento e crescimento das mesmas, assim como da capacidade de infectar tecidos suscetíveis e da disponibilidade de uma fonte externa de nutrientes. Por outro lado, na germinação eruptiva ocorre a saída violenta de agregados hifais através do córtex do esclerócio que, consomem as reservas armazenadas no seu interior para o desenvolvimento. Este micélio, diferente do originado pela germinação hifal, tem a capacidade de infectar os órgãos das plantas suscetíveis sem requerimentos nutritivos externos (PUNJA; GROGAN, 1981b).

Devido à ampla gama de hospedeiras de *S. rolfsii*, existe uma grande diversidade de sintomas. Em plantas afetadas, os sintomas iniciais costumam ser o amarelecimento e murcha das folhas como resultado das lesões que são produzidas inicialmente nas raízes e/ou colo da planta. Além disso, este fungo é capaz de infectar qualquer órgão da planta incluindo folhas, flores e frutos, sempre que estes entrem em contato com o solo infestado e que as condições ambientais sejam favoráveis (AYCOCK, 1966). Sintomas similares, ainda que de forma pontual, foram descritos nas folhas como consequência da infecção causada pelos basidiósporos dispersos no ar de maneira ativa (ALMEIDA et al., 2001; PUNJA; GROGAN, 1983a). Nos últimos estágios do processo infectivo, observa-se o micélio branco abundante na superfície do solo adjacente à planta infectada e a formação de esclerócios cuja coloração evolui do branco ao marrom escuro à medida que amadurecem (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1985).

Em plantas de feijão-comum, os sintomas da doença iniciam-se com lesões marrons e aquosas sobre o colo. À medida que a doença evolui, ocorre o escurecimento e podridão do caule, resultando em destruição do córtex e da raiz principal. Podendo haver, em plantas severamente infectadas o estrangulamento do colo, provocando a murcha da parte aérea, seca, queda de folhas e morte da planta. Em condições de alta umidade nota-se um crescimento micelial branco sobre o colo da planta com o aparecimento de esclerócios. Quando as plantas são infectadas ainda no período de emergência ocorre o tombamento das mesmas, o que reflete negativamente no estande da cultura (CARDOSO, 1994). Semelhante aos sintomas observados em feijão-comum, no feijão-caupi a murcha-de-esclerócio caracteriza-se pelo surgimento de uma densa massa micelial de aspecto cotonoso e coloração branca, com ou sem a presença dos esclerócios que, inicialmente são brancos e posteriormente escurecem. Esses sintomas manifestam-se nas regiões do colo e caule da planta. Uma vez colonizado, o tecido vegetal apresenta intensa maceração que, com a evolução da doença, causam danos ao sistema

vascular e levam ao amarelecimento, murcha e colapso das plantas (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; FERY; DUKES, 2011).

5.3. Epidemiologia

Os esclerócios constituem o inóculo primário na maioria das epidemias causadas por *S. rolfsii*. Por isso, a densidade dos esclerócios no solo é um fator determinante para as epidemias de murcha-de-esclerócio. Áreas com elevada densidade de inóculo viável tendem a apresentar maior percentual de plantas doentes (BACKMAN et al., 1981). A dispersão dessas estruturas se dá de forma passiva através de práticas culturais inadequadas (AYCOCK, 1966). Embora tenha sido relatado que os basidiósporos de *A. rolfsii* possam dispersar de forma ativa o patógeno, sua importância é mínima nesse processo (ALMEIDA et al., 2001; PUNJA; GROGAN, 1983a). Sendo assim, a longevidade dos esclerócios incorporados ao solo determina a severidade das epidemias em ciclos posteriores de cultivo, uma vez que, somente aqueles que permanecem viáveis, são capazes de germinar e causar doença (LAL; SRIVASTAVA; AGNIHOTRI, 1997).

A umidade do solo exerce um papel importante sobre a viabilidade dos esclerócios que, em condições secas podem sobreviver até 5 anos. Além disso, a alternância contínua entre períodos úmidos e secos diminui o percentual de germinação dos esclerócios, devido à lixiviação de nutrientes no solo e colonização por microrganismos (SMITH, 1972). Vale ressaltar que a 90-100% da capacidade de campo os esclerócios não sobrevivem após 45-60 dias, estando o ótimo de sobrevivência entre 30 e 50% (KHATI; BHARGAVA; SHUKLA, 1983). Igualmente, o crescimento micelial é reduzido com o incremento de umidade no solo (PUNJA, 1985).

Os esclerócios podem causar infecção em uma hospedeira suscetível num intervalo de temperaturas entre 25 e 30°C. Contudo, temperaturas inferiores a 20°C e superiores a 36°C limitam o crescimento do fungo e a severidade da murcha-de-esclerócio (LAL; SRIVASTAVA; AGNIHOTRI, 1997; PUNJA; JENKINS, 1984). Além disso, os esclerócios não sobrevivem a temperaturas inferiores a 0°C (PUNJA; RAHE, 1992), o que limita a distribuição do patógeno a zonas com invernos pouco rigorosos. A germinação dos esclerócios é ótima entre 21 e 30°C e mínima em temperaturas inferiores a 15°C e superiores a 36°C (PUNJA, 1985).

A distribuição dos esclerócios ocorre nas camadas mais superficiais do solo, com 80% deles a 15 cm de profundidade e menos de 2% a mais de 30 cm abaixo da superfície do solo (RODRÍGUEZ-KÁBANA; BACKMAN; WIGGINS, 1974; TRUSCOTT; GILLIGAN, 2001). Consequentemente, as infecções iniciais por *S. rolfsii* são mais comuns nessa região do solo, onde os esclerócios estão mais expostos e se encontram em maior densidade. Sendo assim, tratos culturais que danificam o colo da planta e facilitam o contato do inóculo com a superfície da hospedeira elevam a incidência de doença (AYCOCK, 1966).

A presença de matéria orgânica pode favorecer o crescimento micelial de *S. rolfsii* e, por tanto, o desenvolvimento da doença (BEUTE; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1979). Isso se deve à liberação de compostos voláteis que, estimulam a germinação dos esclerócios e aceleram a taxa de crescimento micelial do fungo (PUNJA; JENKINS; GROGAN, 1984). Por outro lado, a exposição prolongada ou a altas concentrações desses compostos pode ser tóxica para o fungo (FRIES, 1973; LINDERMAN; GILBERT, 1969).

A formação dos esclerócios ocorre no campo quando ocorre a redução na disponibilidade de substrato ou tecido da hospedeira sobre a qual vive o fungo, em associação às condições ambientais que permitem ao patógeno sobreviver e dispersar-se. Devido à distribuição de forma agregada dos esclerócios no solo (JORDÁN-RAMÍREZ; JIMÉNEZ-DÍAZ; NAVAS-CORTÉS, 2009; SHEW; BEUTE; CAMPBELL, 1984), a doença ocorre no campo em pequenas reboleiras ou em plantas isoladas, afetando tanto plântulas quanto plantas adultas. No entanto, as plântulas são mais suscetíveis ao patógeno e morrem logo após a infecção (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1985).

5.4. Medidas de manejo

As estratégias de manejo da murcha-de-esclerócio consistem na aplicação simultânea de medidas baseadas no conhecimento sobre a ecologia e a diversidade genética de *S. rolfsii*, bem como sobre a epidemiologia da doença que ele causa. Para feijão-caupi e feijão-comum, tais estratégias consistem em prevenir o surgimento e o desenvolvimento da doença mediante a eliminação do patógeno, escape da infecção, desenvolvimento de resistência ao patógeno e proteção da planta. Para isso, as medidas de manejo recomendadas incluem desde a adequação de práticas culturais, controle químico, controle biológico até o uso de cultivares resistentes (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; BIANCHINI et al., 2005; CARDOSO, 1990, 1994; EMECHEBE; LAGOKE, 2002; RIOS, 1990; SCHWARTZ et al.,

2005; SINGH; ALLEN, 1979). Contudo, tais estratégias têm apresentado pouco êxito devido à ampla gama de plantas cultivadas e não cultivadas suscetíveis ao patógeno, extensa distribuição geográfica do fungo, à elevada agressividade, grande habilidade de competição saprofítica no solo e capacidade de sobrevivência por vários anos no solo na forma de esclerócios (PUNJA, 1985, 1988).

A utilização de solos livres de *S. rolfii* ou com conteúdo mínimo deste, pode evitar o aumento progressivo do inóculo no solo. Por essa razão, uma das primeiras medidas a serem tomadas, em um sistema agrícola é a escolha da área com base em seu perfil sanitário e não somente por suas características agronômicas e/ou atributos de fertilidade, por exemplo. A escolha de solos livres do patógeno pode estar baseada no conhecimento prévio do histórico da área (sequência de cultivos suscetíveis, dados de ocorrência da doença em anos anteriores, etc.) ou mediante a informação gerada pela análise da presença e densidade do inóculo do patógeno no solo (BLUM et al., 2003; PUNJA et al., 1985).

A infestação de solos férteis por agentes fitopatogênicos não exclui necessariamente sua utilização para a produção agrícola, mas, requer a redução ou eliminação do inóculo existente no solo. Para tanto, faz-se necessária a adoção de medidas como eliminação dos restos vegetais de cultivos anteriores que tenham sido infectados pelo patógeno, já que *S. rolfii* possui uma grande capacidade saprofítica para sobreviver e continuar seu ciclo sobre eles, atuando como fonte de inóculo para epidemias no cultivo seguinte (AYCOCK, 1966).

Os esclerócios podem ser eliminados se os restos vegetais forem incorporados ao solo ou coletados e queimados ao final do ciclo da cultura ou por solarização (BASSETO et al., 2011; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2006; PUNJA, 1985). A solarização do solo tem se mostrado um método eficaz na redução da velocidade do crescimento micelial do fungo, na inviabilização dos esclerócios, bem como na diminuição do desenvolvimento da doença (BASSETO et al., 2011; ELAD; KATAN; CHET, 1980; JADON, 2009; MIHAIL; ALCORN, 1984; SINGH; SHUKLA; DWIVEDI, 1990), ainda que somente seja viável do ponto de vista técnico e econômico em pequenas propriedades.

Outra medida bem experimentada é o emprego de compostos orgânicos e inorgânicos sobre o solo, principalmente de natureza nitrogenada, como nitrato cálcico, cianamida, ureia ou sulfato de amônia (CANULLO; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1992; LAL; SRIVASTAVA; AGNIHOTRI, 1997). A incorporação de resíduos orgânicos reduziu o tombamento, incidência, severidade e número de escleródios de *S. rolfii*, pelo aumento da atividade microbiana do solo e pela possível liberação de gases tóxicos que, foram responsáveis pela redução da doença (TOMAZELI; SANTOS; MORALES, 2011). Entretanto, a aplicação

isolada desta medida é viável somente em pequenas propriedades agrícolas devido ao seu elevado custo. Além disso, é importante adequar a dose aplicada nos tratamentos, uma vez que elevadas quantidades desses compostos aumentam o pH do solo e interferem no equilíbrio solo-planta (PUNJA, 1985).

A inundação do solo é um método de controle eficiente, pois priva o patógeno do oxigênio necessário e aumenta a atividade microbiana (GARREN, 1961; KHATI; BHARGAVA; SHUKLA, 1983). Entretanto, trata-se de uma medida de difícil execução, uma vez que deve prolongar-se o tempo necessário para provocar a perda completa de viabilidade dos esclerócios para que não ocorra um efeito contrário ao desejado (GARREN, 1961).

A rotação de culturas é uma medida muito empregada visando evitar a utilização continuada do solo com cultivos suscetíveis e o aumento progressivo do inóculo no campo. A eficiência desta medida sobre *S. rolfsii*, entretanto, é reduzida devido à ampla gama de hospedeiras do fungo, à variabilidade de genética de suas populações e à durabilidade dos esclerócios no solo. Sendo assim, a escolha dos cultivos a serem rotacionados deve ser baseada em sua reduzida suscetibilidade para que haja uma significativa redução nos níveis de inóculo, que permita uma menor incidência da doença em cultivos subsequentes (PUNJA, 1985).

A aplicação de certos fungicidas tem mostrado eficiência na inibição tanto da germinação dos esclerócios como do crescimento micelial (PUNJA, 1985, 1988; PEREZ-MORENO et al., 2009). No entanto, a toxicidade que apresenta grande parte desses fungicidas para a saúde humana e ao meio ambiente, faz com que a maioria das fórmulas já estudadas não esteja autorizada atualmente. Princípios ativos como brometo de metila, captafol, cicloheximida, succinato de cádmio, carboxin, captan, cloroneb, protiocarb ou pentacloronitrobenzeno (PCNB) proporcionam um controle adequado da doença (AGRIOS, 2005; PUNJA, 1988), mas a maioria encontra-se com a comercialização proibida em nível mundial. Atualmente, existem seis produtos fitossanitários registrados para o controle da murcha-de-esclerócio em feijão-comum no Brasil, sendo cinco à base de tiofanato metílico (grupo dos benzimidazóis) e um à base de pentacloronitrobenzeno (quintozene, grupo dos cloroaromáticos) (AGROFIT, 2014).

A seleção de genótipos de feijão-caupi e feijão-comum com resistência à murcha-de-esclerócio é pouco explorada (BLUM et al., 2003; FERY; DUKES, 2011) e, usualmente, não são encontrados genes condicionando resistência a patógenos que têm ampla gama de hospedeiros, como é o caso de *S. rolfsii* (DANTAS et al., 2002).

5.5. Diversidade genética e patogênica de populações

O sucesso evolutivo dos fitopatógenos pode ser atribuído a vários fatores entre eles a alta capacidade em gerar diversidade permitindo uma vantagem seletiva imediata dentro da população de patógenos (HAMMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam a evolução da população de patógenos. O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de fungos patogênicos. Uma grande quantidade de diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação por um patógeno a mudanças ambientais (novos genes de resistência na hospedeira ou fungicidas). Um alto grau de similaridade genética, entre populações coletadas de regiões geográficas amplamente separadas, sugere a ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (MCDONALD; ZHAN; BURDON, 1999).

A diversidade genotípica é um dos vários componentes estimados durante a análise da estrutura genética das populações de microrganismos (GRUNWALD et al., 2003). Vários índices têm sido usados na estimativa da diversidade genética de populações de fitopatógenos (GOODWIN et al., 1993; ZAKK; WILIG, 1994). Esses índices buscam a estimativa de três aspectos da população: riqueza, equidade e dominância. A riqueza é o número de genótipos contidos na população, intuitivamente a diversidade aumenta com o aumento da riqueza. A equidade mede como os genótipos são distribuídos dentro da população. Se um pequeno número de genótipos domina a população, a equidade é baixa e leva a uma baixa diversidade. Mas se cada genótipo ocorre na mesma frequência, então a equidade e a diversidade chega ao máximo. A dominância é o oposto da riqueza e quanto maior a dominância de um ou poucos genótipos na população, maior a dominância e menor a riqueza (KREBS, 1999; ZAKK; WILIG, 1994).

A estrutura genética de um agente patogênico pode ser avaliada utilizando marcadores morfológicos, moleculares, seletivos ou neutros (BURDON, 1993). Compatibilidade micelial pode ser considerada como um marcador neutro, que fornece informações para a análise da diversidade genética das populações de fungos (LESLIE, 1993). Em muitas espécies de fungos filamentosos, indivíduos fisiologicamente distintos podem se fundir assexuadamente para formar um heterocarion estável (LESLIE, 1996). Esses indivíduos, capazes de sofrer fusão e formar um heterocarion estável, são ditos compatíveis vegetativamente e por isso pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade micelial ou vegetativa (GCM). O controle

genético da compatibilidade vegetativa mostrou ser condicionado por diversos *loci* nas espécies em que foi estudado (BEGUERET; TURCQ; CLAVE, 1994). A incompatibilidade pode ser desencadeada por uma interação alélica ou não alélica entre os *loci het* (GLASS; KANEKO, 2003). A fusão de hifas entre indivíduos compatíveis (especificidade idêntica para todos os *loci het*) leva a formação de um heterocarion estável e geralmente está associada com mudanças no fluxo citoplasmático (HICKEY et al., 2002). A fusão de hifas entre indivíduos *het* incompatíveis resulta em uma rápida compartimentalização e morte da célula que se fundiu e das células adjacentes. Grânulos citoplasmáticos são formados poucos minutos após a fusão e os poros dos septos são fechados. A vacuolização do citoplasma é uma característica importante da incompatibilidade do heterocarion. Os vacúolos nos fungos filamentosos contêm várias proteases e enzimas degenerativas, que são liberadas no citoplasma após a lise dos vacúolos. A destruição da célula heterocariótica pode ser concluída dentro de 30 minutos após a fusão de hifa. A semelhança microscópica nos fenótipos sugere que os diferentes fungos podem compartilhar mecanismos comuns de morte celular devido à incompatibilidade do heterocarion mediada por diferentes *loci het* (GLASS; KANEKO, 2003).

A compatibilidade micelial foi descrita como um dos vários eventos associados à compatibilidade vegetativa, a capacidade de dois isolados de se fundirem e formarem um heterocáion estável (KOHN et al., 1991). A compatibilidade vegetativa pode ser avaliada indiretamente usando interações miceliais ou formação de zona de barreira na ausência de marcadores auxotróficos em muitas espécies de fungos. Em cultura, falha de anastomose é observada como uma linha grossa entre os dois isolados diferentes, enquanto que na ocorrência de anastomose bem sucedida, não formam a zona de barreira e crescem normalmente entre si sem qualquer alteração morfológica. Algumas características comuns das zonas de barreira são: 1) uma região central de células mortas ou morrendo; 2) uma área pigmentada mais escura que as demais, e 3) uma camada micelial mais alta ou mais espessa (LESLIE, 1993).

Em fungos filamentosos, a compatibilidade micelial é um fenômeno comum e tem sido uma ferramenta útil para avaliar indiretamente a diversidade genética intra-específica em populações de fungos fitopatogênicos (ARMENGOL et al., 2010; BASKARATHEVAN et al., 2012; BEZERRA et al., 2013; ; IKEDA et al., 2011; KAUSERUD, 2004; KOHN et al., 1991; KULL et al., 2004; LESLIE, 1993; MEIJER; MEGNEGNEAU; LINDEN, 1994; MILGROOM; CORTESI, 1999; WU; SUBBARAO, 2006).

Devido a sua importância como patógeno cosmopolita e habitante do solo, torna-se indispensável para o manejo da doença o conhecimento da diversidade genética e da

distribuição das populações de *S. rolfsii* em áreas infestadas. O estudo de populações de *S. rolfsii* toma um novo direcionamento quando se considera o fungo como de reprodução estritamente assexuado ao constatar-se que o estado reprodutivo sexual, ainda induzido em condições de laboratório, é observado muito esporadicamente em condições naturais (PUNJA; GROGAN, 1983b). Este fato sugeriria a predominância de uma estrutura clonal nas populações naturais do patógeno e assumiria que o fluxo de informação genética entre os componentes das mesmas só ocorreria por compatibilidade vegetativa. Este fenômeno foi descrito por Epps, Patterson e Freeman (1951), mas somente Punja e Grogan (1983a) demonstraram que podem ser estabelecidos pontos de união ou pontes de anastomose entre as hifas dos isolados de *S. rolfsii*. Portanto, ao serem pareados isolados incompatíveis seria produzida uma reação de aversão entre eles nas zonas de união, enquanto ao serem pareados isolados compatíveis ocorreria a fusão (anastomose) de hifas e seriam considerados como pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade micelial (GCM).

Estudos de GCMs têm demonstrado haver compatibilidade micelial entre isolados de *S. rolfsii* (PUNJA; GROGAN, 1983a), e com frequência são usados para avaliar a diversidade genética entre populações desse fungo (ADANDONON et al., 2005; ALMEIDA et al., 2001; CILLIERS; HERSELMAN; PRETORIUS, 2000; CILLIERS; PRETORIUS; VAN WYK, 20002; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2008; HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; LE et al., 2012; NALIM et al., 1995; OKABE; MATSUMOTO, 2000; PUNJA; GROGAN, 1983a; PUNJA; SUN, 2001; REMESAL et al., 2012; SARMA; SINGH; SINGH, 2002).

A detecção de diferentes GCMs de um fitopatógeno indica a existência de populações geneticamente isoladas e um número elevado de GCMs reflete a ampla diversidade genética nas populações (BEGUERET; TURCQ; CLAVE, 1994; LESLIE, 1993). A detecção de um elevado número de GCMs pode indicar que a introdução de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas foi antiga, enquanto um número reduzido de GCMs é indicativo de introduções recentes (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995). Outra possível explicação para o elevado número de GCMs, além da reprodução clonal típica de *S. rolfsii*, é a ocorrência de reprodução sexuada com trocas de informação genética entre os isolados (ADANDONON et al., 2005). Em se tratando de um fungo com forma sexual conhecida (*A. rolfsii*) essa hipótese parece ser coerente, mas a literatura especializada relata apenas a fase assexuada do fungo em condições de campo (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1985, 1988). A elevada prevalência e abundância de determinados GCMs pode indicar que os mesmos foram extensivamente disseminados dentro e entre as áreas cultivadas por práticas culturais (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; REMESAL et al., 2012). Por outro lado, a ocorrência de um único GCM em uma área

também pode ser um indicativo de que os clones se tornaram adaptados às condições microclimáticas ou hospedeiras específicas, e são menos suscetíveis a serem resultantes de trocas genéticas e recombinação (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; HAMBLETON; WALKER; KOHN, 2002).

O fato de isolados de *S. rolf sii* originários da mesma área serem alocados em diferentes GCMs sugere a ocorrência de diferenças genéticas dentro das subpopulações, o que indicaria que as distintas subpopulações são resultantes de múltiplas introduções de isolados procedentes de diferentes zonas infestadas que se estabelecem em forma de novos GCMs (CILLIERS; HERSELMAN; PRETORIUS, 2000; NALIM et al., 1995; PUNJA, 1985). Este fato tem sido atribuído em menor grau ao papel dos basidiósporos na dispersão do patógeno (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; PUNJA, 1988; PUNJA; GROGAN 1983a).

A literatura sugere que um GCM de *S. rolf sii* pode estar associado tanto à planta hospedeira quanto à área geográfica da qual foi obtido o isolado, mas também um único GCM pode compreender isolados de diversas hospedeiras e origens geográficas. A diversidade na compatibilidade micelial entre populações de *S. rolf sii* que ocorrem em determinadas regiões geográficas ou culturas específicas, também foi demonstrada. Estudos realizados na África do Sul (CILLIERS; PRETORIUS; VAN WYK, 20002), no Brasil (ALMEIDA et al., 2001), na Espanha (REMESAL et al., 2012), na Índia (SARMA; SINGH; SINGH, 2002) e no México (FLORES-MOCTEZUMA et al., 2008) indicaram existir uma considerável diversidade genética entre isolados de *S. rolf sii* de várias hospedeiras ou localidades, sem uma correlação clara entre o GCM a que pertenciam, a hospedeira ou a origem geográfica (ALMEIDA et al., 2001; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2008; REMESAL et al., 2012; SARMA; SINGH; SINGH, 2002), apesar de haver uma certa relação entre os GCMs e as hospedeiras de origem dos isolados de populações na África do Sul (CILLIERS; PRETORIUS; VAN WYK, 20002). Além disso, em amendoim foi relatada uma grande diversidade de GCMs dentro de um único campo no Texas (EUA) (NALIM et al., 1995), no Japão (OKABE; MATSUMOTO, 2000) e no Vietnã (LE et al., 2012).

O conhecimento da gama de hospedeiras de populações de *S. rolf sii* presentes numa determinada área é essencial para a recomendação de culturas adequadas como alternativas aos cultivos principais (REMESAL et al., 2012). Estudos sobre a diversidade patogênica de isolados de *S. rolf sii* em hospedeiras suscetíveis mostraram um elevado grau de variação (ADANDONON et al., 2005; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2006; REMESAL et al., 2012).

5.6. Marcadores moleculares e grupos de compatibilidade micelial

Em *S. rolfsii*, a análise de GCMs tem sido empregada na determinação da variabilidade intra-específica do mesmo, assim como para entender a estrutura de suas populações. Vários autores apontam que os isolados de *S. rolfsii* pertencentes a um mesmo GCM são geneticamente mais similares entre si do que isolados enquadrados em diferentes GCMs (ALMEIDA et al., 2001; CILLIERS; HERSELMAN; PRETORIUS, 2000; HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; NALIM et al., 1995; OKABE et al., 1998; OKABE; MATSUMOTO, 2000; PUNJA; SUN, 2001), entretanto, a variabilidade encontrada entre isolados de certos GCMs e a falta de marcadores que identifiquem e caracterizem estes de forma inequívoca, tem impedido que se possa caracterizar adequadamente a estrutura de suas populações (REMESAL et al., 2013).

No estudo dos GCMs em *S. rolfsii*, as principais técnicas de análise molecular empregadas estão baseadas em marcadores moleculares neutros destinados a analisar o genoma completo ou sequências conhecidas deste. A técnica de RFLP (polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição) tem sido empregada com *S. rolfsii* para a análise do polimorfismo da região espaçadora interna (ITS) do DNA ribossômico nuclear (DNAr) ITS1-5.8s-ITS2 (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; NALIM et al., 1995; OKABE et al., 1998), que é a sequência mais utilizada em estudos relacionados a sistemática, filogenia e identificação de fungos a nível de espécie (BEGEROW et al., 2010). Os padrões RFLPs da região ITS do DNAr evidenciam certa variabilidade entre os GCMs de *S. rolfsii*, entretanto, tanto em coleções de isolados dos Estados Unidos (NALIM et al., 1995), do Japão (OKABE et al., 1998) ou do Vietnã (LE et al., 2012), como em nível mundial (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995), os padrões de bandas aparecem com frequência em vários GCMs. Esta técnica permite diferenciar com clareza os isolados de *S. rolfsii* e *S. delphinii* Welch (HARLTON; LÉVESQUE; PUNJA, 1995; NALIM et al., 1995), espécies muito próximas taxonomicamente e de caracteres morfológicos muito similares que com frequência apresentam erros na sua identificação (REMESAL et al., 2013). Vários autores têm empregado a técnica de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado por iniciadores simples aleatórios) para a análise das populações de *S. rolfsii* (ALMEIDA et al., 2001; OKABE; MATSUMOTO, 2000; PUNJA; SUN, 2001) e identificado padrões de bandas que em sua maioria eram característicos de GCMs, enquanto, outros eram comuns a vários grupos, e sem relação com a hospedeira ou origem geográfica dos isolados. Esta técnica permite detectar variabilidade intraespecífica em GCMs como consequência de mutações somáticas que

possam ter sido produzidas nas distintas subpopulações do fungo (PUNJA; SUN, 2001) e, também, sugere a origem clonal naqueles outros GCM cujos isolados compartilham idênticos perfis RAPD como consequência da dispersão do fungo e do recente estabelecimento em um lugar geográfico determinado (OKABE; MATSUMOTO, 2000; PUNJA; SUN, 2001). A técnica de AFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos amplificados) tem sido menos utilizada em estudos de *S. rolfsii*. Cilliers, Herselman e Pretorius (2000) estudando uma coleção de isolados de *S. rolfsii* obtidos de amendoim na África do Sul, mostraram que a análise por AFLPs propiciou a diferenciação de GCMs e detecção da variabilidade entre isolados dentro dos GCMs. No entanto, a análise de AFLP falhou na diferenciação entre 12 GCMs de *S. rolfsii* obtidos de beterraba-açucareira de diferentes localidades (REMESAL et al., 2013).

Ítrons presentes em genes codificadores de proteínas tendem a evoluir a um ritmo superior ao nível de gênero e espécie do que outras regiões, mais comumente utilizados, tais como a região ITS do rDNA nuclear. Assim, análises de sequências desses genes têm emergido como uma ferramenta confiável e com alta resolução para a caracterização intra-específica de fungos (BAIN et al., 2007; FOURNIER; WIDMER; ENKERLI, 2010). Dois genes de cópia única, o fator de alongação 1α (EF1- α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2), têm sido utilizados com sucesso em fungos para determinar as relações filogenéticas entre táxons intimamente relacionadas e para inferência filogenética intraespecífica (LIU; WHELEN; HALL, 1999; MATHENY et al., 2007; O'DONNELL et al., 1998; RODRÍGUEZ-ESTRADA; JIMÉNEZ-GASCO; ROYSE, 2010). A EF1- α é uma proteína de ligação necessária para a síntese de proteínas ribossomais em eucariotas e é a segunda proteína mais abundante, com $\leq 2\%$ do total de proteínas presentes nas células ativas (ROGER et al., 1999). O gene RPB2 codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II, a enzima que transcreve a pré-mRNA (LIU; WHELEN; HALL, 1999; MATHENY et al., 2007), que possui 12 domínios altamente conservados em todos os reinos (LIU; WHELEN; HALL, 1999). Com base no polimorfismo de nucleótidos, 12 GCMs de *S. rolfsii* de beterraba-açucareira previamente caracterizados por pareamentos foram analisados, sendo constatado que o gene RPB2 foi mais variável entre GCMs comparado com o gene EF1- α . Puderam ser caracterizados 10 de 12 GCMs utilizando a região RPB2, enquanto somente 7 GCMs com a região EF1- α . No entanto, a análise combinada das sequências parciais dos dois genes permitiu a identificação dos 12 GCMs (REMESAL et al., 2013). Portanto, esse estudo demonstrou que a variação de sequência na proteína-codificando os

genes EF1- α e RPB2 pode ser explorada como uma ferramenta de diagnóstico para GCMs de *S. rolfsii*, bem como para identificar GCMs não descritos previamente.

O conhecimento sobre a diversidade genética e a virulência em populações locais de *S. rolfsii* associadas a diferentes culturas é um componente chave para o manejo da murcha-de-esclerócio. Apesar da importância dos cultivos de feijão-caupi e feijão-comum para a região Agreste do estado de Pernambuco e da importância crescente da murcha-de-esclerócio, não existem informações sobre a diversidade genética e patogênica em populações de *S. rolfsii* associadas a essas leguminosas no Brasil. Diante disso, os objetivos dessa tese foram: a) caracterizar os GCMs de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste de Pernambuco; b) determinar a prevalência e a diversidade de GCMs de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas; c) investigar a relação entre os GCMs de *S. rolfsii* e sua patogenicidade e virulência a seis importantes espécies de plantas; d) avaliar a utilidade da análise das sequências dos genes EF1- α e RPB2 para diferenciar GCMs de *S. rolfsii* detectados na região Agreste de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; MERWE, N. A.; SANDERS, G. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 34, n. 1, p. 19-25, 2005.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press. 2005. 922 p.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários** [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 31 jan. 2014.
- AIMCRA, 2005. **Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2003/04** - Siembra otoño 2002, zona Sur. Valladolid: Asociación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera, 2005. 208 p.
- ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; CALVO, E. S.; TESSNMAN, D.; YORINORI, J. T. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 9, p. 493-502, 2001.
- ANGIOI, S. A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, V.; SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Dordrecht, v. 121, n. 8, p. 829-843, 2010.
- ARAÚJO, J. P. P. Melhoramento do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 251-283.
- ARMENGOL, J.; VICENT, A.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). **Plant Pathology**, St. Paul, v. 59, n. 1, p. 179-185, 2010.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 461-484.
- AYCOCK, R. **Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years**. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1966. 202 p. (NCAES. Technical Bulletin, 174).
- BACKMAN, P. A.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; CAULIN, M. C.; BELTRAMINI, E.; ZILIANI, N. Using the soil-tray technique to predict the incidence of *Sclerotium* rot in sugar beets. **Plant Disease**, St. Paul, v. 65, n. 4, p. 419-421, 1981.
- BAIN, J. M.; TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; JACOBSEN, M. D.; SHAW, D.; GOW, N. A. R.; ODDS, F. C. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 11, p. 1469-1477, 2007.

- BARROS, A. P. O. **Influência da utilização de herbicidas sobre *Rhizoctonia* spp. e nas populações e atividade microbiana em solos do Agreste de Pernambuco**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BASKARATHEVAN, J.; JASPERS, M. V.; JONES, E. E.; CRUICKSHANK, R. H.; RIDGWAY, H. J. Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. **Fungal Biology**, Manchester, v. 116, n. 2, p. 276-288, 2012.
- BASSETO, M. A.; BUENO, C. J.; CHAGAS, H. A.; ROSA, D. D.; PADOVANI, C. R.; FURTADO, E. L. Efeitos da simulação da solarização do solo com materiais vegetais sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 37, n. 3, p. 116-120, 2011.
- BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, n. 2, p. 204-211, 1965.
- BEGEROW, D.; NILSSON, H.; UNTERSEHER, M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n.1, p. 99-108, 2010.
- BEGUERET, J.; TURCQ, B.; CLAVE, C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 10, p. 441-446, 1994.
- BEN-YEPHET, Y.; BITTON, S. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 13, n. 1, p. 33-40, 1985.
- BEUTE, M. K., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Effect of volatile compounds from remoistened plant tissues on growth and germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 802-805, 1979.
- BEZERRA, C. S.; CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; SALES JÚNIOR, R.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S.J. Population structure of *Monosporascus cannonballus* isolated from melons produced in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 2, p. 161-167, 2013.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. v. 2, p. 333-349.
- BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C.V.T.; ARIOLI, C.J.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEDT, F.R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 96-100, 2003.
- BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- BURDON, J. J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. **Annual**

Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 31, p. 305-323, 1993.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Dordrecht, v.121, n. 7, p. p.801-813, 2010.

CANULLO, G. H.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Evaluation of host and pathogen responses for screening soil amendments to control *Sclerotium rolfsii*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 147, n. 2, p. 275-282, 1992.

CARDOSO, J. E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. 30 p.

CARDOSO, J. E. Podridão do colo. In: SARTORATO, A. & RAVA, C.A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Goiana: EMBRAPA-CNPAP, 1994. p. 165-173.

CARVALHO, H. W. L.; WARWICK, D. R. N.; PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; MELO, L. C.; COSTA, J. G. Estabilidade de linhagens avançadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), do grupo comercial carioca, no biênio 2001/2002, no Estado de Sergipe. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CONAFE, 7., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão. 2005. p. 433-436

CILLIERS, A. J.; HERSELMAN, L.; PRETORIUS, Z. A. Genetic variability within and among mycelia compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 9, p. 1026-1031, 2000.

CILLIERS, A. J.; PRETORIUS, Z. A.; VAN WYK, P. S. Mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South África. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 68, n. 3, p. 389-392, 2002.

COELHO, R. S. B. Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001. Teresina. **Anais ...** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 321-322. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 56).

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2013/2014** [on line]. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

CORTESI, P.; MILGROOM, M. G. Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, n. 1, p. 79-86, 2001.

CURZI, M. Studi su lo *Sclerotium rolfsii*. **Bolletino della Reale Stazione di Patologia Vegetale di Roma**, Roma, v. 11, p. 306-373, 1932.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 528-531, 2002.

- DEBOUCK, D. G. Systematic and morphology. In: CHOONHOVEN, A. VAN; VOYSEST, O. (Eds). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 55-118.
- ELAD, Y.; KATAN, J.; CHET, I. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 4, p. 418-422, 1980.
- EMECHEBE, A. M.; LAGOKE, S. T. O. Recent advances in research on cowpea diseases. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. (Eds.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. 433 p.
- EPPS, W. M.; PATTERSON, J. C.; FREEMAN, I. E. Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 41, n. 3, p. 245-255, 1951.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases: Fungus-host distributions** [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 18 jan. 2014.
- FERY, R.; DUKES, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 403–408, 2002.
- FERY, R.; DUKES, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. **International Journal of Agronomy**, Cairo, v. 2011, 6 p., 2011 (doi:10.1155/2011/652404).
- FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; MONTES-BELMONT, R.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; NAVA-JUÁREZ, R. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. **Crop Protection**, Guildford, v. 25, n. 3, p. 195-201, 2006.
- FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; MONTES-BELMONT, R.; ROGEL-HERNANDEZ, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, M. E. Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Obregón, v. 26, n. 1, p. 7-14, 2008.
- FOURNIER, A.; WIDMER, F.; ENKERLI, J. Development of a single nucleotide polymorphism (SNP) assay for genotyping of *Pandora neoaphidis*. **Fungal Biology**, London, v. 114, n. 4, p. 498-506, 2010.
- FREIRE FILHO, F. R. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Terezina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.
- FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 12, p. 136-137, 1983.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 27-92.
- FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 60, n. 1, p. 1-21, 1973.

- GARREN, K. H. Control of *Sclerotium rolfsii* through cultural practices. **Phytopathology**, Lancaster, v. 51, n. 1, p. 120-124, 1961.
- GILLIGAN, C. A. Probability models for host infection by soilborne fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 1, p. 61-67, 1985.
- GILLIGAN, C. A.; BAILEY, D. J. Components of pathozone behaviour. **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, n. 4, p. 475-490, 1997.
- GLASS N.L., KANEKO I., Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2003.
- GOODWIN, S. B.; SAGHAI MAROOF, M. A.; ALLARD, R. W.; WEBSTER, R. K. Isozyme variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe, Australia and the United States. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 1, p. 49-58, 1993.
- GRÜNWARD, N. J.; GOODWIN, S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 7, p. 738-746, 2003.
- HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L. M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999– 2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, n.3, p. 309-315, 2002.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.
- HARLTON, C. E.; LÉVESQUE, C. A.; PUNJA, Z. K. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1269-1281, 1995.
- HICKEY, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, N. L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 109–119, 2002.
- IKEDA, K.; INOUE, K.; NAKAMURA, H.; HAMANAKA, T.; OHTA, T.; KITAZAWA, O.; KIDA, C.; KANEMATSU, S.; PARK, P. Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. **Fungal Biology**, Manchester, v. 115, n. 1, p. 80-86, 2011.
- JADON, K. S. Eco-friendly management of brinjal collar rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 62, n. 3, p. 345-347, 2009.
- JORDÁN-RAMÍREZ, R; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Spatial pattern and temporal dynamics of *Sclerotium* root rot (*Sclerotium rolfsii*) in fall sown sugar beet crops in southern Spain. **IOBC/WPRS Bulletin**, Dijon, v. 42, p. 101-103, 2009.
- KAUSERUD, H. Widespread vegetative compatibility groups in the dry-rot fungus *Serpula lacrymans*. **Mycologia**, Corballis, v. 96, n. 2, p. 232-239, 2004.

- KHATI, D. V. S.; BHARGAVA, S. N.; SHUKLA, D. N. Some studies on the saprophytic survival of *Sclerotium rolfii* in soil. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 90, n. 4, p. 382-387, 1983.
- KOHN, L. M.; STASOVSKI, E.; CARBONE, I.; ROYER, J.; ANDERSON, J. B. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 480-485, 1991.
- KREBS, C.J. **Ecological methodology**. 2. ed. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1999. 620 p.
- KULL, L. S.; PEDERSEN, W. L.; PALMQUIST, D.; HARTMAN, G. L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 325-332, 2004.
- LAL, R. J.; SRIVASTAVA, S. N.; AGNIHOTRI, V. P. Epidemiology and management of *Sclerotium* root rot of sugar beet: a threatening malady. In: AGNIHOTRI, V. P.; SARBHOY, A. K.; SINGH, D. V. (Eds.). **Management of threatening plant diseases of national importance**. : New Delhi: Malthora Publishing House. 1997, p. 161-178.
- LE, C. N.; MENDES, R.; KRUIJT, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Genetic and phenotypic diversity of *Sclerotium rolfii* in groundnut fields in central Vietnam. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 3, p. 389-397, 2012.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, 1993.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility – promises and prospects. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 24, n. 1, p. 3-6, 1996.
- LINDERMAN, R. G.; GILBERT, R. G. Stimulation of *Sclerotium rolfii* in soil by volatile components of alfalfa hay. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 12, p. 1366-1372, 1969.
- LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, D. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, Leiden, v. 16, n. 9, p. 1799-1808, 1999.
- MATHENY, P. B.; WANG, Z.; BINDER, M.; CURTIS, J. M.; LIM, Y. W.; NILSSON, H.; HUGHES, K. W.; HOFSTETTER, V.; AMMIRATI, J. F.; SCHOCH, C. L.; LANGER, E.; LANGER, G.; MCLAUGHLIN, D. J.; WILSON, A. W.; FROSLEV, T.; GE, Z. W.; KERRIGAN, R. W.; SLOT, J. C.; YANG, Z. L.; BARONI, T. J.; FISCHER, M.; HOSAKA, K.; MATSUURA, K.; SEIDL, M. T.; VAURAS, J.; HIBBETT, D. S. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Leiden, v. 43, n.3, p. 430-451, 2007.
- MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 639-645, 1999.
- MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, B.; LINDEN, E. G. A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 2, p. 267-276, 1994.

MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi**: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 229-242.

MESQUITA, R.F.; CORRÊA, D.A.; ABREU, P.M.C.; LIMA, Z.A.R; ABREU, B.F.A. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.1114-1121, 2007.

MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 2, p. 156-159, 1984.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A.; ANDRADE, D. E. G. T. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco - Imprensa Universitária, 2005. p. 1-18.

MILGROOM, M. G.; CORTESI, P. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. **Proceedings of the National Academy Science of USA**, Washington, v. 96, p. 10518-10523, 1999.

MYCOBANK. **Fungal databases**: Nomenclature and species bank [on line]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2014. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

NALIM, F. A.; STARR, J. L.; WOODARD, K. E.; SEGNER, S.; KELLER, N. P. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 12, p. 1507-1512, 1995.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy Science of USA**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

OKABE, I.; MATSUMOTO, N. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 2, p. 145-148, 2000.

OKABE, I.; MORIKAWA, C.; MATSUMOTO, N.; YOKOYAMA, K. Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 39, n. 4, p. 399-407, 1998.

OLIVEIRA, I. P.; CARVALHO, A. M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmidos de semi-árido do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 63-96.

PEREZ-MORENO, L.; VILLALPANDO-MENDIOLA, J.J.; CASTANEDA-CABRERA, C.; RAMIREZ-MALAGON, R. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmentebusados para su combate. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Obregón, v. 27, n. 1, p. 1-17, 2009.

PERRINO, P.; G. LAGHETTI, P. L.; SPAGNOLETTI, Z.; MONTI, L. M. Diversification of cowpea in the Mediterranean and other centres of cultivation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 40, n. 3, p. 121-132, 1993.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M.; ANDRADE, G.P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.215-222.

PLANO TERRITORIAL DE REDE PRODUTIVA. **Rede territorial produtiva do feijão - Agreste Meridional e Central**. Recife: Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária/ProRural, 2012. 110 p.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 97-127, 1985.

PUNJA, Z. K. *Sclerotium (Athelia) rolfsii* a pathogen of many plant species. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 6, p. 523-534, 1988.

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Eruptive germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 10, p. 1092-1099, 1981a.

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Mycelial growth and infection without a food base by eruptive germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 10, p. 1099-1103, 1981b.

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaryon incompatibility in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 9, p. 1273-1278, 1983a.

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 9, p. 1279-1284, 1983b.

PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F. Influence of temperature, moisture, modified gaseous atmosphere, and depth in soil on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 6, p. 749-754, 1984.

PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F.; GROGAN, R. G. Effect of volatile compounds, nutrients and source of sclerotia on eruptive sclerotium germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 5, p. 1290-1295, 1984.

PUNJA, Z. K.; SMITH, V. L.; CAMPBELL, C. L.; JENKINS, S. F. Sampling and extraction procedures to estimate numbers, spatial pattern, and temporal distribution of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 6, p. 469-474, 1985.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1992. p. 166-170.

PUNJA, Z. K.; SUN, L. J. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *Sclerotium delphinii*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 5, p. 537-546, 2001.

REMESAL, E.; JORDÁN-RAMÍREZ, R.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from

sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. **Plant Pathology**, London, v. 61, n. 6, p. 739-753, 2012.

REMESAL, E.; LANDA, B. B.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Sequence variation in two protein-coding genes correlates with mycelial compatibility groupings in *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, n. 5, p. 479-487, 2013.

RIOS, G. P. **Principais doenças do caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. 40 p.

RODRÍGUEZ-ESTRADA, A.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; ROYSE, D. J. *Pleurotus eryngii* species complex: Sequences analysis and phylogeny on partial EF1 α and RPB2 genes. **Fungal Biology**, London, v. 114, n. 4, p. 421-428, 2010.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; BACKMAN, P. A.; WIGGINS, E. A. Determination of sclerotial populations of *Sclerotium rolfsii* in soil by a rapid flotation sieving technique. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, n. 6, p. 610-615, 1974.

ROGER, A. J.; SANDBLOM, O.; DOOLITTLE, W. F.; PHILIPPE, H. An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, Leiden, v. 16, n. 2, p. 218-233, 1999.

SANTOS, J. F.; GRANGEIRO, J. I. T.; BRITO, C. H.; SANTOS, M. C. C. A. Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microregião cariri paraibano. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n.1, p. 214-222, 2009.

SARMA, B. K.; SINGH, U. P., SINGH, K. P. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 1051-1058, 2002.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; HALL, R.; FORSTER, R. L. (Eds.). **Compendium of bean diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 2005. 120 p.

SELLAM, M. A.; AMEIN, A. M.; E-SHABRAWY, A. M. Possible role of phosphatidase in pathogenesis of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 105, n. 2, p. 142-145, 1982.

SHEW, B. B.; BEUTE, M. K.; CAMPBELL, C. L. Spatial pattern of Southern Stem Rot caused by *Sclerotium rolfsii* in 6 North-Carolina peanut fields. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 6, p. 730-735, 1984.

SILVA, K. J. D. Estatística da produção de feijão-caupi. 2011, **Cultivar**. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=880>>. Acesso em 07 jan. 2014.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMÒ, M. (Eds.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

SINGH, R. K.; SHUKLA, R. P.; DWIVEDI, R. S. Effects of solar treatment on germination of sclerotia (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) and on other soil mycoflora. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 152-154, 1990.

- SINGH, S. R.; ALLEN, D. J. **Parasitos y enfermedades del caupi**. Ibadan: IITA, 1979. 113 p.
- SMITH, A. M. Drying and wetting sclerotia promotes biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 4, n. 2, p. 119-123, 1972.
- SMITH, V. L.; CAMPBELL, C. L.; JENKINS, S. F.; BENSON, D. M. Effects of host density and number of disease foci on epidemics of southern blight of processing carrot. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 5, p. 595-600, 1988.
- SMITH, V. L.; PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, p. 755-759, 1986.
- SOARES, C. S.; DANTAS, J. P.; ALCÂNTARA, R. L. B. Eficiência de estirpes de rizóbio na absorção de nitrogênio em caupi: safra 2006. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, p. 1357 – 1360, 2007.
- STURGEON, R. V. Peanut disease loss estimates for major peanut producing states in the United States for 1984 and 1985. **Proceedings of the American Peanut Research and Education Society**, Raleigh, v. 18, p. 24-26, 1986.
- TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 99-136.
- TOMAZELI, V. N.; SANTOS, I.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. **Ambiência**, Guarapuava, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2011.
- TRUSCOTT, J. E.; GILLIGAN, C. A. The effect of cultivation on the size, shape, and persistence of disease patches in fields. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 13, p. 7128-7133, 2001.
- VAN ETTEN, H. D.; BATEMAN, D. F. Enzymatic degradation of galactan, galactomannan, and xylan by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 7, p. 968-972, 1969.
- VENKATARAYAN, S. V. Notes on some species of *Corticium* and *Pellicularia*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 181-186, 1950.
- VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 600p.
- VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. Características botânicas e fisiológicas da semente. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Eds.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 25-38.
- WEST, E. *Sclerotium rolfsii* Sacc. and its perfect stage on climbing fig. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 37: 67-69. 1947.
- WU, B. M.; SUBBARAO, K. V. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 12, p. 1322-1339, 2006.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R. Fungal biodiversity patterns. In: FOSTER, M.S.; BILLS, G.F.; MUELLER, G.M. (Eds.). **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Academic Press, 2004. p. 59-75.

Capítulo II

Grupos de compatibilidade micelial e diversidade patogênica em populações de *Sclerotium rolfsii* de cultivos de feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco

Submissão: **European Journal of Plant Pathology**
Dordrecht, Holanda
JCR = 1,61

Grupos de compatibilidade micelial e diversidade patogênica em populações de *Sclerotium rolfsii* de cultivos de feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco

João Victor Jansen de Queiroz^a, Leonardo Tavares de Souza^a, Juan Antonio Navas-Cortés^b, Marcos Paz Saraiva Câmara^a and Sami Jorge Michereff^a

^a Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 14080 Córdoba, Espanha.

Corresponding author: S.J. Michereff

E-mail: sami@depa.ufrpe.br

Resumo A estrutura populacional de *Sclerotium rolf sii* de feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste do Estado de Pernambuco (Brasil), foi determinada pelas análises de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) e virulência a seis espécies de plantas economicamente importantes. Dezesete GCMs (I-XVII) foram identificados entre 169 isolados de *S. rolf sii*. O GCM II foi o mais prevalente e abundante, representando 33,1% dos isolados e sendo detectado em 13 das 24 áreas amostradas. Nove GCMs (VI, VII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV e XVII) foram identificados em apenas uma área. A distribuição e a frequência dos GCMs mostraram-se heterogêneas em relação aos municípios e às hospedeiras de origem. Nenhuma diferença foi constatada entre as hospedeiras de origem em relação à diversidade de GCMs. A maior riqueza de GCMs foi encontrada no município de São João, enquanto Lajedo apresentou reduzida riqueza, baixa equidade e alta dominância de GCMs. Quatro das seis espécies de plantas (feijão-caupi, feijão-comum, girassol e soja) testadas foram infectadas por todos os isolados dos 17 GCMs. Em algodão, a virulência dos GCMs foi bem inferior à observada nas outras espécies vegetais. Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os GCMs quanto aos níveis de virulência a todas as espécies de plantas. Com base na virulência, a análise de agrupamento permitiu a seleção de seis agrupamentos de GCMs e cinco agrupamentos de espécies de plantas.

Palavras-chave *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, GCM, Virulência

Abstract The population structure of *Sclerotium rolf sii* from cowpea and common bean crops in region Agreste of Pernambuco State (Brazil) was determined by analyses of mycelial compatibility groups (MCGs) and virulence to six economically important plant species. Seventeen MCGs (I-XVII) were identified among 169 *S. rolf sii* isolates. MCG II was the most prevalent and abundant, representing 33.1% of the isolates and being detected in 13 of 24 sampled areas. Nine MCGs (VI, VII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV e XVII) were identified in only one area. The distribution and frequency of MCGs proved heterogeneous in relation to municipalities and host of origin. No differences between hosts of origin were found in relation to the diversity of MCGs. The highest richness of MCGs was found in the municipality of São João, while Lajedo showed reduced richness, low equity and high dominance of MCGs. Four of the six species tested plants (cowpea, common bean, sunflower and soybean) were infected by all isolates of the 17 MCGs. In cotton, the virulence of MCGs was well below that observed in other plant species. There was a significant difference

($P \leq 0.05$) among MCGs for levels of virulence to all plant species. Based on virulence, cluster analyses allowed selection into six MCG groupings and five plant species groupings.

Keywords *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, MCG, Virulence

Introdução

Sclerotium rolfsii Sacc., a fase assexual do basidiomyceto *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbrough, é um fungo fitopatogênico habitante do solo distribuído por todas as zonas agrícolas do mundo (Punja 1985). A gama de hospedeiros desse fungo compreende mais de 750 espécies de plantas, a maioria dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (Farr e Rossman 2014). A doença resultante da infecção é a murcha-de-esclerócio, cujos principais sintomas são a podridão de colo e raiz, cancro no caule e tombamento. O fungo produz micélio branco abundante sobre tecidos hospedeiros infectados e forma esclerócios. A sobrevivência do fungo no solo ocorre por esclerócios, bem como por micélio em plantas infectadas ou infestando restos culturais (Punja 1985). Ele pode formar uma fase sexual, mas isso raramente ocorre na natureza e o seu papel no ciclo da vida do fungo é desconhecido (Nalim et al. 1995).

Epidemias de murcha-de-esclerócio são mais severas em regiões tropicais e subtropicais, que favorecem a germinação dos esclerócios, crescimento micelial, infecção e desenvolvimento da doença subsequente (Aycock 1966; Punja 1985). Essas condições climáticas ocorrem na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil, onde epidemias severas de murcha-de-esclerócio são freqüentes em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Na região são cultivados cerca de 12.000 ha de feijão-caupi e 15.000 ha de feijão-comum, sendo que o feijão-caupi é cultivado predominantemente na estação seca (setembro-dezembro), em sucessão ao cultivo de feijão-comum, cultivado na estação úmida (abril-julho) (Plano Territorial de Rede Produtiva 2012). A murcha-de-esclerócio pode ocasionar perdas nos cultivos pela redução do número de plantas durante o ciclo da cultura, diminuição do número de vagens e subsequente decréscimo no rendimento dos grãos (Fery e Dukes 2002). Perdas de produção de feijão-caupi de até 40% no Benin (Adandonon et al. 2005) e 50% na Califórnia (Estados Unidos da América) (Fery e Dukes 2002) têm sido atribuídas à epidemias de murcha-de-esclerócio.

Devido a sua importância como patógeno cosmopolita e habitante do solo, torna-se indispensável para o manejo da doença o conhecimento da diversidade genética e da distribuição das populações de *S. rolf sii* em áreas infestadas. Compatibilidade micelial é um fenômeno comum em fungos filamentosos e tem sido uma ferramenta útil para avaliar indiretamente a diversidade genética intra-específica em populações de fungos fitopatogênicos (Kohn et al. 1991; Leslie 1993; Meijer et al. 1994; Milgroom e Cortesi 1999; Kausarud 2004; Kull et al. 2004; Wu e Subbarao 2006; Armengol et al. 2010; Ikeda et al. 2011; Baskarathevan et al. 2012; Bezerra et al. 2013). Os grupos de compatibilidade micelial (GCMs) desempenham um papel importante na definição de populações fúngicas de campo e facilitam o intercâmbio genético de espécies de fungos. Isto é particularmente relevante para fungos cuja reprodução sexual tem um impacto mínimo sobre o ciclo da doença (Kohn et al. 1991; Leslie 1993), pois os GCMs ajudam a preservar a identidade genética dos micélios distintos e restringem as trocas citoplasmáticas, de material genético e elementos extracromossômicos (Caten 1972).

Estudos de GCMs têm demonstrado haver compatibilidade micelial entre isolados de *S. rolf sii* (Punja e Grogan 1983), e com frequência são usados para avaliar a diversidade genética entre populações desse fungo (Punja e Grogan 1983; Harlton et al. 1995; Nalim et al. 1995; Cilliers et al. 2000, 2002; Okabe e Matsumoto 2000; Almeida et al. 2001; Punja e Sun 2001; Sarma et al. 2002; Adandonon et al. 2005; Flores-Moctezuma et al. 2008; Le et al. 2012; Remesal et al. 2012, 2013). A literatura sugere que um GCM de *S. rolf sii* pode estar associado tanto à planta hospedeira quanto à área geográfica da qual foi obtido o isolado, mas também um único GCM pode compreender isolados de diversas hospedeiras e origens geográficas. A diversidade na compatibilidade micelial entre populações de *S. rolf sii* que ocorrem em determinadas regiões geográficas ou culturas específicas, também foi demonstrada. Estudos realizados na África do Sul (Cilliers et al. 2002), no Brasil (Almeida et al. 2001), na Espanha (Remesal et al. 2012), na Índia (Sarma et al. 2002) e no México (Flores-Moctezuma et al. 2008) indicaram existir uma considerável diversidade genética entre isolados de *S. rolf sii* de várias hospedeiras ou localidades, sem uma correlação clara entre o GCM a que pertenciam, a hospedeira ou a origem geográfica (Almeida et al. 2001; Sarma et al. 2002; Flores-Moctezuma et al. 2008; Remesal et al. 2012), apesar de haver uma certa relação entre os GCMs e as hospedeiras de origem dos isolados de populações na África do Sul (Cilliers et al. 2002). Além disso, em amendoim foi relatada uma grande diversidade de GCMs dentro de um único campo no Texas (EUA) (Nalim et al. 1995), no Japão (Okabe e Matsumoto 2000) e no Vietnã (Le et al. 2012).

O controle da murcha-de-esclerócio em feijão-caupi e feijão-comum é muito difícil, pois *S. rolf sii* possui elevada agressividade, combinado com grande habilidade de competição saprofítica, capacidade de sobrevivência no solo por vários anos e ampla gama de hospedeiros (Aycock 1966; Punja 1985, 1988). Além disso, não existem cultivares comerciais dessas leguminosas com níveis aceitáveis de resistência à doença e o controle químico é ineficiente, inviável economicamente e de elevado impacto ambiental (Athayde Sobrinho et al. 2005; Schwartz et al. 2005).

O conhecimento sobre a diversidade genética e a virulência em populações locais de *S. rolf sii* associadas a diferentes culturas é um componente chave para o manejo da murcha-de-esclerócio. Além disso, o conhecimento da gama de hospedeiras de populações de *S. rolf sii* presentes numa determinada área é essencial para a recomendação de culturas adequadas como alternativas aos cultivos principais (Remesal et al. 2012).

Apesar da importância dos cultivos de feijão-caupi e feijão-comum para a região Agreste do estado de Pernambuco e da importância crescente da murcha-de-esclerócio, não existem informações sobre a diversidade genética e patogênica em populações de *S. rolf sii* associadas a essas leguminosas. Diante disso, os objetivos desse trabalho foram: (i) caracterizar os GCMs de *S. rolf sii* nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste de Pernambuco; (ii) determinar a prevalência e a diversidade de GCMs de *S. rolf sii* nas áreas cultivadas; e (iii) investigar a relação entre os GCMs de *S. rolf sii* e sua patogenicidade e virulência a seis importantes espécies de plantas.

Materiais e métodos

Obtenção dos isolados fúngicos

No ano de 2010, a incidência da murcha-de-esclerócio foi monitorada nos quatro principais municípios produtores de feijão-caupi e feijão-comum da região Agreste de Pernambuco (Garanhuns, Jupi, Lajedo e São João). Para determinar a diversidade de *S. rolf sii*, foram amostradas 13 áreas de cultivo de feijão-caupi e 11 áreas de feijão-comum, sendo coletadas no mínimo 5 plantas com sintomas em cada área.

Para o isolamento de *S. rolf sii*, tecidos das plantas com sintomas e esclerócios foram desinfestados em solução de etanol a 70% por 2 min, transferidos para papel de filtro em placa de Petri e incubados a 25°C no escuro por 2 a 3 dias. O micélio oriundo foi transferido

para placas contendo o meio batata-dextrose-ágar - BDA (Acumedia, Lansing, MI, EUA) suplementado com sulfato de estreptomicina ($0,5 \text{ g l}^{-1}$). De cada amostra, uma ponta de hifa foi transferida para placa com BDA para purificação dos isolados fúngicos. Os isolados foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil). As culturas estoque foram mantidas como esclerócios secos. Para isso, as culturas puras foram incubadas a 25°C sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro) para formação de abundante quantidade de esclerócios. Depois de 30 dias, os esclerócios foram coletados das culturas secas, transferidos para tubos criogênicos esterilizados (2 ml) e armazenados à temperatura ambiente.

Determinação dos grupos de compatibilidade micelial

Um esclerócio de cada isolado de *S. rolf sii* foi transferido para placa contendo BDA e incubado a 25°C no escuro por 5 dias. Depois, discos de micélio (5 mm de diâmetro) retirados das margens das colônias foram pareados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de Patterson modificado - MPM (Remesal e Navas-Cortés 2012). Três isolados foram pareados em cada placa pela colocação dos discos distanciados de 50 mm. Todos os isolados foram pareados consigo mesmos para confirmar a auto-compatibilidade. Foram utilizadas quatro repetições por pareamento. As culturas foram incubadas a 28°C no escuro. Os pareamentos foram examinados visualmente após 10 dias de incubação, para verificação da presença de uma zona de aversão (antagonismo) na região do contato micelial (Punja e Grogan 1983), caracterizada pela presença de uma linha de coloração rósea na região de reação entre as colônias (Remesal e Navas-Cortés 2012). As reações foram consideradas compatíveis quando não foi constatada uma linha de coloração rósea na região da interação entre as colônias, indicando a ocorrência de completa fusão entre colônias distintas (Remesal et al. 2012). Os GCMs foram identificados com base nas reações de compatibilidade entre os isolados testados. Devido ao elevado número de isolados de *S. rolf sii* e à dificuldade para fazer os pareamentos em todas as possíveis combinações, os GCMs foram definidos inicialmente ao nível de área, pelo pareamento de todos os isolados de uma área em todas as combinações possíveis. Depois, um isolado testador foi arbitrariamente selecionado de cada um dos GCMs identificados para mais análises. Isolados testadores representativos de todos os GCMs identificados em cada área foram pareados em todas as combinações possíveis. Todos os pareamentos foram repetidos uma vez.

Distribuição e diversidade dos grupos de compatibilidade micelial

Baseado no número de MGGs constatados foi comparada a diversidade destes em relação aos hospedeiros de origem (feijão-caupi e feijão-comum) e locais (Garanhuns, Jupi, Lajedo e São João). Foi calculada a frequência relativa de cada GCM em relação ao total de GCMs e o total de número de GCMs dentro de hospedeiros e locais. A riqueza de GCMs foi estimada pelo índice H' de Shannon-Wiener, $H' = \sum_j (p_j \ln p_j)$, $j = 1 \dots N_p$, onde N_p é o número de GCMs identificados entre os isolados, e p_j é a proporção de indivíduos nos j^{th} GCMs. Os valores de H' aumentam com o incremento no número de GCMs na amostra e reduzem quando um ou poucos GCMs dominam a amostra. A equidade de GCMs foi estimada pelo índice J de Pielou, $J = H' / \ln N_i$, onde N_i representa o número de indivíduos na amostra. Valor de $J = 1$ indica que os GCMs estão distribuídos igualmente (regularmente) na amostra, enquanto $J = 0$ indica completa desigualdade (irregularidade) na distribuição dos GCMs. A dominância de GCMs foi estimada pelo índice D de Simpson, $D = \sum n_i (n_i - 1) / N_i (N_i - 1)$. Valores maiores de D indicam maior dominância de determinados GCMs e menor a riqueza (diversidade). Para quantificar o grau de sobreposição entre os GCMs nas populações, uma medida de similaridade entre os pares de amostras foi calculada pelo índice JJ de Jaccard, $JJ = a / (a+b+c)$, onde a representa o número de GCMs ocorrendo em ambas as amostras, b representa o número de GCMs restritos à amostra 1 e c representa o número de GCMs restritos à amostra 2. Valores de JJ variam de 0 (nenhum GCM compartilhado) a 1 (todos os GCMs compartilhados) (Krebs 1999).

Diversidade patogênica

A patogenicidade e a virulência dos 169 isolados de *S. rolfsii* foram determinadas em seis espécies de plantas cultivadas de quatro famílias botânicas, incluindo Asteraceae: girassol (*Helianthus annuus* L., cv. Helio 253); Fabaceae: feijão-caupi (cv. IPA 206), feijão-comum (cv. IPA 10) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill, cv. BMX Força RR); Malvaceae: algodão (*Gossypium hirsutum* L., cv. BRS Aroeira) e Pedaliaceae: gergelim (*Sesamum indicum* L. cv. BRS Seda). As sementes foram obtidas de empresas de comercialização de produtos agrícolas. Estas espécies foram selecionadas como representantes da gama de hospedeiros do patógeno, bem como de espécies dicotiledôneas que poderiam ser uma alternativa para rotação de cultura com feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco.

O inóculo de *S. rolfsii* consistiu de esclerócios coletados de culturas secas com 30 dias de idade, como descrito anteriormente. As sementes utilizadas apresentavam no mínimo 95% de germinação e, antes do plantio, foram desinfestadas em solução de NaOCl 1% por 2 min e colocadas para secar ao ar durante 45 min. Em seguida, foram semeadas em bandejas de polipropileno de 128 alvéolos (covas) contendo uma mistura de solo + esterco de curral (5:1, v/v) esterilizada em autoclave (121°C, 1 h, 2 dias consecutivos). A inoculação foi efetuada pela deposição de dois esclerócios sobre o tegumento de cada semente e cobertura da mesma com a mistura de solo + esterco de curral. Cada espécie de planta foi inoculada separadamente e nas testemunhas não foram efetuadas deposições de esclerócios sobre as sementes. Para cada espécie de planta, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por isolado, sendo cada repetição constituída por 18 covas de plantio, contendo uma semente por cova. As bandejas com as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 28±4°C e umidade do ar de 81±10%. As plantas foram irrigadas diariamente para manter a capacidade de campo. Aos 12 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao aparecimento e severidade dos sintomas de murcha-de-esclerócio. Foi considerado patogênico o isolado que induziu qualquer sintoma da doença, quando comparado à testemunha não inoculada. A severidade da doença foi avaliada com o auxílio de uma escala descritiva de notas de 0 a 4, onde 0 = sem sintomas, 1 = planta com podridão, 2 = planta murcha, 3 = planta morta e 4 = planta com tombamento em pré-emergência ou semente não germinada. Com os dados da avaliação foi calculado o índice de severidade da murcha-de-esclerócio em cada repetição, pela expressão: $SEV = [\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$ (McKinney 1923).

Em cada espécie de planta, todo o experimento foi repetido uma vez. As análises preliminares dos tratamentos indicaram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os experimentos, motivo pelo qual os dados dos dois experimentos foram agrupados para as análises. Os valores de severidade foram utilizados para comparar a virulência dos GCMs às diferentes espécies de plantas, bem como entre os isolados dentro dos três GCMs mais prevalentes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SAEG 9.0 (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil).

Visando identificar grupos funcionais de GCMs baseados na virulência às espécies de plantas, bem como de espécies vegetais baseados na suscetibilidade aos GCMs (Remesal et al. 2012), foram realizadas análises multivariadas de agrupamento hierárquico pelo método da

média não-ponderada (UPGMA), com o auxílio do programa STATISCA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Resultados

Grupos de compatibilidade micelial

Foram obtidos 169 isolados de *S. rolf sii* das áreas de cultivo de feijão-caupi e feijão-comum da região Agreste de Pernambuco. Foram identificados 17 GCMs entre os isolados e designados em números romanos de I to XVII. Os GCMs dos isolados e suas localizações geográficas (municípios onde foram coletados) são mostrados na Tabela 1. A compatibilidade micelial entre os isolados de um GCM foi caracterizada pelo crescimento micelial intermitente na zona de interação sem a ocorrência de aversão, enquanto que isolados designados a diferentes GCMs demonstraram aversão na zona de interação, juntamente com a formação de uma linha de reação rósea. Todos os 169 isolados foram auto-compatíveis, demonstrando uma reação similar à descrita para isolados compatíveis. Experimentos replicados e pareamentos repetidos dentro de cada experimento produziram resultados idênticos.

A distribuição e a prevalência dos 17 GCMs diferiram entre as áreas e os municípios amostrados (Tabelas 1 e 2). O GCM II foi o mais prevalente e abundante, representando 33,1% dos isolados de *S. rolf sii* e sendo detectado em 13 das 24 áreas amostradas. Os GCMs VIII e X representaram 24,3% e 17,2% dos isolados, respectivamente. Os GCMs VI, VII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV e XVII foram identificados em somente uma área cada um. Os seis GCMs restantes representaram 21,3% dos isolados, com destaque para o GCM I, que representou 8,9% dos isolados (Tabela 2).

Com relação às localidades (municípios) de amostragem, foram identificados quatro, cinco, sete e 15 GCMs em Garanhuns, Jupi, Lajedo e São João, respectivamente. Em relação às hospedeiras de origem, foram constatados 11 GCMs em feijão-caupi e 13 GCMs em feijão-comum (Tabela 1). Não houve tendência de formação de GCMs por município ou hospedeira de origem, pois a distribuição e a frequência dos GCMs mostraram-se heterogêneas em relação aos municípios e às hospedeiras de origem. Como exemplo, nos GCMs II, VIII e X foram agrupados isolados provenientes dos quatro municípios estudados. Algumas áreas de coleta dentro dos municípios apresentaram grande diversidade de GCMs, como as áreas SJ-2

e SJ-3 do município de São João, onde foram identificados sete e oito GCMs entre 18 e 21 isolados amostrados, respectivamente. Situação similar foi observada na área SJ-5, em que foram constatados 5 GCM em apenas 7 isolados amostrados. Por outro lado, algumas áreas com um número considerável de isolados apresentaram elevada uniformidade em relação à ocorrência dos GCMs, como constatado em Lajedo nas áreas LA-6, LA-7 e LA-8, em que os 13 isolados da primeira e os 15 isolados da segunda foram agrupados no GCM II, e os 12 isolados da terceira no GCM X (Tabela 2).

A diversidade dos isolados de *S. rolfsii* em relação aos hospedeiros de origem e aos municípios de coleta foi estimada considerando a riqueza, a equidade e a dominância dos GCMs. Não foram constatadas diferenças entre as hospedeiras de origem (feijão-caupi e feijão-comum) quanto à diversidade de GCMs. Por outro lado, foram constatadas diferenças entre os municípios quanto aos níveis de riqueza, equidade e dominância dos GCMs (Tabela 3). Os dados obtidos pelo índice H' indicaram uma variação quanto à riqueza de GCMs nas localidades estudadas. O município de São João apresentou a maior riqueza ($H' = 2,20$), no qual foram detectados 15 GCMs em uma amostra de 68 isolados de *S. rolfsii*, enquanto o município de Lajedo apresentou a menor riqueza ($H' = 1,00$), tendo sido constatados sete GCMs em uma amostra de 73 isolados. A equidade, estimada pelo índice J , demonstrou que em Lajedo há grande desigualdade na distribuição dos GCMs ($J = 0,23$), no qual 68 isolados foram agrupados em apenas dois GCMs (II e X), e os demais cinco isolados constituíram GCMs distintos. A maior equidade foi registrada no município de Garanhuns ($J = 0,66$), onde foram constatados quatro GCMs em uma população de sete isolados de *S. rolfsii*. No município de Lajedo ficou evidente a dominância de poucos GCMs na população de isolados de *S. rolfsii* ($D = 0,44$), ao contrário do observado nas populações de São João ($D = 0,14$), Garanhuns ($D = 0,19$) e Jupi ($D = 0,21$), onde os números de GCM constatados foram elevados quando considerados os tamanhos das populações.

O índice de Jaccard (JI) revelou o nível de sobreposição dos GCMs entre os municípios amostrados, ou seja, quantos GCMs estiveram presentes em mais de um município de forma concomitante (Tabela 4). Os resultados demonstraram um baixo nível de sobreposição de GCMs entre Garanhuns e São João ($JI = 0,25$), enquanto os municípios de Garanhuns e Jupi apresentaram o nível de sobreposição mais elevado ($JI = 0,50$). As demais combinações dos municípios apresentaram valores intermediários de sobreposição de GCMs, variando de 0,31 a 0,38.

Diversidade patogênica

Reações de suscetibilidade aos isolados de *S. rolfsii* nas seis espécies de plantas inoculadas (feijão-caupi, feijão-comum, algodão, gergelim, girassol e soja) incluíram sintomas de tombamento de pré-emergência, podridão do colo, amarelecimento e murcha das folhas, colapso e morte das plantas. Não foram observados sintomas nas plantas testemunhas não inoculadas com *S. rolfsii*. Quatro das seis espécies de plantas testadas (feijão-caupi, feijão-comum, girassol e soja) foram infectadas por todos os isolados dos 17 GCMs. Nem todos os isolados pertencentes aos GCMs I, II, III, IV, VII, VIII e X foram patogênicos a algodão. Os isolados dos GCMs XI e XIII não foram patogênicos a gergelim, bem como alguns isolados pertencentes aos GCMs II, IV e X (Tabela 5).

Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os GCMs quanto aos níveis de virulência a todas as espécies de plantas inoculadas (Fig. 1). Quando inoculados em feijão-caupi, a virulência dos GCMs variou de 7,0% a 70,8%, com média de 36,1%. Os GCMs I, V, IX e XII foram os mais virulentos a feijão-caupi, enquanto os GCMs VI e XIII foram os menos virulentos III foram os mais virulentos a feijão-comum, enquanto os GCMs VI e XI foram os menos virulentos. Em algodão, a virulência dos GCMs foi bem inferior à observada nas demais espécies de plantas, variando de 0,0% a 12,5%. O GCM VI foi o mais virulento a algodão, enquanto os GCMs XI e XIII foram os menos virulentos, não induzindo sintomas da doença. Em gergelim, a virulência dos GCMs variou de 0,0% a 77,8%. O GCM VI foi o mais virulento a gergelim, enquanto os GCMs XI e XIII foram os menos virulentos, não induzindo sintomas da doença. A virulência dos GCMs variou de 13,0% a 79,3% em girassol e de 14,8% a 78,3% em soja. O GCM IX foi o mais virulento a essas duas hospedeiras, enquanto os GCMs XI, XII, XIII, XIV e XVI foram os menos virulentos (Fig. 1).

Grupos funcionais de GCMs baseados na virulência às espécies de plantas foram identificados usando análise multivariada de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA. Seis grupos funcionais de GCMs ficaram evidentes entre os 17, incluindo: grupo 1 (GCMs I, II, III, V, VII e XIII), grupo 2 (GCMs IV, VII, X, XIV e XVII), grupo 3 (XI, XIII e XVI), grupo 4 (GCM XV), grupo 5 (GCM XVI) e grupo 6 (GCM IX) (Fig. 2). Quando a análise de agrupamento foi aplicada às espécies de plantas, foram identificados cinco grupos funcionais de suscetibilidade, incluindo: grupo 1 (feijão-caupi), grupo 2 (girassol e soja), grupo 3 (gergelim), grupo 4 (feijão-comum) e grupo 5 (algodão) (Fig. 3).

Discussão

A caracterização genética e patogênica de isolados de *S. rolfsii* de diferentes áreas de cultivo em nível regional pode propiciar conhecimentos sobre a epidemiologia e o manejo das doenças que eles causam. A estrutura das populações de *S. rolfsii* obtidas de feijão-caupi e feijão-comum cultivados na região Agreste de Pernambuco foram caracterizadas pela análise de grupos de compatibilidade micelial (GCM) e virulência a seis espécies de plantas economicamente importantes, constituindo o primeiro relato dessa natureza realizado na América Latina. Foram identificados 17 GCMs entre 169 isolados de *S. rolfsii*, o que pode ser considerado um número elevado quando comparado aos resultados obtidos por outros autores (Punja e Grogan 1983; Adandonon et al. 2005; Remesal et al. 2012). A detecção de diferentes GCMs indica a existência de populações geneticamente isoladas (Leslie 1993; Begueret et al. 1994) e o número elevado de GCMs detectados reflete a ampla diversidade genética nas populações de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum do Agreste de Pernambuco. A existência de considerável diversidade genética entre isolados de *S. rolfsii* também foi reportada em outro levantamento realizado no Brasil, em que 13 grupos de compatibilidade foram identificados em 30 isolados de 14 diferentes estados e 11 plantas hospedeiras (Almeida et al. 2001). O elevado número de GCMs constatados no presente estudo pode indicar que a introdução de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas foi antiga (Harlton et al. 1995), o que parece ser coerente com a situação no Agreste de Pernambuco, em que algumas áreas são cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum em sucessão há mais de 25 anos. Outra possível explicação para o elevado número de GCMs verificado é que, além da reprodução clonal típica de *S. rolfsii*, ocorra reprodução sexuada com trocas de informação genética entre os isolados, como especulado por Adandonon et al. (2005) em uma abordagem sobre a diversidade genética entre isolados de *S. rolfsii* do Benin e da África do Sul. Em se tratando de um fungo com forma sexual conhecida (*A. rolfsii*), os resultados obtidos são esperados, muito embora, a literatura especializada relate apenas a fase assexuada do fungo em condições de campo (Aycock 1966; Punja 1985, 1988).

A elevada prevalência e abundância do GCM II sugerem que este foi extensivamente disseminado dentro e entre as áreas cultivadas do Agreste de Pernambuco por práticas culturais, como destacado em outros estudos com *S. rolfsii* (Harlton et al. 1995; Remesal et al. 2012). Alguns GCM foram menos prevalentes, mas presentes em várias áreas de cultivo (GCMs I, III e IV), enquanto outros foram restritos a áreas específicas (GCMs VII, XIV e

XVI). Carlile (1986) sugeriu que um único GCM pode predominar em uma área se o isolado fúngico colonizou uma nova área e depois disseminou vegetativamente. Portanto, um reduzido número de GCMs em uma área sugere que a espécie foi introduzida recentemente (Harlton et al. 1995). Além disso, a ocorrência de um único GCM em uma área pode ser um indicativo de que os clones se tornaram adaptados às condições microclimáticas ou hospedeiras específicas, e são menos suscetíveis a serem resultantes de trocas genéticas e recombinação (Ben-Yephet e Bitton 1985; Hambleton et al. 2002). Alguns GCMs detectados nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum foram constituídos de somente um membro (GCMs VI, IX, XI, XII, XIII, XV e XVII), o que tem sido reportada com frequência em diferentes áreas geográficas e/ou hospedeiras de origem em levantamentos de diversidade de *S. rolfsii* (Punja e Grogan 1983; Harlton et al. 1995; Nalim et al. 1995; Cilliers et al. 2000; Okabe e Matsumoto 2000; Almeida et al. 2001; Punja e Sun, 2001; Sarma et al. 2002; Remesal et al. 2012).

O fato de isolados de *S. rolfsii* originários da mesma área (com exemplo, das áreas SJ-2 e SJ-3) terem sido alocados em diferentes GCMs sugere a ocorrência de diferenças genéticas dentro das subpopulações, o que indicaria que nas distintas subpopulações são resultantes de múltiplas introduções de isolados procedentes de diferentes zonas infestadas que se estabelecem em forma de novos GCMs (Cilliers et al., 2000; Nalim et al., 1995; Punja, 1985). Este fato tem sido atribuído em menor grau ao papel dos basidiospósporos na dispersão do patógeno (Harlton et al., 1995; Punja, 1988; Punja e Grogan, 1983).

A diversidade dos isolados de *S. rolfsii* em relação aos hospedeiros de origem e aos municípios de coleta foi estimada considerando a riqueza, a equidade e a dominância dos GCMs. A baixa diversidade entre os GCMs quando consideradas as hospedeiras de origem era esperada, uma vez que feijão-caupi e feijão-comum são cultivados em sucessão nas mesmas áreas, o que não propicia uma condição favorável a qualquer tipo de especialização por hospedeira e, por conseguinte, a elevação da diversidade. Por outro lado, ficou evidente a diversidade de GCMs quando considerados os municípios de coleta das amostras. A maior riqueza de GCMs em São João pode estar relacionada com a exploração mais intensiva de algumas áreas, nas quais feijão-caupi e feijão-comum são cultivados há mais de 25 anos. Por outro lado, em Lajedo ficou evidente a menor riqueza, baixa equidade e elevada dominância de GCMs, o que pode ser decorrente dos cultivos dessas leguminosas serem realizados há menos de 10 anos nas áreas e a introdução de *S. rolfsii* ter ocorrido mais recentemente quando comparada com São João e outros municípios. No município de Garanhuns, cujo número de isolados amostrados foi menor que nos três demais municípios, foi observada maior equidade

na distribuição dos GCMs, contrariando a hipótese de que quanto menor amostra, menor seria a diversidade (Odum 1988). Em relação à sobreposição dos GCMs entre os municípios amostrados, o baixo nível de sobreposição entre Garanhuns e São João pode ser devido à relativa distância geográfica (18 km) entre ambas as localidades. No entanto, essa hipótese não se aplica à elevada sobreposição constatada entre os municípios de Garanhuns e Jupi, que, apesar da distância geográfica (25 km), apresentaram alto índice de sobreposição de GCMs. Neste caso, o uso compartilhado de máquinas agrícolas, que constitui uma prática comum na região, pode ter promovido um intercâmbio de material genético entre essas áreas.

Os resultados demonstraram elevada diversidade patogênica entre os GCMs de *S. rolfsii*, bem como no grau de suscetibilidade de algumas espécies de plantas testadas. No geral, o GCM IX pode ser considerado o mais virulento entre os 17 GCMs constatados, pois induziu elevados níveis de doença em quatro (feijão-caupi, gergelim, girassol e soja) das seis espécies de plantas avaliadas. Por outro lado, os GCMs XI e XIII podem ser considerados os menos virulentos, pois não foram patogênicos a algodão e gergelim, bem como apresentaram virulência reduzida a feijão-caupi, feijão-comum e girassol quando comparados a outros GCMs. Entre as espécies de plantas, somente algodão apresentou baixa suscetibilidade aos GCMs de *S. rolfsii*, enquanto as demais espécies foram altamente suscetíveis à maioria dos GCMs. Girassol e soja apresentaram comportamento muito similar de suscetibilidade em relação aos diferentes GCMs, o que não foi observado entre feijão-caupi e feijão-comum. A elevada suscetibilidade de girassol a diferentes GCMs de *S. rolfsii* foi previamente descrita quando isolados obtidos de beterraba-açucareira foram inoculados nessa oleaginosa, por outro lado, algodão apresentou suscetibilidade moderada no mesmo estudo (Remesal et al. 2012).

Os resultados dessa pesquisa têm importantes implicações para o manejo da murcha-de-esclerócio do feijão-caupi e do feijão-comum na região Agreste do estado de Pernambuco, particularmente em relação à rotação de culturas e escolha de cultivos apropriados para uso em solos infestados previamente cultivados com essas leguminosas. Rotações de culturas são fundamentais para manter a produtividade das culturas e reduzir o inóculo de fitopatógenos habitantes do solo, os quais causam grandes perdas nos cultivos explorados em anos consecutivos (Palti 1981). Em geral, o grau de controle é baseado no nível de suscetibilidade ou resistência dos cultivos envolvidos e na sequência dos cultivos. Os reduzidos níveis de doença induzidos em algodão pelos isolados de vários GCMs indicam que essa cultura pode ser utilizada num sistema de rotação de culturas com feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco. No entanto, a ocorrência de diferentes GCMs dentro de uma mesma área cultivada, diferindo em patogenicidade e virulência, alerta para o cuidado da rotação de

culturas com algodão não ser utilizada como uma medida isolada de controle. Outro aspecto relevante é que os resultados obtidos nesse estudo permitem avaliar os riscos de ocorrência de epidemias graves de murcha-de-esclerócio em feijão-caupi e feijão-comum com base no monitoramento dos GCMs prevalentes nas áreas destinadas ao cultivo.

Referências

Adandonon, A., Aveling, T. A. S., Merwe, N. A., & Sanders, G. (2005). Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. *Australasian Plant Pathology*, 34, 19–25.

Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., & Yorinori, J. T. (2001). Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology*, 149, 493–502.

Armengol, J., Vicent, A., León, M., Berbegal, M., Abad-Campos, P., & García-Jiménez, J. (2010). Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Pathology*, 59, 179–185.

Athayde Sobrinho, C., Viana, F. M. P., & Santos, A. A. (2005). Doenças fúngicas e bacterianas. In F. R. Freire Filho, J. A. A. Lima & V. Q. Ribeiro (Eds.), *Feijão-caupi: avanços tecnológicos* (pp. 461–484). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Aycock, R. (1966). *Stem rot and other diseases caused by Sclerotium rolfsii or the status of Rolf's fungus after 70 years - Technical Bulletin No. 174*. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station.

Baskarathevan, J., Jaspers, M. V., Jones, E. E., Cruickshank, R. H., & Ridgway, H. J. (2012). Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. *Fungal Biology*, 116, 276–288.

Begueret, J., Turcq, B., Clave, C. (1994). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. *Trends in Genetics*, 10, 441–446.

Ben-Yephet, Y., & Bitton, S. (1985). Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica*, 13, 33–40.

Bezerra, C. S., Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Sales Júnior, R., Armengol, J., & Michereff, S.J. (2013). Population structure of *Monosporascus cannonballus* isolated from melons produced in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35, 161–167.

Carlile, M. J. (1986). Genetic exchange and gene flow: their promotion and prevention. In D. M. Rayner, C. M. Brasier & D. Moore (Eds.), *Evolutionary Biology of the Fungi* (pp. 203–214). New York: Cambridge University Press.

Caten, C. E. (1972). Vegetative compatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology*, 72, 221–229.

Cilliers, A. J., Herselman, L., & Pretorius, Z. A. (2000). Genetic variability within and among mycelia compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology*, 90, 1026–1031.

Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., & Van Wyk, P. S. (2002). Mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *South African Journal of Botany*, 68, 389–392.

Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2014). Fungal databases: fungus-host distributions. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, 2014. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>. Acessado 20 Janeiro 2014.

Fery, R., & Dukes, P. D. (2002). Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. *Crop Protection*, 21, 403–408.

- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Rogel-Hernandez, M. A., & Martinez-Romero, M. E. (2008). Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, 7–14.
- Hambleton, S., Walker, C., & Kohn, L. M. (2002). Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 309–15.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., & Punja, Z. K. (1995). Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology*, 85, 1269–1281.
- Ikeda, K., Inoue, K., Nakamura, H., Hamanaka, T., Ohta, T., Kitazawa, O., Kida, C., Kanematsu, S., & Park, P. (2011). Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, 115, 80–86.
- Kausserud, H. (2004). Widespread vegetative compatibility groups in the dry-rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycologia*, 96, 232–239.
- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., & Anderson, J. B. (1991). Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 81, 480–485.
- Krebs, C. J. (1999). *Ecological methodology*. 2nd ed. Menlo Park: Benjamin Cummings.
- Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D., & Hartman, G. L. (2004). Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 88, 325–32.
- Le, C. N., Mendes, R., Kruijt, M., & Raaijmakers, J. M. (2012). Genetic and phenotypic diversity of *Sclerotium rolfsii* in groundnut fields in central Vietnam. *Plant Disease*, 96, 389–397.
- Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127–150.

- McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195–218.
- Meijer, G., Megnegneau, B. & Linden, E. G. A. (1994). Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycological Research*, 98, 267–276.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proceedings of the National Academy Science of USA*, 96, 10518–10523.
- Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., & Keller, N. P. (1995). Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 85, 1507–1512.
- Odum, E. P. (1988). *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Okabe, I., & Matsumoto, N. (2000). Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Mycoscience*, 41, 145–148.
- Palti, J. (1981). *Cultural practices and infectious crop diseases*. Berlin: Springer-Verlag.
- Plano Territorial de Rede Produtiva (2012). *Rede territorial produtiva do feijão - Agreste Meridional e Central*. Recife: Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária/ProRural.
- Punja, Z. K. (1985). The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 97–127.
- Punja, Z. K. (1988). *Sclerotium (Athelia) rolfsii* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology*, 6, 523–534.
- Punja, Z. K., & Grogan, R. G. (1983). Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology*, 73, 1279–1284.

- Punja, Z. K., & Sun, L. J. (2001). Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *Sclerotium delphinii*. *Mycological Research*, *105*, 537–546.
- Remesal, E., Jordán-Ramírez, R., Jiménez-Díaz, R. M., & Navas-Cortés, J. A. (2012). Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. *Plant Pathology*, *61*, 739–753.
- Remesal, E., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M., & Navs-Cotés, J. A. (2013). Sequence variation in two protein-coding genes correlates with mycelial compatibility groupings in *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, *103*, 479–487.
- Remesal, E., & Navas-Cortés, J. A. (2012). An improved growth medium to assess mycelial compatibility groups in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology*, *160*, 237–242.
- Sarma, B. K., Singh, U. P., & Singh, K. P. (2002). Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Mycologia*, *94*, 1051–1058.
- Schwartz, H. F., Steadman, J. R., Hall, R., & Forster, R. L. (2005). *Compendium of bean diseases*. St. Paul: APS Press.
- Wu, B. M., & Subbarao, K. V. (2006). Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology*, *96*, 1322–1329.

Tabela 1 Informações sobre as áreas de coleta dos isolados de *Sclerotium rolfsii* na região Agreste de Pernambuco e utilizados na determinação dos grupos de compatibilidade micelial (GCMs)

Código da área	Número de isolados	Local	Hospedeira	GCM (número de isolados)
GA-1	3	Garanhuns	feijão-caupi	X (3)
GA-2	3	Garanhuns	feijão-caupi	I (2), VIII (1)
GA-3	1	Garanhuns	feijão-comum	II (1)
JU-1	8	Jupi	feijão-caupi	II (1), VIII (4), X (3)
JU-2	2	Jupi	feijão-caupi	II (2)
JU-3	5	Jupi	feijão-caupi	I (3), X (2)
JU-4	6	Jupi	feijão-caupi	II (2), IV (1), VIII (3)
LA-1	3	Lajedo	feijão-comum	III (1), IX (1), X (1)
LA-2	2	Lajedo	feijão-comum	II (1), VIII (1)
LA-3	12	Lajedo	feijão-caupi	II (9), X (2), XVII (1)
LA-4	1	Lajedo	feijão-comum	IV (1)
LA-5	15	Lajedo	feijão-comum	II (1), X (14)
LA-6	13	Lajedo	feijão-caupi	II (13)
LA-7	15	Lajedo	feijão-comum	II (15)
LA-8	12	Lajedo	feijão-caupi	X (12)
SJ-1	9	São João	feijão-caupi	I (3), II (6)
SJ-2	18	São João	feijão-caupi	I (4), III (1), IV (2), V (2), VI (1), VII (7), VIII (1)
SJ-3	21	São João	feijão-comum	II (1), VIII (13), X (1), XI (1), XII (1), XIII (1), XIV (2), XVI (1)
SJ-4	4	São João	feijão-caupi	II (3), XVI (1)
SJ-5	7	São João	feijão-caupi	II (1), III (1), V (1), VIII (1), X (3)
SJ-6	1	São João	feijão-comum	I (1)
SJ-7	2	São João	feijão-comum	I (2)
SJ-8	1	São João	feijão-comum	XV (1)
SJ-9	5	São João	feijão-comum	VIII (5)

Tabela 2 Grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de áreas de cultivo de feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste de Pernambuco

GCM	Isolados		Área de cultivo (número de isolados)
	Número	Frequência (%)	
I	15	8,9	GA-2 (2), JU-3 (3), SJ-1 (3), SJ-2 (4), SJ-6 (1), SJ-7 (2)
II	56	33,1	GA-3 (1), JU-1 (1), JU-2 (2), JU-4 (2), LA-2 (1), LA-3 (9), LA-5 (1), LA-6 (13), LA-7 (15), SJ-1 (6), SJ-3 (1), SJ-4 (3), SJ-5 (1)
III	3	1,8	LA-1 (1), SJ-2 (1), SJ-5 (1)
IV	4	2,4	JU-4 (1), LA-4 (1), SJ-2 (2)
V	3	1,8	SJ-2 (2), SJ-5 (1)
VI	1	0,6	SJ-2 (1)
VII	7	4,1	SJ-2 (7)
VIII	29	17,2	GA-2 (1), JU-1 (4), JU-4 (3), LA-2 (1), SJ-2 (1), SJ-3 (13), SJ-5 (1), SJ-9 (5)
IX	1	0,6	LA-1 (1)
X	41	24,3	GA-1 (3), JU-1 (3), JU-3 (2), LA-1 (1), LA-3 (2), LA-5 (14), LA-8 (12), SJ-3 (1), SJ-5 (3)
XI	1	0,6	SJ-3 (1)
XII	1	0,6	SJ-3 (1)
XIII	1	0,6	SJ-3 (1)
XIV	2	1,2	SJ-3 (2)
XV	1	0,6	SJ-8 (1)
XVI	2	1,2	SJ-3 (1), SJ-4 (1)
XVII	1	0,6	LA-3 (1)

Tabela 3 Diversidade de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de isolados de *Sclerotium rolfsii* constatados no Agreste de Pernambuco em termos de riqueza (H'), equidade (J) e dominância (D) quando comparados diferentes hospedeiros de origem e localidades (municípios) de coleta das amostras

Comparações	NISOL ^a	NGCM ^b	H' ^c	J ^d	D ^e
Hospedeiros					
Feijão-caupi	102	11	1,80	0,41	0,21
Feijão-comum	67	13	1,80	0,43	0,21
Localidades					
Garanhuns	7	4	1,28	0,66	0,19
Jupi	21	5	1,47	0,48	0,21
Lajedo	73	7	1,00	0,23	0,44
São João	68	15	2,20	0,52	0,14

^a Número de isolados

^b Número de grupos de compatibilidade micelial (GCMs)

^c Índice de diversidade de Shannon-Wiener

^d Índice de equidade de Pielou

^e Índice de dominância de Simpson

Tabela 4 Índice de similaridade de Jaccard (*J_I*) calculado para os grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de isolados de *Sclerotium rolfsii* constatados em quatro municípios do Agreste de Pernambuco

Localidades	Garanhuns	Jupi	Lajedo	São João
Garanhuns	1,00			
Jupi	0,50	1,00		
Lajedo	0,38	0,38	1,00	
São João	0,25	0,33	0,31	1,00

Tabela 5 Frequência de isolados de *Sclerotium rolfii* pertencentes a 17 grupos de compatibilidade micelial (GCM) patogênicos a seis espécies de plantas

GCM	Espécies de Plantas / Isolados patogênicos (%)					
	Feijão-caupi	Feijão-comum	Algodão	Gergelim	Girassol	Soja
I	100	100	86,7	100	100	100
II	100	100	78,6	91,7	100	100
III	100	100	66,7	100	100	100
IV	100	100	75,0	50,0	100	100
V	100	100	100	100	100	100
VI	100	100	100	100	100	100
VII	100	100	71,4	100	100	100
VIII	100	100	69,0	100	100	100
IX	100	100	100	100	100	100
X	100	100	68,3	90,2	100	100
XI	100	100	100	0,0	100	100
XII	100	100	100	100	100	100
XIII	100	100	100	0,0	100	100
XIV	100	100	100	100	100	100
XV	100	100	100	100	100	100
XVI	100	100	100	100	100	100
XVII	100	100	100	100	100	100

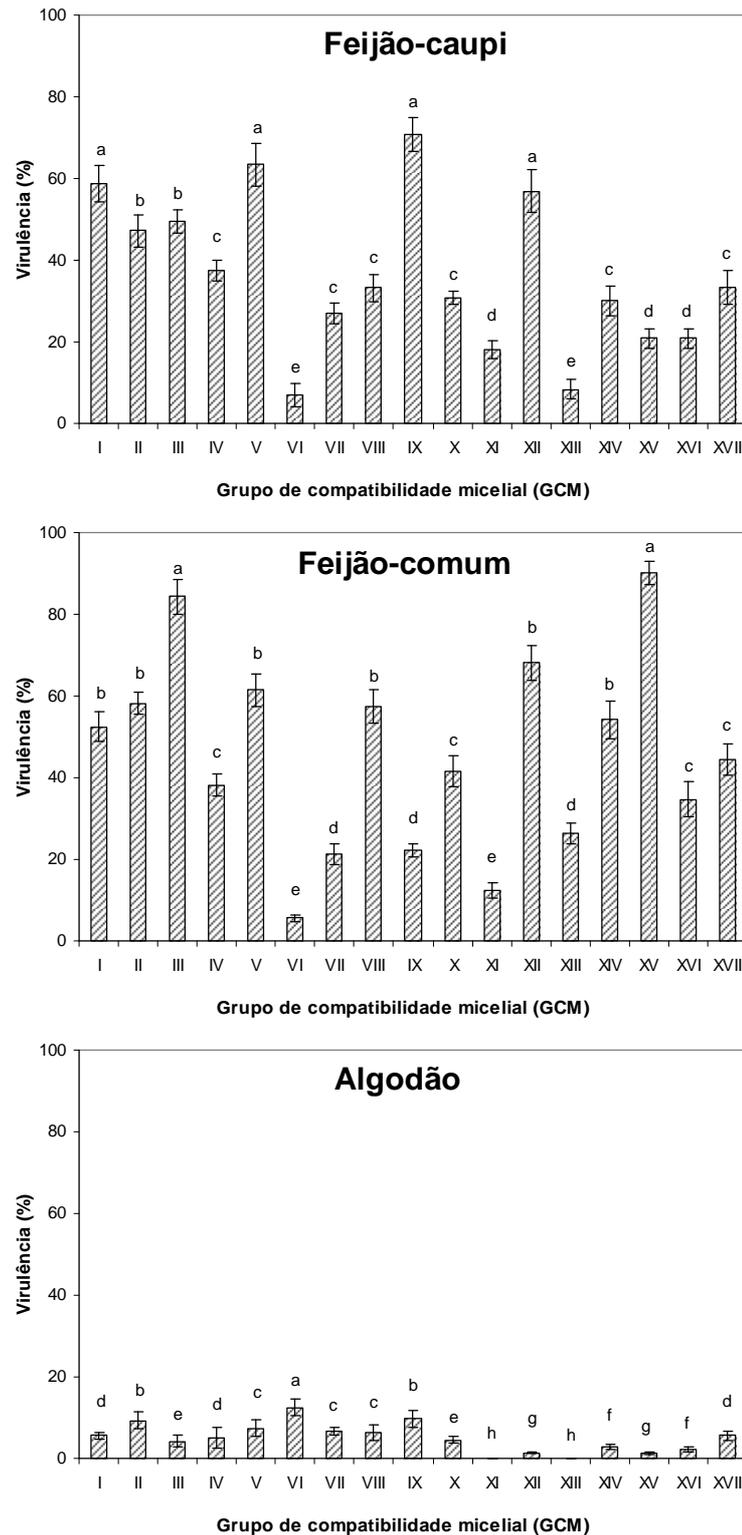


Fig. 1 Virulência de 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de *Sclerotium rolsii* a seis espécies de plantas (feijão-caupi, feijão-comum, algodão, gergelim, girassol e soja), mensurada pela inoculação de todos os isolados de cada GCM e avaliação da severidade da doença induzida. Barras nas extremidades das colunas indicam o erro padrão da média. Colunas com o mesmo intervalo de letras não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P=0,05$)

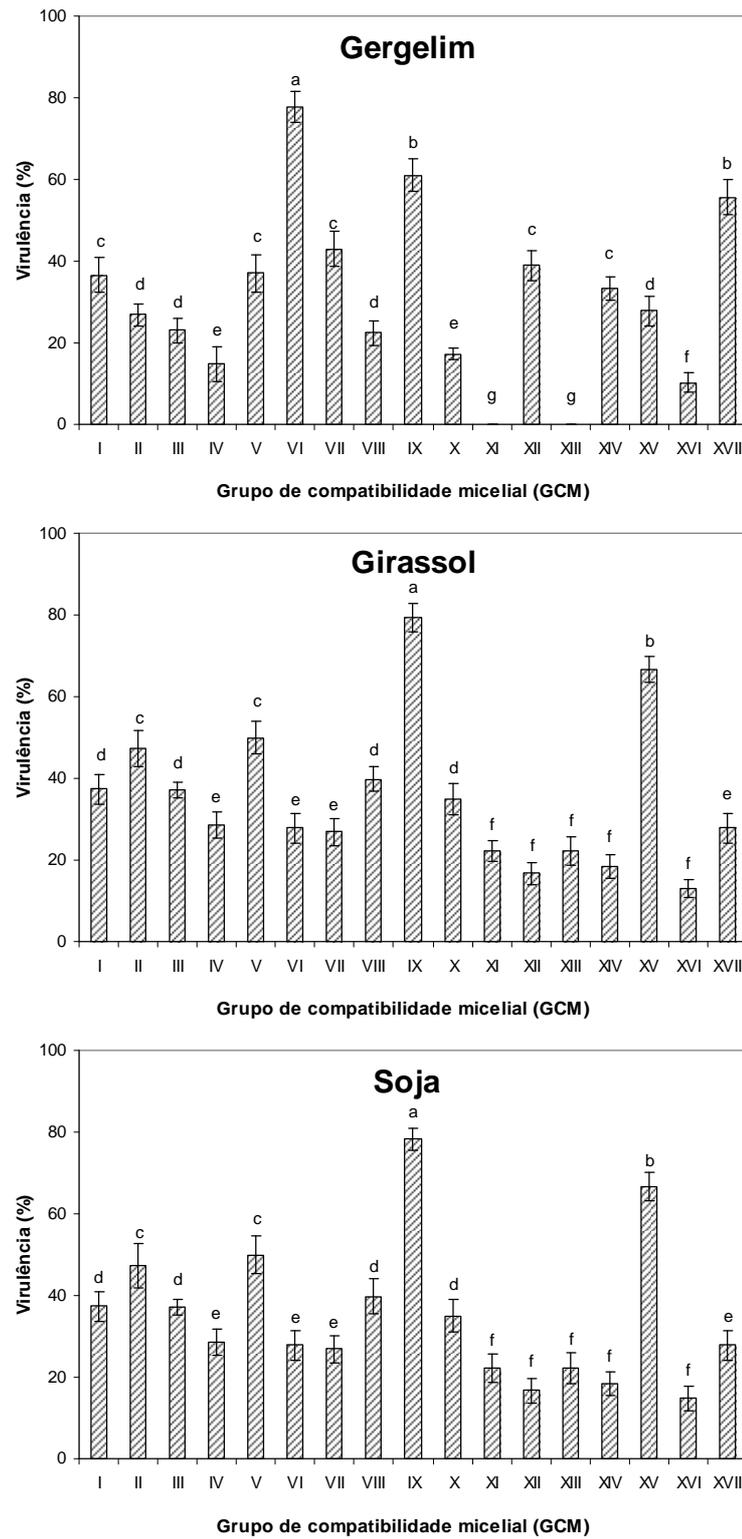


Fig. 1 Continuação.

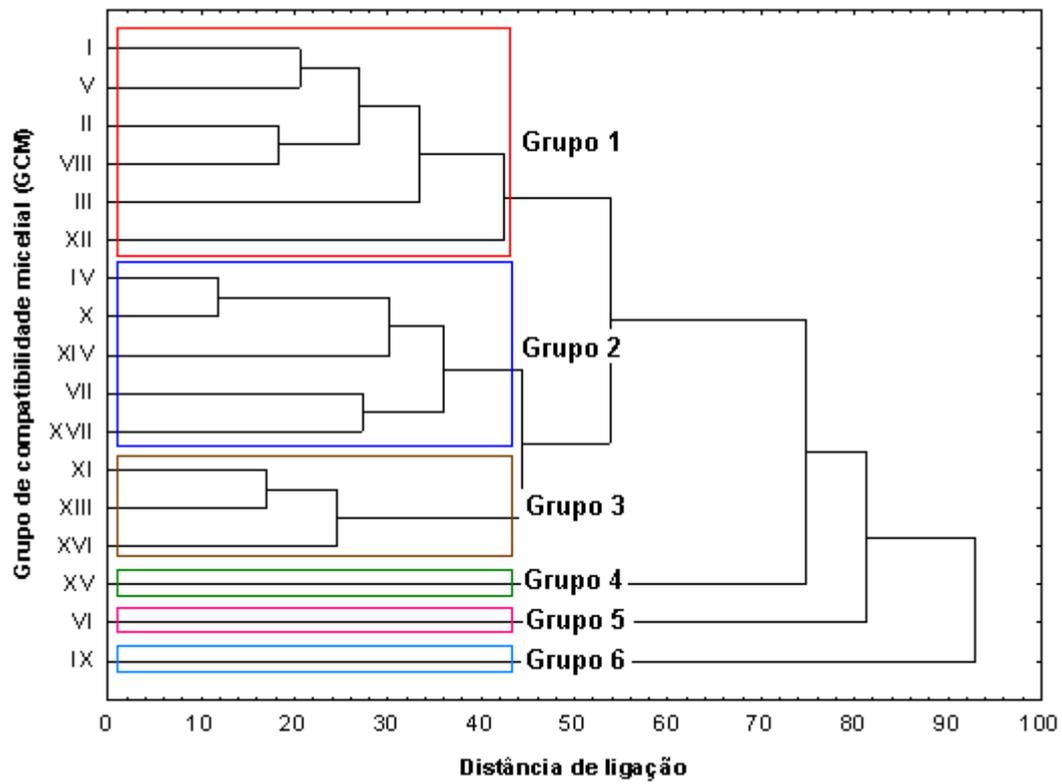


Fig. 2 Dendrograma mostrando o resultado da análise de agrupamento pelo método UPGMA dos 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de *Sclerotium rolfsii* detectados no Agreste de Pernambuco baseado na virulência a seis espécies de plantas (feijão-caupi, feijão-comum, algodão, gergelim, girassol e soja)

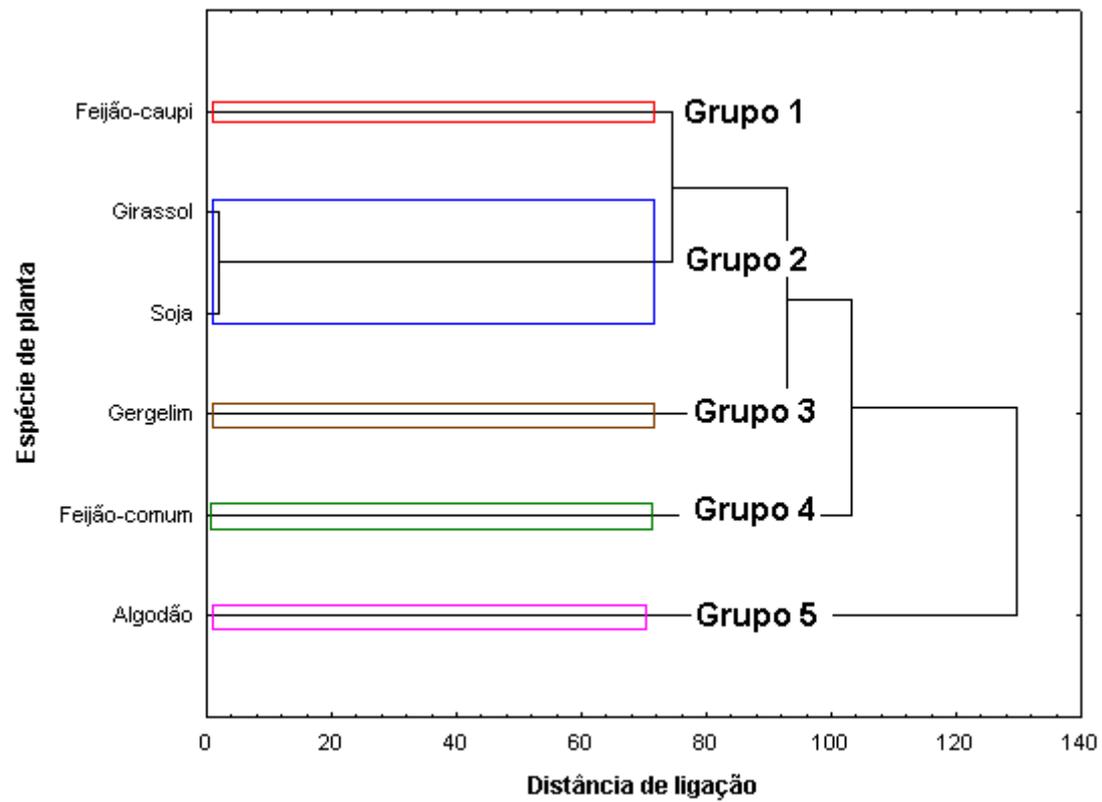


Fig. 3 Dendrograma mostrando o resultado da análise de agrupamento pelo método UPGMA da suscetibilidade das seis espécies de plantas (feijão-caupi, feijão-comum, algodão, gergelim, girassol e soja) aos 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de *Sclerotium rolfsii* detectados no Agreste de Pernambuco

Capítulo III

Diversidade molecular de populações de *Sclerotium rolfsii* de feijão-caupi e feijão-comum com base em duas sequências gênicas

Submissão: **Journal of Plant Pathology**
Bari, Italia
JCR = 0,78

DIVERSIDADE MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *SCLEROTIUM ROLFSII* DE FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-COMUM COM BASE EM DUAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS

J.V.J. Queiroz¹, K.C. Correia¹, J.A. Navas-Cortés², M.P.S. Câmara¹ and S.J. Michereff¹

*¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia,
52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil*

*²Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC), Departamento de Protección de Cultivos,, 14080 Córdoba, Spain*

Título resumido: Diversidade molecular *Sclerotium rolfsii*

Corresponding author: S.J. Michereff

Fax: 55 81 3320.6200

E-mail: sami@depa.ufrpe.br

SUMÁRIO

Isolados de *Sclerotium rolfii*, obtidos de cultivos de feijão-caupi e feijão-comum de quatro municípios da região Agreste do estado de Pernambuco (Brazil), e distribuídos previamente em 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) com base em pareamentos, foram analisados pelas sequências parciais dos genes fator de alongação 1 α (EF1- α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2). Foram obtidas sequências de 65 isolados, representando todos os GCMs detectados. Com base no polimorfismo dos nucleotídeos, o gene EF1- α apresentou maior variabilidade entre os GCMs quando comparado com o gene RPB2. Com a utilização do gene EF1- α foi possível a caracterização de 15 dos 17 GCMs, enquanto o gene RPB2 propiciou a separação de 10 GCMs. Contudo, a análise combinada das sequências dos genes EF1- α e RPB2 possibilitou a separação de todos os 17 GCMs em agrupamentos distintos. Todos os isolados agrupados em um mesmo grupo apresentaram sequências de nucleotídeos idênticas. A identificação dos GCMs, usando a combinação de sequências dos genes EF1 α e RPB2, foi consistente para isolados de *S. rolfii* coletados na região Agreste de Pernambuco.

SUMMARY

Sclerotium rolfii isolates obtained from cowpea and common bean crops from four cities in Agreste region of the state of Pernambuco (Brazil) , and previously distributed in 17 mycelial compatibility groups (MCGs) based on pairings were analyzed by partial sequences of elongation factor 1 α (EF1- α) and the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) gene. Sequences of 65 isolates representing all detected MCGs were obtained. Based on nucleotide polymorphism, the EF1- α gene showed greater variability among MCGs compared with the RPB2 gene. Using the EF1- α gene has been possible to characterize 15 of 17 MCGs, while RPB2 gene allowed the separation of 10 MCGs. However, the combined sequences of EF1- α and RPB2 gene analysis allowed the separation of all 17 MCGs in distinct clusters. All isolates clustered into one group had identical nucleotide sequences. The identification of MCGs using a combination of sequences of EF1- α and RPB2 genes was consistent for isolates of *S. rolfii* collected in Agreste region of the state of Pernambuco.

INTRODUÇÃO

Sclerotium rolfsii (teleomorfo *Athelia rolfsii*) é um fungo fitopatogênico habitante do solo, cosmopolita, distribuído principalmente em zonas agrícolas de clima tropical e subtropical, e com uma extensa gama de hospedeiras entre dicotiledôneas e monocotiledôneas (Harlton *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1998; Cilliers *et al.*, 2000). As perdas anuais de produtividade devido a doenças relacionadas à *S. rolfsii* excedem milhões de dólares a cada ano em todo o mundo. Devido a dificuldade na obtenção de material com altos níveis de resistência da hospedeira, torna-se indispensável a busca por informações que subsidiem programas de melhoramento e de manejo da doença.

No Brasil, a murcha-se-esclerócio ocorre em muitas culturas economicamente importantes, como feijão, soja, girassol, algodão, entre outras, e pode causar perdas de produtividade consideráveis. Este patógeno foi relatado pela primeira vez no país na década de 1920 e se espalhou para as principais regiões agrícolas, provavelmente, devido ao trânsito de material vegetal contaminado e implementos agrícolas entre áreas infestadas e livres da doença (referência ???). Apesar da ocorrência constante de *S. rolfsii* nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste do estado de Pernambuco (Brasil), são escassas as informações sobre a biologia das populações deste patógeno nesta região.

Estudos sobre a estrutura populacional e diversidade de *S. rolfsii* demonstraram a ocorrência de diversidade genética, sugerindo inclusive que além da reprodução assexuada comumente atribuída ao patógeno, pode ocorrer a reprodução sexuada em condições de campo. No Brasil, Almeida *et al.* (2001) relataram a ocorrência de infecção em plantas de soja na porção média, sem qualquer infecção na região do colo, sugerindo uma infecção por basidiósporos produzidos a partir da fase perfeita do fungo.

A incompatibilidade micelial é a incapacidade de fusão e formação de uma colônia coesa entre estirpes fúngicas diferentes. Esse fenômeno caracteriza-se pela morte de células e crescimento reduzido entre as duas colônias, na chamada zona de aversão (Kohn *et al.*, 1991). As populações de *S. rolfsii* têm sido amplamente caracterizadas por meio dos grupos de compatibilidade micelial (GCMs) sendo realizada assim, uma avaliação indireta a cerca da variabilidade genética entre os isolados do fitopatógeno (Leslie, 1993). Os teste com GCMs apresentam resultados de natureza fenotípica que, de forma macroscópica, revelam um sistema de auto/não-auto reconhecimento controlado por loci múltiplos, que é comum em fungos.

O estudo da compatibilidade micelial pode ser visto como uma medida indireta da diversidade genética em populações de fitopatógenos, uma vez que não revelam o grau de parentesco entre e dentro dos GCMs (Punja e Grogan, 1983; Harlton *et al.*, 1995). Com esta finalidade, está disponível um considerável número de técnicas moleculares, tais como, a análise do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e análise de sequências gênicas. Em *S. rolfsii*, marcadores RAPD foram muito eficazes para a identificação de diferenças genéticas entre isolados de diferentes regiões e plantas hospedeiras (Almeida *et al.*, 2001). Cilliers *et al.* (2000), utilizando AFLP, obtiveram dados conclusivos sobre a existência de variabilidade genética dentro de GCMs que agrupavam isolados de *S. rolfsii*. Em um estudo recente sobre populações de *S. rolfsii*, as sequências das regiões dos genes RPB2 que, codifica para a segunda subunidade maior da RNA polimerase II e EF1- α que codifica para o fator de alongação da transcrição 1-alfa, mostraram haver estreita relação entre a identidade genética dos isolados fúngicos e os GCMs nos quais estes foram agrupados (Remesal *et al.*, 2013).

Vários estudos no Brasil e no mundo têm sido desenvolvidas com o objetivo de compor um manejo eficaz para a murcha-de-esclerócio, causada por *S. rolfsii*. O resultado dessas pesquisas indicou uma considerável variabilidade genética entre isolados de *S. rolfsii* de vários hospedeiras e localidades, existindo, contudo, pouca ou nenhuma correlação entre o GCM a que pertenciam e a hospedeira/localidade de origem (Almeida *et al.*, 2001; Cilliers *et al.*, 2002; Sarma *et al.*, 2002). Uma alternativa viável é a análise das sequências de isolados representativos de GCMs detectados em uma determinada região que, pode revelar aspectos epidemiológicos importantes como a distribuição e dispersão dos GCMs de *S. rolfsii*. De posse desses dados é possível estabelecer programas de monitoramento usando marcadores moleculares que figuram ser uma ferramenta importante no manejo dessa e de outras doenças no campo.

Os objetivos deste estudo foram: i) avaliar o grau de variabilidade genética das populações de *S. rolfsii* utilizando GCMs e análises das sequências das regiões dos genes RPB2 e EF1- α a partir dos isolados coletados em áreas agrícolas representativas com plantios de feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco; ii) determinar se os mesmos genótipos de *S. rolfsii* foram encontrados associados à ambas as culturas, e iii) verificar se há correlação entre os GCMs e as sequências das regiões dos genes RPB2 e EF1 α ocorrendo nas populações ou regiões em estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados fúngicos. Foram utilizados 65 isolados de *S. rolfsii*, coletados em 13 áreas de plantio de feijão-caupi e 11 áreas de feijão-comum em municípios da região Agreste de Pernambuco, representativos de 17 GCMs previamente identificados pelo método de pareamento (Queiroz *et al.*, 2014). Os isolados foram armazenadas na forma de esclerócios secos em tubos criogênicos de 2 mL $25\pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. Culturas para experimentos subsequentes foram iniciadas a partir de um único esclerócio por isolado, depositado no centro de placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento. O DNA genômico dos isolados de *S. rolfsii*, foi obtido a partir de colônias em crescimento ativo do fungo sobre lâminas de celofane estéril em meio BDA, incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ no escuro durante 3 dias. A massa micelial foi então removida e o DNA extraído utilizando-se o kit AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen Scientific Inc., Union City, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. Para amplificação da região do gene RPB2 que, codifica para a segunda subunidade maior da RNA polimerase II foram utilizados os primers b6.9F (5' TGGACNCA Y T G Y G A R A T Y C A Y C C 3') e b11R1 (5' TGGATYTTGTCRTCCACCAT 3') (Matheny, 2006). As condições da reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguidos de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para amplificação do gene codificante do fator de alongação da transcrição 1-alfa (EF1- α) foram utilizados os primers EF1-595F (5' CGTGACTTCATCAAGAACATG 3') e EF1-1160R (5' CCGATCTTG TAGACGTCCTG 3') (Wendland e Kothe, 1997). As condições da reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Cada 50 μl de volume final de reação da polimerase em cadeia (PCR) continha 21 μl de água ultra pura (fornecida pelo kit), 1 μl de DNA molde, 1,5 μM de cada primer, 1 μl de PCR Master Mix (2X) ($0,05 \text{ u } \mu\text{l}^{-1}$ de Taq DNA polimerase, tampão de reação, 4mM MgCl_2 , 0,4 mM de cada dNTP; Thermo Scientific, Waltham, EUA). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (MJ Biocycler 96; Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão de TAE 1,0X e foram fotografados sob luz UV após ser corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) por 1 minuto. Os produtos de

PCR foram purificados utilizando o kit AxyPrep™ PCR Cleanup (Axygen), seguindo-se as instruções do fabricante. O sequenciamento das regiões do gene EF1- α e RPB2 foi efetuado em ambas as direções utilizando-se os mesmos primers empregados nas reações de amplificação, com exceção de b6.9F que foi substituído no sentido "forward" por bSr_1F (5' CGCCATGGGTAAACAAGCTA 3') (Remesal *et al.*, 2013). Nesta etapa foi usando um ABI PRISM® 3100 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na plataforma de sequenciamento LABCEN/CCB na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

Análise filogenética. As sequências parciais dos genes EF1- α e RPB2 foram editadas no programa Chromas v. 2.32 (Technelysium Pty Lda, Brisbane, Australia). Em seguida, foram selecionados 65 isolados representantes de cada GCM por localidade, com sequências de nucleotídeos idênticas. O alinhamento dessas sequências foi efetuado com ClustalX v. 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) e ajustadas manualmente quando necessário. Os eventos de indels (gaps) foram considerados na análise filogenética como descrito por Young e Healy (2003).

As relações filogenéticas entre os isolados foram inferidas, com base nos métodos de máxima parcimônia e neighbour-joining, implementadas em MEGA versão 5 (Tamura *et al.*, 2011), e ajustado manualmente para permitir a máxima similaridade entre seqüências. Nas análises de máxima parcimônia foram geradas árvores utilizando a opção de adição gradual de busca heurística com seqüências aleatórias, e os gaps no alinhamento foram tratados como caracteres perdidos. Para a análise de neighbor-joining, a uma distância matriz foi gerado utilizando o procedimento Jukes-Cantor. A estabilidade do clado foi estimado com 1000 repetições de bootstrap (Hills e Bull, 1993) implementado em MEGA versão 5. Uma análise adicional, baseada em um alinhamento concatenado das sequências dos genes RPB2 e EF1- α foi realizada. As sequências analisadas neste estudo foram depositadas no GenBank.

RESULTADOS

Foi amplificado um fragmento de 538 pb do gene EF1- α . O alinhamento das sequências de nucleotídeos mostrou que os isolados de *S. rolfsii* se agrupam conforme o GCM a que pertencem e não de acordo com a origem geográfica. Sendo assim, a fim de identificar os sítios variáveis diferenciadores de GCMs em *S. rolfsii*, utilizou-se um conjunto representativo de 65 isolados de cada combinação GCM-localidade com as sequências idênticas de nucleotídeos para análise subsequente. Observou-se grande variabilidade nas sequências de EF1- α em função das diferenças apresentadas em 33 posições de nucleotídeos. Para essas

sequências obteve-se percentuais de similaridade de 99,1 a 100% (dados não apresentados). Todas as sequências de EF1- α dos GCMs de *S. rolfsii* foram únicas, contudo, não permitiram a diferenciação dos GCMs com base nestas sequências (Figura 1).

A partir do gene RPB2 foram amplificados fragmentos de aproximadamente 847 pb, que pelas análises filogenéticas mostraram não haver correlação entre o tipo de sequência e a origem geográfica dos isolados, sendo estes agrupados de acordo com GCM. Como descrito anteriormente, 65 isolados representantes das possíveis combinações GCM-localidade com sequências de nucleotídeos idênticas foram selecionados para subsequente análise para identificar as posições de nucleotídeos diferenciadoras dos GCMs (Figura 2). Sendo assim, os GCMs II, VIII, XIII e XIV demonstraram compartilhar a mesma sequência para RPB2, enquanto que os demais (GCMs I, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XV, XVI e XVII) apresentam sequências únicas que permitiu diferenciá-los entre si (Figura 2). A variabilidade encontrada entre as sequências de RPB2 para os GCMs foi devido a diferenças em 46 posições de nucleotídeos. Para estas sequências foram obtidos valores de similaridade entre 99,5-100 % (dados não apresentados).

A análise da distância entre as sequências de EF1- α agrupou os GCMs em 16 grupos principais (Figura 3). Destes, os GCMs X e XVII, que compreendem isolados das quatro localidades amostradas (Tabela 3), foram agrupados no cluster A (Figura 3). Os GCMs IX e XVI, compostos por isolados de dois municípios do Agreste de Pernambuco, São João (GCM XVI) e Lajedo (GCM IX) foram agrupados no cluster B (64 % de suporte bootstrap) (Figura 3). Os grupos C, F, G, H, I, J, M e O foram formados por apenas um GCM, sendo quatro destes (III, I, II e VIII) formados por isolados compartilhados em pelo menos duas áreas de coleta. Com exceção dos GCMs XVII e IX, todos os demais GCMs que formaram grupos com um único isolado (XI, XV, XII, VI e XIII), agruparam-se em clusters separados.

A análise da distância das sequências de RPB2 agrupou todos os GCMs em dez grupos principais (Figura 4). Os GCMs X e IX se agruparam no cluster A (64% suporte de bootstrap) (Figura 4). Essas GCMs abrigam 14 isolados e demonstraram uma ampla distribuição geográfica, com isolados das quatro localidades amostradas neste estudo. Os clusters B, D e E, formados respectivamente pelos GCMs IV, V e VII, foram compostos por isolados coletados apenas no município de São João. Enquanto isso, o cluster C, igualmente formado por apenas um GCM agrupou isolados de duas localidades distintas (São João e Garanhuns). O GCM II, presente em todas as áreas amostradas no Agreste de Pernambuco, foi agrupado no cluster G, juntamente com os GCMs VIII, VI, XIII e XIV. Curiosamente, os GCMs II, VIII, XIII e XIV compartilham a mesma sequência de RPB2 (Figura 4).

A análise adicional das sequências de EF1- α e RPB2 concatenadas permitiu o agrupamento dos 17 GCMs de *S. rolf sii* em 17 clusters distintos (Figura 5). Assim, os GCMs que não puderam ser agrupados separadamente, a partir da análise de uma única sequência gênica (GCMs X, XVII, IX e XVI para o gene EF1- α e GCMs X, IX, XVII, XVI, III, II, VIII, VI, XIII e XIV para o gene RPB2) passaram a ser diferenciados (Figura 5). Uma diferença de nucleotídeos na posição 193 (para o gene RPB2) não foi suficiente para separar os GCMs em clusters distintos, conforme observado nos GCMs IX e X, que foram agrupados no cluster A e GCMs III e XVII, agrupados no cluster C. Foi necessária uma diferença em pelo menos dois nucleotídeos na sequência do gene EF1- α para que os GCMs se agrupassem separadamente. Contudo, os GCMs que formaram os clusters A e B, apesar de apresentarem variações em duas posições das sequências (sítios 388 e 506 para A; 298 e 510 para B), não foram separados em grupos diferentes. Um total de 11 GCMs (I, II, III, VI, VIII, IX, X, XI, XIII, XIV e XVII) não mostraram ambiguidades nas sequências do gene RPB2 e destes, apenas os GCMs I, III, IX e XVII não mostraram ambiguidades para o gene EF1- α . Nos demais GCMs, observou-se de 1-6 ambiguidades no gene EF1- α e 1 a 35 ambiguidades no gene RPB2.

DISCUSSÃO

A identificação dos GCMs em populações de *S. rolf sii* tem sido abordada ao longo do tempo por diversos autores desde que Punja e Grogan (1983) descreveram pela primeira vez a ocorrência de GCMs neste patógeno. Esta metodologia é usada para caracterizar a estrutura de populações de campo deste importante fitopatógeno habitante do solo. Neste contexto, este estudo, utilizou uma abordagem molecular, que incluiu a análise das sequências parciais dos genes EF1- α e RPB2.

Com base nos dados obtidos, estimou-se um alto grau de variabilidade entre os GCMs, sem haver, no entanto, correlação clara entre as sequências parciais dos genes EF1- α e RPB2 e a localidade de origem dos isolados. Todos os isolados pertencentes ao mesmo GCM mostraram padrões idênticos. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Remesal *et al.* (2013) que mostraram que os isolados dentro de um GCM apresentavam sequências idênticas dos genes EF1- α e RPB2, concluindo que os isolados apresentavam basicamente um padrão clonal nas áreas de origem.

Embora, a análise das sequências de EF1 α não tenha separado os 17 GCMs avaliados neste estudo, pode-se inferir sobre as posições determinantes para o agrupamento de GCMs num

mesmo cluster. Vale ressaltar, que essas mudanças foram devidas a transições de nucleotídeos de natureza ambígua segundo a cromatografia (Figura 1). Tal ambiguidade ocorre provavelmente devido a presença de mais de um núcleo em cada célula fúngica. Essa hipótese foi avaliada por Okabe *et al.* (2001) que, analisando a identidade celular de basidiósporos de *S. rolfssii*, não puderam quantificar com precisão o número total de núcleos em células fúngicas, embora previamente tenha confirmada a natureza multinucleada das mesmas (Punja e Grogan, 1983) .

Neste sentido, não foi possível garantir neste estudo se cada sequência parcial dos genes EF1- α e RPB2 corresponderiam a um ou a diferentes núcleos. A presença de múltiplas cópias gênicas não idênticas tem sido relatada para outros fungos monocarióticos (Ko e Jung, 2002; Rooney e Ward, 2005). Recentemente, Le *et al.* (2012) constataram polimorfismos em diferentes cópias de sequências gênicas em isolados de *S. rolfssii* do Vietnã. Levando-se em consideração que o DNA genômico analisado neste estudo foi obtido a partir de um único esclerócio de *S. rolfssii* (perfil heterocariótico), são necessários estudos complementares para desvendar as causas da ambiguidade encontrada nas sequências dos genes EF1- α e RPB2 para os GCMs, pois até a presente data, faltam informações na literatura sobre esse tema.

Os genes EF1- α e RPB2 são apontados como marcadores moleculares adequados para inferir a filogenia intraespecífica para o filo Basidiomycota (Baldauf, 1999; Matheny, 2006; Matheny *et al.*, 2007; Binder *et al.*, 2010; Rodríguez-Estrada *et al.*, 2010). Contudo, o estudo da variabilidade intraespecífica em populações de *S. rolfssii* utilizando sequências de ambos os genes associados é recente (Remesal *et al.*, 2013). O estudo das sequências combinadas de EF1- α e RPB2 se mostrou promissor em estimar a variabilidade genética dentro dos GCMs formados em populações *S. rolfssii*, por meio da detecção de polimorfismos de nucleotídeos específicos que permitiram a identificação dos GCMs de forma inequívoca.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram haver uma relação direta entre as sequências de nucleotídeo das regiões amplificadas dos genes EF1- α e RPB2 de cada isolado de *S. rolfssii* com seu GCM correspondente, com todos os isolados agrupados em um mesmo GCM apresentando sequências idênticas de nucleotídeos.

Com base nas posições de nucleotídeos variáveis, as sequências do gene EF1- α foram mais divergentes do que as do gene RPB2. Dessa forma, 13 dos 17 GCMs puderam ser caracterizados com base na sequência parcial da região do gene EF1 α , enquanto que apenas 7 dos 17 GCMs foram diferenciados com base na região do gene RPB2 (Figura 4). Estes resultados divergem de outros estudos que concluíram que a regiões do RPB2 é fortemente

conservada entre os eucariontes (Denton *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Matheny *et al.*, 2007), mas são mais variáveis do que o EF1- α em fungos.

Quando combinadas as sequências de EF1- α e RPB2, todos os 17 GCMs de *S. rolfsii* incluídos neste estudo puderam ser diferenciados sem qualquer ambiguidade (Figura 5). Estes marcadores, apesar de reverem uma relação direta com os GCMs, não foram úteis para estabelecer relação com a origem geográfica dos isolados. A análise das sequências dos isolados representativos dos GCMs mostrou que a distribuição e disseminação dos GCMs de *S. rolfsii* poderiam ser facilmente monitoradas pelos marcadores moleculares utilizados no presente estudo.

Esta ferramenta de diagnóstico para GCMs em *S. rolfsii* é de grande importância e pode ser associada a outras técnicas que permitam o conhecimento da epidemiologia e manejo de doenças causadas por outros patógenos fúngicos. Dessa forma, Remesal *et al.* (2013) usaram dados de patogenicidade a diferentes hospedeiras associados às análises moleculares das sequências de EF1- α e RPB2 para identificar subgrupos genéticos em populações de *S. rolfsii* obtidas em diferentes localidade de clima mediterrânico. A concepção de subgrupos em populações fúngicas foi correlacionada com a patogenicidade e virulência e permitiu a elucidação da forma de disseminação desses patógenos em diferentes regiões geográficas (Kuninaga *et al.*, 1997; Collado-Romero *et al.*, 2006; Daval *et al.*, 2010; Jiménez-Díaz *et al.*, 2011).

A análise de distância entre isolados de *S. rolfsii* efetuada neste estudo, com base em sequências de nucleotídeos das regiões específicas dos genes EF1- α e RPB2 agrupou-os de acordo com o GCM, sem haver correlação com a origem geográfica dos isolados. Os GCMs II e X foram os mais prevalentes no Agreste de Pernambuco e pela análise das sequências de RPB2 não foi possível separá-los em grupos distintos, mesmo havendo eventos de transição de nucleotídeos (posição 50 para o grupo G e 193 para o grupo A) das mesmas.

A aplicabilidade e confiabilidade do uso combinado das sequências dos genes EF1- α e RPB2 como ferramenta molecular para atribuir isolados a um determinado GCM em *S. rolfsii* foi utilizada em estudos anteriores e demonstrou eficiência na detecção de GCMs pré-existentes e identificação de novos GCMs em isolados obtidos de cultivos de beterraba-açucareira (Remesal *et al.*, 2013).

Neste estudo, foi estabelecido um conjunto de isolados testadores (Tabela 1) para a identificação de GCMs em *S. rolfsii*. A partir destes testadores, uma sequência gênica específica para EF1- α e RPB2 será atribuída a um dos 17 GCMs definidos. Esta coleção de isolados testadores poderá contribuir em outros estudos como uma ferramenta de diagnóstico

de GCMs em áreas de cultivo no Agreste de Pernambuco e regiões vizinhas. Os dados obtidos a partir da análise das sequências combinadas de EF1- α e RPB2 mostram que de forma prática e precisa pode-se aliar o uso de ferramentas moleculares ao estudo dos componentes epidemiológicos da murcha-de-esclerócio, visando monitorar a disseminação espaço-temporal de isolados de *S. rolfsii*.

REFERÊNCIAS

- Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessman, D., & Yorinori, J. T. (2001). Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology*, *149*, 493–502.
- Baldauf, S. L. (1999). A search for the origins of animals and fungi: comparing and combining molecular data. *American Naturalist*, *154*, S178-S188.
- Binder, M., Larsson, K. H., Matheny, P. B., & Hibbett, D. (2010). Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiales ord. nov.: Early diverging clades of Agaricomycetidae dominated by corticioid forms. *Mycologia*, *102*, 865-880.
- Cilliers, A. J., Herselman, L., & Pretorius, Z. A. (2000). Genetic variability within and among mycelia compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology*, *90*, 1026–1031.
- Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., & Van Wyk, P. S. (2002). Mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *South African Journal of Botany*, *68*, 389–392.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2006). Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology*, *96*, 485-495.
- Daval, S., Lebreton, L., Gazengel, K., Guillerm-Erckelboudt, A. Y., & Sarniguet, A. (2010). Genetic evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* into two major groups. *Plant Pathology*, *59*, 165-178.

- Denton, A. L., McConaughy, B. L., & Hall, B. D. (1998). Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, *15*, 1082-1085.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., & Punja, Z. K. (1995). Genetic diversity in *Sclerotium* (*Athelia*) *rolfsii* and related species. *Phytopathology*, *85*, 1269–1281.
- Hills, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, *42*, 182–192.
- Jiménez-Díaz, R. M., Olivares-García, C., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M., & Navas-Cortés, J. A. (2011). Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology*, *101*, 304-315.
- Ko, K. S., & Jung, H. S. (2002). Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *23*, 112-122.
- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., & Anderson, J. B. (1991). Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, *81*, 480–485.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., & Yokosawa, R. (1997). Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, *32*, 237-243.
- Le, C. N., Mendes, R., Kruijt, M., & Raaijmakers, J. M. (2012). Genetic and phenotypic diversity of *Sclerotium rolfsii* in groundnut fields in central Vietnam. *Plant Disease*, *96*, 389-397.
- Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, *31*, 127–150.
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, D. (1999). Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, *16*, 1799-1808.

Matheny, P. B. (2006). *PCR primers to amplify and sequence rpb2 (RNA polymerase II second largest subunit) in the Basidiomycota (Fungi)*. <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/rpb2primers.htm>

Matheny, P. B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J. M., Lim, Y. W., Nilsson, H., Hughes, K. W., Hofstetter, V., Ammirati, J. F., Schoch, C. L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D. J., Wilson, A. W., Froslev, T., Ge, Z. W., Kerrigan, R. W., Slot, J. C., Yang, Z. L., Baroni, T. J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M. T., Vauras, J., & Hibbett, D. S. (2007). Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *43*, 430-451.

Okabe, I., Arakawa, M., & Matsumoto, N. (2001). ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience*, *42*, 107-113.

Okabe, I., Morikawa, C., Matsumoto, N., & Yokoyama, K. (1998). Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. *Mycoscience*, *39*, 399-407.

Punja, Z. K., & Grogan, R. G. (1983). Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology*, *73*, 1279-1284.

Queiroz, J. V. J., Souza, L. T., Câmara, M. P. S., & Michereff, S. J. (2014). Grupos de compatibilidade micelial e diversidade patogênica em populações de *Sclerotium rolfsii* de cultivos de feijão-caupi e feijão-comum no Agreste de Pernambuco. *European Journal of Plant Pathology* (submissão).

Remesal, E., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M., & Navs-Cotés, J. A. (2013). Sequence variation in two protein-coding genes correlates with mycelial compatibility groupings in *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, *103*, 479-487.

Rodríguez-Estrada, A. E., Jiménez-Gasco, M. M., & Royse, D. J. (2010). *Pleurotus eryngii* species complex: Sequences analysis and phylogeny on partial EF1 α and RPB2 genes. *Fungal Biology*, *114*, 421-428.

Rooney, A. P., & Ward, T. J. (2005). Evolution of a large Ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of concerted evolution paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, *102*, 5084-5089.

Sarma, B. K., Singh, U. P., & Singh, K. P. (2002). Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Mycologia*, *94*, 1051–1058.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–2739.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *25*, 4876–4882.

Wendland, J., & Kothe, E. (1997). Isolation of *tef1* encoding translation elongation factor EF-1 α from the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mycology Research*, *101*, 798-802.

Young, N. D., and Healy, J. (2003). GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic Analysis. *BMC Bioinformatics*, *4*, 1-6.

Tabela 1. Origem geográfica, grupos de compatibilidade micelial (GCM), código do isolado e número de acesso no GenBank para sequências parciais dos genes fator de alongação (EF1- α) e segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) de isolados representativos dos GCMs detectados no Agreste Meridional de Pernambuco.

Localidade	GCM	Isolados representativos		
		Código	EF1- α	RPB2
Garanhuns	X	CMM 3085	KF850528	KF850593
	I	CMM 3089	KF850559	KF850623
	II	CMM 3097	KF850571	KF850635
	VIII	CMM 3088	KF850591	KF850655
Lajedo	X	CMM 3630	KF850529	KF850594
	X	CMM 3050	KF850533	KF850598
	X	CMM 1664	KF850535	KF850600
	X	CMM 1657	KF850536	KF850601
	X	CMM 1649	KF850537	KF850602
	IX	CMM 3049	KF850541	KF850606
	XVII	CMM 3633	KF850544	KF850609
	III	CMM 3307	KF850547	KF850612
	II	CMM 1639	KF850562	KF850626
	II	CMM 3092	KF850570	KF850634
	II	CMM 3626	KF850573	KF850637
	II	CMM 3635	KF850574	KF850638
	VIII	CMM 3091	KF850592	KF850656
São João	X	CMM 3082	KF850530	KF850595
	X	CMM 3081	KF850531	KF850596
	X	CMM 3078	KF850532	KF850597
	X	CMM 1341	KF850540	KF850605
	XVI	CMM 3065	KF850542	KF850607
	XVI	CMM 3309	KF850543	KF850608
	III	CMM 3032	KF850545	KF850610
	III	CMM 3083	KF850546	KF850611
	IV	CMM 1604	KF850548	KF850613
	IV	CMM 1605	KF850549	KF850614
	IV	CMM 3033	KF850550	KF850615
	IV	CMM 3036	KF850551	KF850616
	XV	CMM 3096	KF850552	KF850617
	XI	CMM 3063	KF850553	KF850618
	XII	CMM 3064	KF850554	KF850619
	I	CMM 3023	KF850555	KF850601
	I	CMM 3029	KF850556	KF850620
	I	CMM 3030	KF850557	KF850621
I	CMM 3035	KF850558	KF850622	
I	CMM 3094	KF850560	KF850624	

	II	CMM 3024	KF850563	KF850627
	II	CMM 3025	KF850564	KF850628
	II	CMM 3026	KF850565	KF850629
	II	CMM 3027	KF850566	KF850630
	II	CMM 3028	KF850567	KF850631
	II	CMM 3068	KF850568	KF850632
	II	CMM 3084	KF850569	KF850633
	II	CMM 3306	KF850572	KF850636
	VII	CMM 3047	KF850575	KF850639
	VII	CMM 3048	KF850576	KF850640
	VII	CMM 3046	KF850577	KF850641
	VII	CMM 3045	KF850578	KF850642
	VII	CMM 3041	KF850579	KF850643
	V	CMM 3034	KF850580	KF850644
	V	CMM 3040	KF850581	KF850645
	V	CMM 3079	KF850582	KF850646
	XIV	CMM 3071	KF850583	KF850647
	XIV	CMM3074	KF850584	KF850648
	XIII	CMM3069	KF850585	KF850649
	VI	CMM 3039	KF850586	KF850650
	VIII	CMM 3080	KF850587	KF850651
	VIII	CMM 3056	KF850588	KF850652
	VIII	CMM 3061	KF850589	KF850653
	VIII	CMM 3043	KF850590	KF850654
Jupi	X	CMM 1722	KF850534	KF850599
	X	CMM 1613	KF850538	KF850603
	X	CMM 1606	KF850539	KF850604
	II	CMM 1623	KF850561	KF850625

GCM	Sítios variáveis de nucleotídeos																																	
	13	15	16	29	32	33	36	37	39	46	47	49	57	74	101	102	270	298	388	503	504	506	507	508	509	510	516	517	535	536	539	540	541	
I	A	A	C	G	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	C	T	A	G	G	A	A	A	G	A	A	T	C	A	
II	A	A	C	A	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	C	T	R	G	G	A	A	A	R	A	A	T	C	A	
III	A	A	C	G	A	C	A	A	G	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	C	T	A	G	G	A	A	A	G	A	A	T	C	G	
IV	T	A	C	G	A	C	A	A	G	T	G	C	C	G	G	C	G	R	A	C	T	A	G	G	A	A	A	G	G	A	T	C	A	
V	A	A	M	A	A	A	A	A	G	T	G	C	C	A	G	C	G	G	A	G	T	T	G	G	T	A	R	R	A	C	G	A	A	
VI	A	W	M	A	A	M	A	A	G	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	T	G	G	G	A	T	A	R	R	A	A	T	S	A	
VII	A	T	M	A	A	M	T	A	G	T	G	C	C	A	G	C	G	G	A	C	T	G	G	G	A	A	R	R	A	A	G	C	A	
VIII	A	A	A	A	A	M	C	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	T	G	R	G	G	A	T	A	R	R	A	M	G	A	C
IX	A	A	C	G	A	C	C	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	A	C	T	G	G	G	A	A	A	G	A	A	T	C	G	
X	A	A	C	G	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	R	C	T	R	G	G	A	A	A	G	A	A	T	C	G	
XI	A	A	C	G	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	G	G	C	T	R	G	G	A	A	A	G	G	A	T	C	G	
XII	A	A	M	A	A	M	A	C	A	T	G	C	C	A	G	Y	G	G	A	C	T	R	G	A	T	A	R	R	G	A	T	G	G	
XIII	A	A	M	A	A	M	A	G	A	G	T	G	G	G	C	T	C	G	A	T	G	A	G	A	A	T	G	R	A	M	G	C	G	
XIV	A	A	M	A	G	M	A	A	A	G	G	Y	C	G	G	C	G	G	A	T	G	G	A	G	A	A	A	A	A	A	T	Y	G	
XV	A	A	C	G	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	R	A	C	T	G	A	G	A	A	A	G	G	A	T	C	G	
XVI	A	A	C	G	A	C	C	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	R	A	C	T	G	G	G	A	W	A	G	A	A	T	C	G	
XVII	A	A	C	G	A	C	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	G	A	A	C	T	G	G	G	A	A	A	G	A	A	T	C	G	

Fig. 1. Sítios de variação de nucleotídeos identificados em regiões parciais do gene fator de alongação (EF1- α) para 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de isolados de *Sclerotium rolfii* coletados no Agreste Meridional de Pernambuco.

GCM	Sítios variáveis de nucleotídeos																																						
	187	193	211	220	241	256	262	268	289	301	335	359	365	407	416	455	482	491	497	533	551	554	557	563	623	632	675	687	747	750	753	756	759	778	793	835	844		
I	C	G	C	T	T	T	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	C	T	G	T	A	G	T	T	T	G	C	G	G	G	G	C	C	T	G	C	C	C	
II	C	G	C	C	T	C	G	G	A	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	C	A	A	A	A	T	A	C	T	A	C	A	G
III	T	G	T	T	T	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	G	C	G	G	G	G	C	C	T	G	T	T	A	C
IV	T	G	T	T	C	C	A	A	A	G	T	Y	A	T	G	R	C	Y	R	Y	G	G	K	T	Y	G	C	G	G	G	C	C	T	G	T	Y	C	C	
V	C	G	C	T	T	T	A	R	R	R	C	Y	R	Y	G	R	Y	Y	R	Y	R	K	K	Y	Y	G	Y	G	R	G	T	A	Y	A	C	Y	C		
VI	C	G	C	C	T	C	G	G	G	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	T	A	A	A	T	A	C	A	C	A	C	G	
VII	A	G	Y	C	T	Y	A	A	R	A	C	Y	A	Y	G	R	Y	Y	R	T	R	K	K	Y	Y	G	Y	R	R	R	Y	M	Y	R	Y	M	C	C	
VIII	C	G	C	C	T	C	G	G	G	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	T	A	A	A	T	A	C	A	C	A	C	A	G
IX	T	A	T	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	A	G	G	T	C	A	C	G	G	G	C	C	T	G	T	C	C	C	
X	T	G	T	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	A	G	G	T	C	A	C	G	G	G	C	C	T	G	T	C	C	C	
XI	C	G	C	C	T	C	G	G	G	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	T	A	A	A	T	A	C	A	C	A	C	A	G
XII	Y	G	Y	Y	T	Y	R	R	R	R	C	Y	R	Y	R	R	Y	Y	R	Y	R	K	K	Y	Y	G	Y	R	R	A	Y	A	Y	A	Y	R	Y	M	S
XIII	C	G	C	C	T	C	G	G	G	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	T	A	A	A	T	A	C	A	C	A	C	A	G
XIV	C	G	C	C	T	C	G	G	G	A	C	C	G	C	A	G	T	T	A	C	G	T	T	C	T	G	T	A	A	A	T	A	C	A	C	A	C	A	G
XV	T	R	T	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	G	C	G	G	G	C	C	T	G	T	Y	C	C	
XVI	T	G	T	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	G	C	G	G	G	C	C	T	G	T	Y	C	C	
XVII	T	A	T	T	C	T	A	A	A	G	C	T	A	T	G	A	C	C	G	T	G	G	G	T	C	G	C	G	G	G	C	C	T	G	T	T	T	C	C

Fig. 2. Sítios de variação de nucleotídeos identificados em regiões parciais do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) para 17 grupos de compatibilidade micelial (GCMs) de isolados de *Sclerotium rolfii* coletados no Agreste Meridional de Pernambuco.

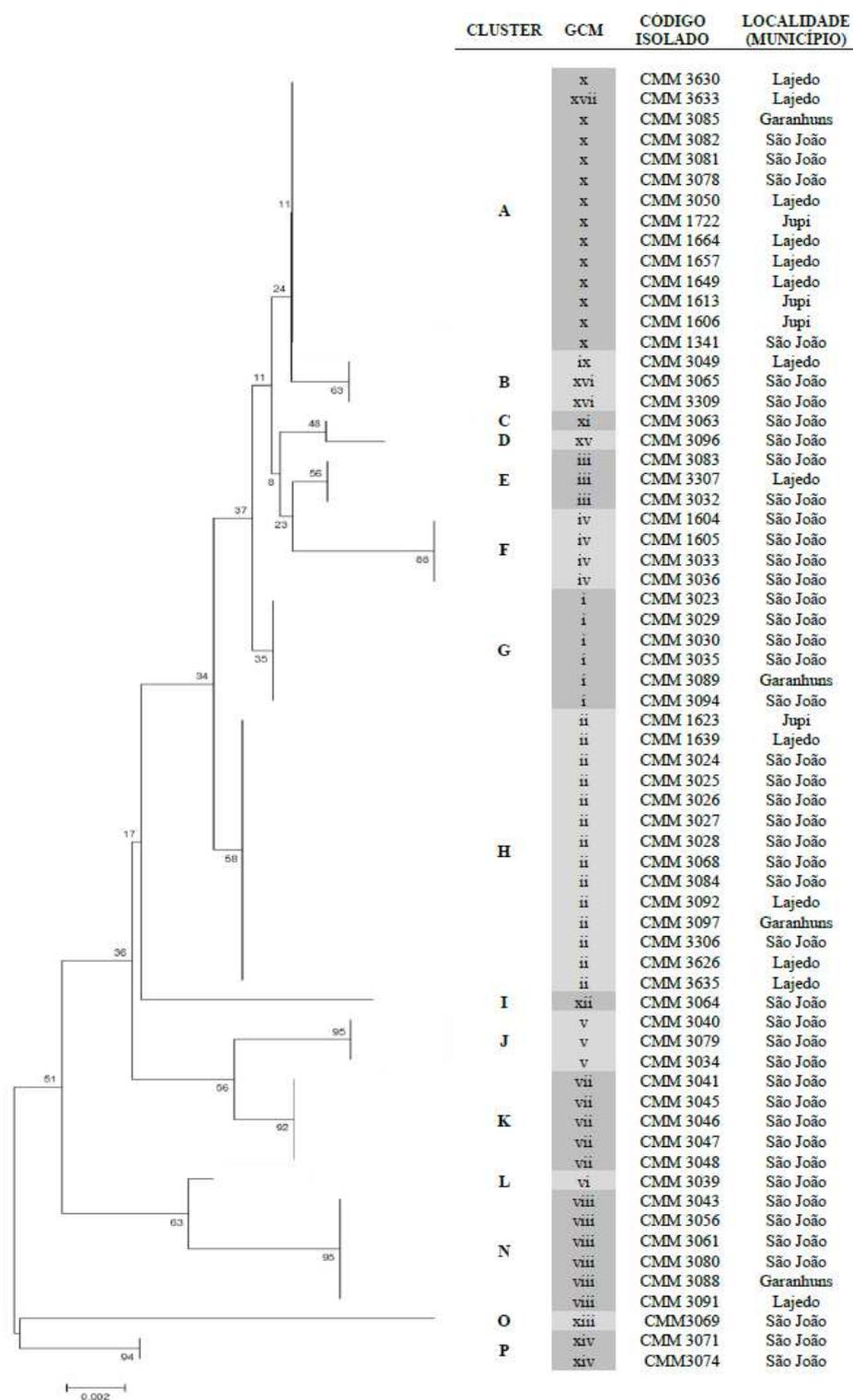


Fig. 3. Filograma inferido pelo método neighbor-joining para a sequência parcial do gene fator de alongamento (EF1 α) de isolados de *Sclerotium rolfsii*, incluindo os grupos de compatibilidade micelial (GCMs), código do isolado e a localidade (município) de origem. Valores de Bootstrap >50% para 1,000 replicações foram implementados no programa Mega 5.2.

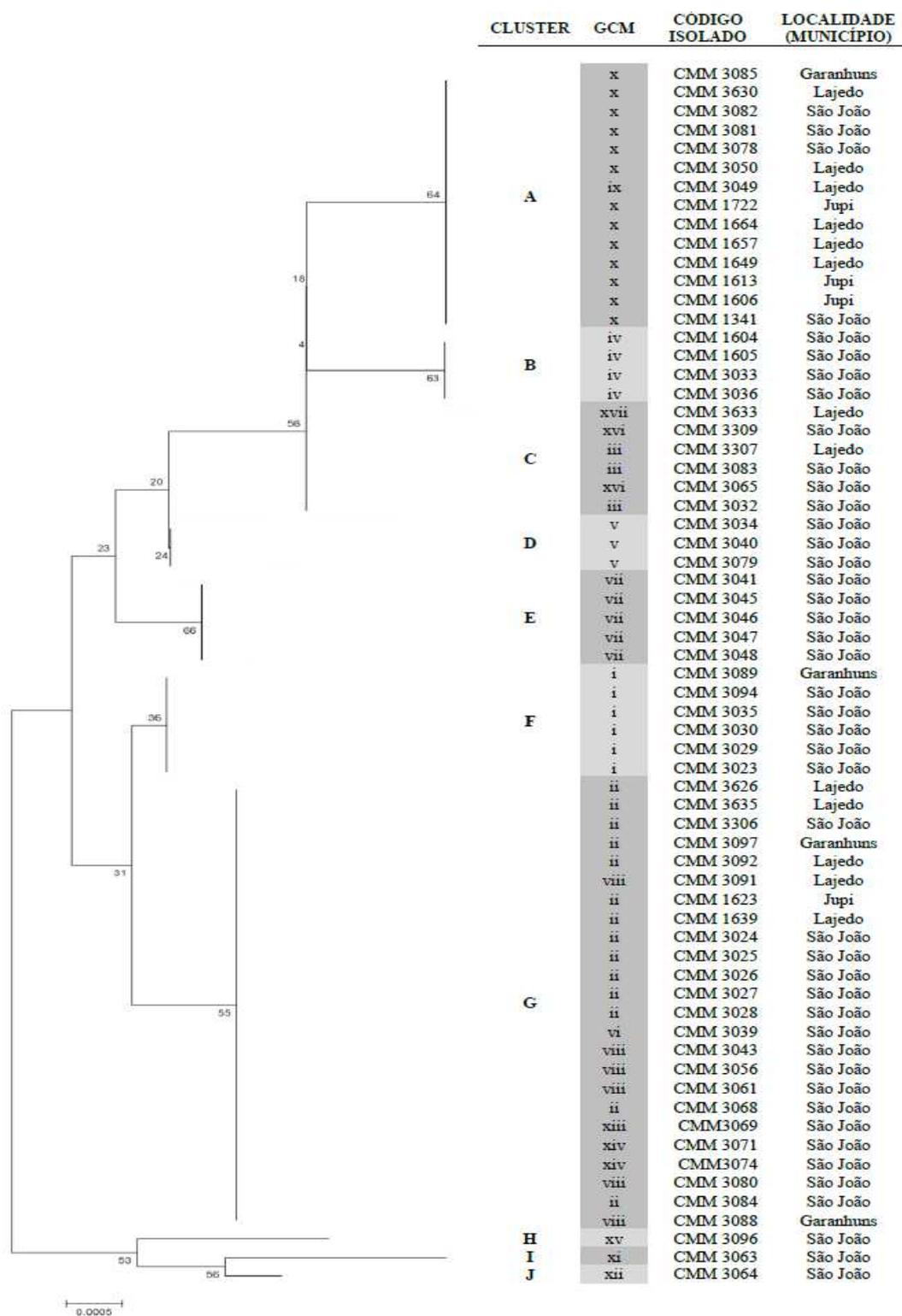


Fig. 4. Filograma inferido pelo método neighbor-joining para a sequência parcial do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) de isolados de *Sclerotium rolfsii*, incluindo os grupos de compatibilidade micelial (GCMs), código do isolado e a localidade (município) de origem. Valores de Bootstrap >50% para 1,000 replicações foram implementados no programa Mega 5.2.

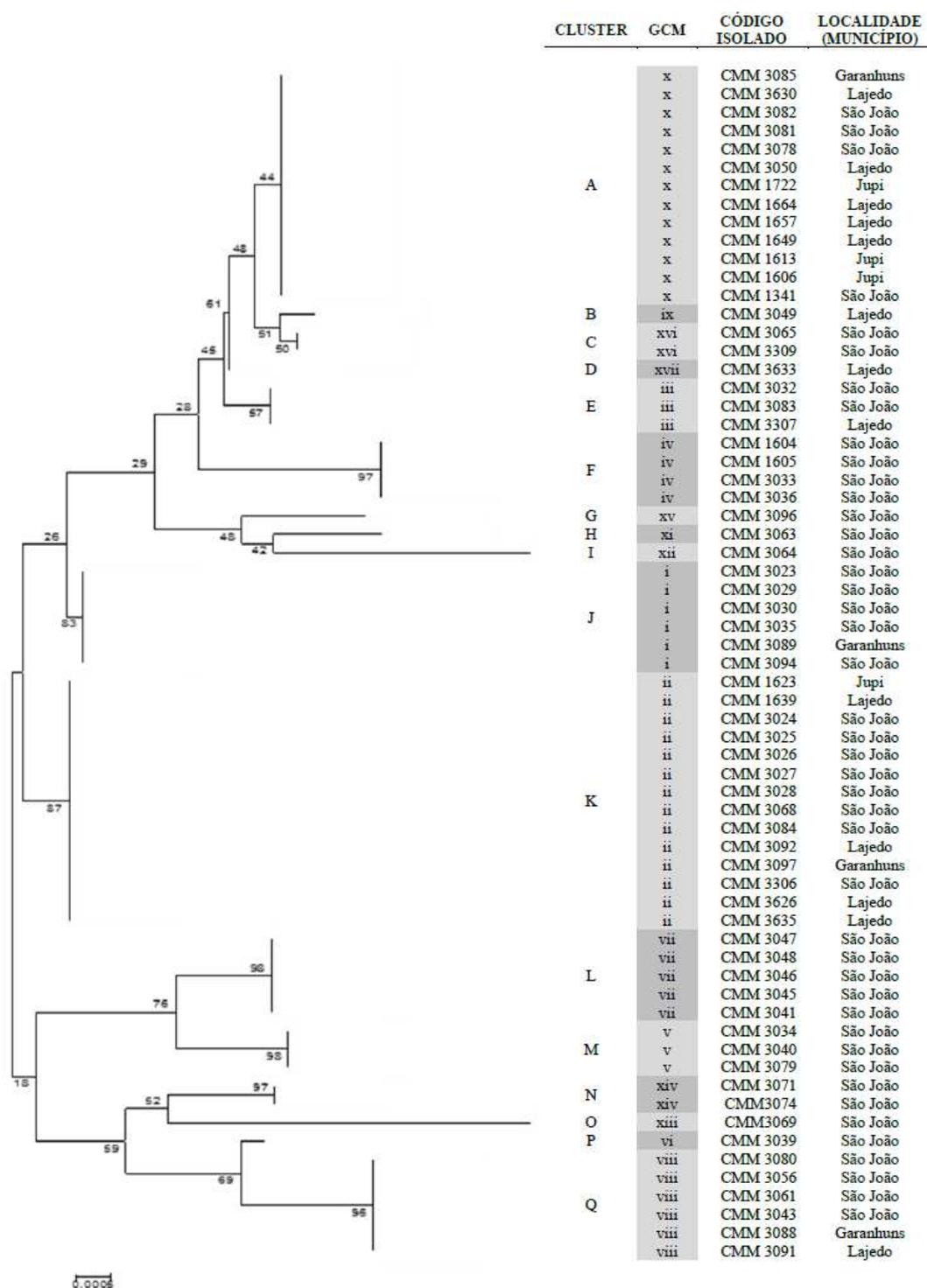


Fig. 5. Filograma inferido pelo método neighbor-joining para sequências parciais concatenadas de regiões dos genes fator de alongação (EF1 α) e segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) de isolados de *Sclerotium rolfsii*, incluindo os grupos de compatibilidade micelial (GCMs), código do isolado e a localidade (município) de origem. Valores de Bootstrap >50% para 1,000 replicações foram implementados no programa Mega 5.2.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Existe uma grande diversidade genética nas populações de *Sclerotium rolfsii* nas áreas cultivadas com feijão-caupi e feijão-comum na região Agreste do estado de Pernambuco;
2. Existe diferença entre as áreas cultivadas quanto à diversidade genética nas populações de *S. rolfsii*;
3. Algumas populações de *S. rolfsii* foram extensivamente disseminadas entre as áreas cultivadas, provavelmente por práticas culturais;
4. Os isolados de *S. rolfsii* pertencentes aos diferentes grupos de compatibilidade micelial (GCMs) diferiram na virulência a feijão-caupi, feijão-comum, algodão, gergelim, girassol e soja.
5. A cultura do algodão demonstrou potencial para ser utilizada na rotação com feijão-caupi ou feijão-comum;
6. O manejo da doença com base unicamente na rotação de culturas parece inviável devido à susceptibilidade de uma ampla gama de hospedeiras aos grupos de compatibilidade micelial (GCMs) identificados nas áreas amostradas;
7. As sequências dos genes EF1- α e RPB2 combinadas diferenciam GCMs em populações de *S. rolfsii* em feijão-caupi e feijão-comum.