

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Caracterização, transmissão, reação de cultivares e sensibilidade a fungicidas de *Colletotrichum plurivorum* associado à antracnose da soja

Renata Rebellato Linhares de Castro

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2018**

Renata Rebellato Linhares de Castro
Engenheira Agrônoma

**Caracterização, transmissão, reação de cultivares e sensibilidade a fungicidas de
Colletotrichum plurivorum associado à antracnose da soja**

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Castro, Renata Rebellato Linhares de

Caracterização, transmissão, reação de cultivares e sensibilidade a fungicidas de *Colletotrichum plurivorum* associado à cultura da soja / Renata Rebellato Linhares de Castro - - Piracicaba, 2018.

94 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Análise filogenética 2. Controle químico 3. *Glycine max* 4. *Colletotrichum truncatum* I. Título

Aos meus pais,

Agassiz Linhares Neto e Maria Angélica Rebellato Linhares,

Por todo amor, dedicação, incentivo e confiança desde sempre. Por nunca cessarem esforços em me permitir viver essa e todas as demais etapas que já fomos vitoriosos. Pela educação e princípios ensinados que formaram meu caráter!

À minha irmã,

Bruna Rebellato Linhares,

Pela amizade, amor e companheirismo. Por todas as viagens que fez para diminuir a distância quando a saudade era difícil de enfrentar!

Ao meu marido,

Saulo Augusto Quassi de Castro

Pelo companheirismo em todos os momentos, amor, incentivo nas horas mais difíceis e pela dedicação em tornar essa batalha possível de ser vencida.

Não há como explicar o quanto significam para mim e o amor que tenho por vocês!

Dedico!

“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria”.

São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e Nossa Senhora, por serem meus guias e protetores nessa caminhada, fonte de força e consolo. Obrigada pelo dom da vida e por intercederem sempre pela minha felicidade.

À toda minha família, pais, irmã, marido, sogros, cunhados, sobrinha, avós, tios e primos, agradeço pelo apoio incondicional, amizade, incentivo, compreensão e amor.

Ao meu marido Saulo Augusto Quassi de Castro, pelo amor e companheirismo, por ser sempre meu melhor amigo e incentivador. Pelo auxílio nos trabalhos e por permanecer ao meu lado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado concedida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), pelos nove anos de ensinamentos e oportunidades.

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP, todos os professores e funcionários, por todos os ensinamentos, amizade, pela oportunidade e condições oferecidas.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, pela oportunidade, paciência, orientação, confiança, amizade e incentivo.

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes, à quem tenho enorme carinho e admiração. Agradeço pelos ensinamentos e por ter despertado em mim o interesse pela fitopatologia. Obrigada pelo carinho, dedicação, apoio e amizade.

À Dra. Maisa Ciampi Guillard, pelo apoio, ensino e auxílio em todas as etapas.

À Flávia Rogério, pelos ensinamentos desde os primeiros dias sobre biologia molecular, pela paciência e dedicação.

Aos amigos e colegas do laboratório de fungos fitopatogênicos: Thaís Boufleur, Flávia Rogério, Renata Brito, Ricardo Felipini e Vanessa Vargas, pela amizade, por todos os ensinamentos e auxílio nas horas que parecia impossível encontrar soluções aos problemas.

Ao André Bueno Gama, Ricardo Feliciano e Sílvia Lourenço, pelo auxílio e ensinamentos nos testes com fungicidas.

À todos os colegas e amigos de departamento, pelo apoio, conversas e momentos de descontração. Em especial aos grandes amigos que a pós me deu como padrinhos, Sarah Galvão e Leonardo Miranda.

E a todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, me acompanharam e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho e colaboraram para minha formação.

À todos, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| Referências..... | 17 |
| 2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E CULTURAL DE AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE DA SOJA (<i>Colletotrichum plurivorum</i> e <i>C. truncatum</i>) NO BRASIL | 19 |
| RESUMO | 19 |
| ABSTRACT | 19 |
| 2.1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2.2. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 2.2.2. Caracterização molecular ou filogenética | 24 |
| 2.2.3. Caracterização cultural..... | 25 |
| 2.2.4. Caracterização morfológica | 26 |
| 2.3. RESULTADOS | 27 |
| 2.3.1. Caracterização molecular ou filogenética | 27 |
| 2.3.2. Caracterização cultural..... | 29 |
| 2.3.3. Caracterização morfológica | 30 |
| 2.4. DISCUSSÃO..... | 33 |
| 2.5. CONCLUSÕES..... | 35 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| 3. AGRESSIVIDADE, TRANSMISSÃO E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A <i>Colletotrichum plurivorum</i> | 41 |
| RESUMO | 41 |
| ABSTRACT | 42 |
| 3.1. INTRODUÇÃO..... | 42 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 3.2.1. Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp..... | 45 |
| 3.2.2. Comparação da agressividade | 45 |
| 3.2.2.1. Inoculação e avaliação | 46 |
| 3.2.2.2. Reisolamento..... | 47 |
| 3.2.3. Teste de transmissão semente-planta | 47 |
| 3.2.3.1. Inoculação das sementes | 47 |
| 3.2.3.2. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes | 48 |
| 3.2.3.3. Determinação da taxa de transmissão | 49 |
| 3.2.4. Teste de transmissão planta-semente | 50 |
| 3.2.5. Reação de cultivares a <i>C. plurivorum</i> | 51 |
| 3.3. RESULTADOS | 52 |
| 3.3.1. Comparação da agressividade | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.2. Teste de transmissão semente-planta..... | 54 |
| 3.3.3. Teste de transmissão planta-semente..... | 56 |
| 3.3.4. Reação de cultivares a <i>C. plurivorum</i> | 57 |
| 3.4. DISCUSSÃO | 60 |
| 3.5. CONCLUSÕES | 63 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| 4. SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE SOJA A FUNGICIDAS | |
| | 69 |
| RESUMO | 69 |
| ABSTRACT | 69 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 70 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS | 72 |
| 4.2.1. Isolados de <i>Colletotrichum</i> | 72 |
| 4.2.2. Sensibilidade <i>in vitro</i> a fungicidas | 72 |
| 4.2.2.1. Crescimento micelial – método de gradiente espiral de diluição | 73 |
| 4.2.2.2. Crescimento micelial – método de incorporação do fungicida ao meio fundente | 74 |
| 4.2.2.3. Germinação de esporos..... | 75 |
| 4.2.3. Caracterização molecular das mutações que conferem resistência a fungicidas | 76 |
| 4.2.3.1. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas inibidores extracelulares de quinona (QoI - estrobilurinas): gene do citocromo b (cytb) | 76 |
| 4.2.3.2. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas benzimidazóis (tiofanato-metílico): gene da beta-tubulina (β -tub) | 78 |
| 4.3. RESULTADOS | 78 |
| 4.3.1. Sensibilidade <i>in vitro</i> a fungicidas..... | 78 |
| 4.3.1.1. Crescimento micelial – método de gradiente espiral de diluição | 78 |
| 4.3.1.2. Crescimento micelial – método de incorporação do fungicida ao meio fundente | 79 |
| 4.3.1.3. Germinação de esporos..... | 81 |
| 4.3.2. Caracterização molecular das mutações que conferem resistência a fungicidas | 83 |
| 4.3.2.1. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas inibidores extracelulares de quinona (QoI - estrobilurinas): gene do citocromo b (cytb) | 83 |
| 4.3.2.2. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas benzimidazóis (tiofanato-metílico): gene da beta-tubulina (β -tub) | 84 |
| 4.4. DISCUSSÃO | 85 |
| 4.5. CONCLUSÕES | 90 |
| REFERÊNCIAS | 90 |

RESUMO

Caracterização, transmissão, reação de cultivares e sensibilidade a fungicidas de *Colletotrichum plurivorum* associado à antracnose da soja

A cultura da soja tem grande importância na segurança alimentar mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor do grão. Dentre os fatores que afetam a produção da cultura, as doenças se destacam e uma das principais é a antracnose. Diferentes espécies de *Colletotrichum* têm sido relacionadas à antracnose da soja, como *C. truncatum*, geralmente reportado como o principal agente causal da doença, e o *C. plurivorum*, anteriormente nomeado *C. cliviae*, uma espécie recentemente descrita e associada ao patossistema. Desta forma, objetivou-se caracterizar de forma filogenética, morfológica e cultural a espécie *C. plurivorum* comparando-a com *C. truncatum*; comparar a agressividade e a capacidade de transmissão semente-planta e planta-semente entre *C. plurivorum* e *C. truncatum* na cultura da soja; testar a reação de diferentes cultivares de soja a *C. plurivorum*; e verificar a sensibilidade *in vitro* de *C. plurivorum* a fungicidas registrados no Brasil para controle da doença. Baseado na análise filogenética Bayesiana, os isolados anteriormente chamados de *C. cliviae* foram reclassificados como *C. plurivorum*, agrupando-se juntamente com novos isolados de coletas recentes. Um isolado foi classificado como *C. musicola*, primeiro relato desta espécie isolada de planta sintomática de soja. Os isolados de *C. plurivorum* apresentaram taxas de crescimento micelial maior do que os de *C. truncatum*, enquanto que a esporulação dos isolados da segunda espécie foi superior aos da primeira. No teste de comparação de agressividade, o isolado de *C. truncatum* se mostrou mais agressivo do que os isolados de *C. plurivorum* à cultivar AMS Tibagi, após inoculações com suspensões de esporos no estágio de crescimento V2-V3. No teste de transmissão semente-planta, as taxas de transmissão de *C. plurivorum* e de *C. truncatum* da semente para a planta variaram entre 37% e 79%. Não foi observada transmissão dos patógenos para os grãos em teste de sanidade quando as plantas foram inoculadas nos estágios R2 e R5, além de não afetarem a produção de vagens e grãos. No teste de reação de cultivares de soja a *C. plurivorum*, a AMS Tibagi foi a que apresentou maior resistência, enquanto que as demais cultivares avaliadas foram afetadas significativamente nos parâmetros de qualidade fisiológica avaliados. Nas avaliações de sensibilidade a fungicidas, isolados de *C. plurivorum* e *C. musicola*, apresentaram insensibilidade, baixa ou média sensibilidade aos fungicidas trifloxistrobina e piraclostrobina. Para esses mesmos fungicidas, os isolados de *C. truncatum* e *C. sojae* foram classificados como altamente sensíveis (CE_{50} menor que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os isolados de *C. plurivorum* e *C. musicola* apresentaram a mutação E198A no gene da beta-tubulina, que confere resistência ao tiofanato-metílico, enquanto que os isolados de *C. truncatum* foram considerados altamente sensíveis ao produto e não apresentaram a mutação no gene analisado. Isolados de *C. plurivorum* e de *C. truncatum*, avaliados no teste de inibição do crescimento micelial, foram considerados altamente sensíveis aos fungicidas difenoconazol e fludioxonil. Identificar e conhecer as características das espécies *Colletotrichum* que afetam uma das principais commodities do Brasil é fundamental para entender a epidemiologia da doença e obter sucesso no desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes.

Palavras-chave: Análise filogenética; Controle químico; *Glycine max*; *Colletotrichum truncatum*

ABSTRACT

Characterization, transmission, reaction of cultivars and sensitivity to fungicide of *Colletotrichum plurivorum* associated with soybean anthracnose

Soybean cultivation has great importance in world food security with Brazil being the second largest grain producer. Among the factors that affect crop production, diseases stand out and one of the main ones is anthracnose. Different species of *Colletotrichum* have been related to soybean anthracnose, such as *C. truncatum*, generally reported as the main causal agent of the disease, and *C. plurivorum*, previously named *C. cliviae* and a recently described pathosystem associated species. The aim of this work was to characterize in a phylogenetic, morphological and cultural way the species *C. plurivorum* comparing it with *C. truncatum*; to compare the aggressiveness and seed-plant and plant-seed transmission capacity between *C. plurivorum* and *C. truncatum* in soybean cultivation; to test the reaction of different soybean cultivars to *C. plurivorum*; and to verify *C. plurivorum* *in vitro* sensitivity to fungicides registered in Brazil for disease control. Based on Bayesian phylogenetic analysis, the strains previously called *C. cliviae* were reclassified as *C. plurivorum*, grouped together with new strains from recent collections. One strain was classified as *C. musicola*, the first report of this species on soybean symptomatic plant. The *C. plurivorum* strains had higher mycelial growth rates than those of *C. truncatum*, whereas the sporulation of the second species was superior. *C. truncatum* was more aggressive than *C. plurivorum* to the AMS Tibagi cultivar after inoculations with spore suspensions at the V2-V3 growth stage. In the seed-plant transmission test, *C. plurivorum* and *C. truncatum* transmission rates from the seed to the plant varied between 37% and 79%. Transmission of the pathogens to the grains was not observed when the plants were inoculated in stages R2 and R5, besides not affecting the production of pods and grains. Among the tested cultivars, ‘AMS Tibagi’ showed the highest resistance to *C. plurivorum*, while the other cultivars were significantly affected in the physiological quality parameters. *C. plurivorum* and *C. musicola* strains showed insensitivity, low or medium sensitivity to trifloxystrobin and pyraclostrobin fungicides. For these same fungicides, *C. truncatum* and *C. sojae* strains were classified as highly sensitive (EC_{50} less than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). *C. plurivorum* and *C. musicola* strains showed the E198A mutation in the beta-tubulin gene, which confers resistance to thiophanate-methyl, whereas *C. truncatum* strains were considered highly sensitive to this fungicide and did not present the mutation in the beta-tubulin gene. *C. plurivorum* and *C. truncatum* strains were considered highly sensitive to difenoconazol and fludioxonil fungicides. Identifying and knowing the characteristics of the *Colletotrichum* species that affect one of the main commodities in Brazil is fundamental to understand the epidemiology of the disease and to succeed in the development of more efficient control strategies.

Keywords: Phylogenetic analysis; Chemical control; *Glycine max*; *Colletotrichum truncatum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Árvore filogenética de 19 isolados de *Colletotrichum* spp., construída por Inferência Bayesiana de forma concatenada dos genes GAPDH, HIS3, ITS, β-tubulina e actina, incluindo sequências de isolados tipos (seguidos por asterisco) e de outras espécies do complexo *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* e *C. orchidearum*. Valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos nós. 28
- Figura 2. Influência de três meios de cultura no crescimento micelial de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. (25°C). Meios de cultura BDA modificado para esporulação (BDAes); BDA sintético (BDAsin) e SNA. *C. truncatum* (CMES1076; CMES1059); *C. plurivorum* (LFN0007; LFN0010; LFN0016; LFN0018; LFN0023 e LFN0025). 30
- Figura 3. Características morfológicas de *Colletotrichum truncatum* (isolado CMES1059) cultivado em meio BDA semissintético ou sobre semente de soja inoculada. (A) acérculo em semente inoculada; (B) acérculo, setas e conídios; (C) conídio em conidióforo; (D) conídios; (E) apressórios. Escalas (A-E) 10 µm. 31
- Figura 4. Características morfológicas de *Colletotrichum plurivorum* (isolado LFN0019) cultivado em meio BDA semissintético ou sobre semente de soja inoculada. (A) acérculo subepidermal em semente inoculada; (B) setas e conídios; (C) conídio em conidióforo; (D) conídios; (E) apressórios. Escalas (A-E) 10 µm. 32
- Figura 5. Comparação da agressividade à soja de isolados de *Colletotrichum plurivorum* e *C. truncatum*. A e B: plantas de soja sadias inoculadas com água destilada; C, D e E: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0025; F, G e H: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0019; I, J e K: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0008; e L, M e N: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado CMES1059..... 53
- Figura 6. Resultados do primeiro teste de reação de cultivares à infecção de *C. plurivorum*. Foram usadas as variedades AMS Tibagi, TMG 7062, M 7739, NS 5909 e BMX 8579, em que as sementes foram inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019. A: primeira contagem do teste de germinação (% vigor); B: segunda contagem do teste de germinação (% germinação); C: índice de velocidade de emergência obtido no teste de emergência; e D: emergência de plântulas (%). *Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas entre cultivares no mesmo isolado e maiúsculas entre isolados na mesma cultivar, em cada gráfico, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 58
- Figura 7. Resultados do segundo teste de reação de cultivares à infecção de *C. plurivorum*. Foram usadas as variedades AMS Tibagi, NS 6909, BS 2606, M 6210 IPRO e BMX 8473, em que as sementes foram inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019. A: primeira contagem do teste de germinação (% vigor); B: segunda contagem do teste de germinação (% germinação); C: índice de velocidade de emergência obtido no teste de emergência; e D: emergência de plântulas (%). *Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas entre cultivares no mesmo isolado e maiúsculas entre isolados na mesma cultivar, em cada gráfico, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 59
- Figura 8. Aspectos das colônias de *Colletotrichum* spp., em meio BDA semissintético, com (1, 10 e 100 µg mL⁻¹) e sem tiofanato-metílico, após cinco dias de crescimento sob luz constante. 80
- Figura 9. Sequências alinhadas de aminoácidos de parte do gene do citocromo b, códons 126 a 150, de espécies de *Colletotrichum* spp. isoladas de plantas de soja. Não foram observadas mutações nos códons 129, 137 e 143, associadas à resistência a estrobilurinas, em nenhum dos isolados. Aminoácidos: A – alanina; F - fenilalanina; G - glicina; I - isoleucina; L - leucina; M - metionina; N - asparagina; P - prolina; Q - glutamina; S - serina; T - treonina; V - valina; Y - tirosina..... 84
- Figura 10. Sequências alinhadas de aminoácidos de parte do gene da beta-tubulina, códons 165 a 171 e 189 a 205, de espécies de *Colletotrichum* spp. isoladas de plantas de soja. Destacado em preto, é possível observar mutações no códon E198A em todos os isolados de *C. plurivorum* e no isolado de *C. musicola*. Aminoácidos: A - alanina; D - ác. aspártico; E - ác. glutâmico; F - fenilalanina; H - histidina; I - isoleucina; L - leucina; N - asparagina; P - prolina; Q - glutamina; S - serina; T - treonina; V - valina..... 85

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados para a análise filogenética, caracterização cultural e morfológica..... | 23 |
| Tabela 2. Médias da taxa de crescimento micelial diário (TCMD – mm dia ⁻¹) de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidas no experimento de caracterização cultural (CV=4,2%)..... | 29 |
| Tabela 3. Médias da esporulação (esporos mm ⁻²) de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidas no experimento de caracterização cultural (CV=66,51%). | 30 |
| Tabela 4. Dimensões de conídios de isolados de <i>Colletotrichum plurivorum</i> e <i>C. truncatum</i> obtidos de plantas sintomáticas de soja | 33 |
| Tabela 5. Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados no trabalho, obtidos de plantas de soja (<i>Glycine max</i>) sintomáticas, e as respectivas sequências de DNA depositadas no NCBI/GenBank. | 45 |
| Tabela 6. Condições utilizadas para a amplificação dos genes GAPDH, HIS3 e TUB2 por PCR. | 47 |
| Tabela 7. Notas de agressividade, segundo a escala de Yang e Hartman (2015), dos isolados de <i>Colletotrichum</i> inoculados em plantas de soja, avaliadas 18 dias após a inoculação. | 52 |
| Tabela 8. Resultado da primeira contagem do teste de germinação (%) de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h). | 55 |
| Tabela 9. Resultado da segunda contagem do teste de germinação (%) de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059 e CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h). | 55 |
| Tabela 10. Resultado do índice de velocidade de emergência (IVE), obtido no teste de emergência de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h). | 55 |
| Tabela 11. Resultado da porcentagem de emergência de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h). | 56 |
| Tabela 12. Resultado da taxa de transmissão (%) semente-planta de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h). | 56 |
| Tabela 13. Médias de produção de vagens e de grãos de plantas de soja, cultivar AMS Tibagi, inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059 e CMES1076. | 57 |
| Tabela 14. Fungicidas selecionados com base em ingredientes ativos registrados no Brasil para o controle de <i>Colletotrichum</i> spp. da soja, que foram avaliados nos ensaios de sensibilidade <i>in vitro</i> | 73 |
| Tabela 15. Sensibilidade (CE50) de isolados de <i>Colletotrichum</i> aos fungicidas difenoconazol e fludioxonil, obtidos utilizando o método de gradiente espiral de diluição. | 79 |
| Tabela 16. Sensibilidade (CE50) de isolados de <i>Colletotrichum</i> ao fungicida piraclostrobina, obtidos utilizando o método de incorporação do fungicida ao meio fundente. | 81 |
| Tabela 17. Porcentagem de germinação de esporos de isolados de <i>Colletotrichum plurivorum</i> em meio de cultura ágar-água com trifloxistrobina (10 µg mL ⁻¹) e sem fungicida, com SHAM, após 18 horas de incubação. | 81 |
| Tabela 18. Porcentagem de germinação de esporos de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura ágar-água com trifloxistrobina e piraclostrobina (100 µg mL ⁻¹) e sem fungicida, com SHAM, após 18 horas de incubação. | 82 |
| Tabela 19. Classificação da sensibilidade de isolados de soja de <i>Colletotrichum</i> spp. aos fungicidas difenoconazol, fludioxonil, tiofanato-metílico, trifloxistrobina e piraclostrobina, segundo a escala de Edgington et al. (1971). . | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|--------------------------------|
| mm | milímetro(s) |
| m | metro(s) |
| RPM | rotações por minuto |
| BDA | batata-dextrose-ágar |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| s | segundo(s) |
| min | minuto(s) |
| h | hora(s) |
| μL | microlitro(s) |
| mL | mililitro(s) |
| L | litro(s) |
| ηg | nanograma(s) |
| g | grama(s) |
| kg | quilograma(s) |
| ton | tonelada(s) |
| μM | micromolar |
| mM | milimolar |
| U | unidade(s) |
| ha | hectare(s) |
| $^{\circ}\text{C}$ | graus Celsius |

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das mais importantes para a segurança alimentar mundial. O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e seguido pela Argentina. Na safra 2016/17, esses três países foram os responsáveis por mais de 81% da produção mundial de soja, a qual foi superior a 351 milhões de ton (Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAOSTAT, 2017).

A cultura tem um papel importante na geração de empregos, além de ser responsável por um grande fluxo de exportações, o que reflete positivamente na balança comercial brasileira. A produção foi impulsionada nos estados do sul do país com o início do cultivo sucessivo trigo/soja e teve crescimento na região do Brasil Central nos anos 70 e 80 (COSTA, 1996; MIYASAKA; MEDINA, 1981). Hoje, os principais estados produtores são Mato Grosso (27,1%), Paraná (16,1%), Rio Grande do Sul (14,4%), Goiás (9,9%) e Mato Grosso do Sul (8%), dados relativos à safra de 2017/2018, em que a produção nacional foi de 119,28 milhões de ton (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018). É uma oleaginosa de grande importância, devido à composição química do seu grão, com alto teor de proteínas e ácidos graxos (GOMES, 1981). Representa um componente de valor na alimentação humana e animal, possibilitando seu uso intensivo pela agroindústria (produção de farelo de soja, utilizado como ração animal e o óleo vegetal), pela indústria química, pela indústria de alimentos e como fonte alternativa de biocombustível (FREITAS, 2011).

A cultura é afetada por diversos fatores bióticos e, entre eles, as doenças se destacam, podendo causar prejuízos consideráveis, o que varia anualmente e regionalmente de acordo com o clima, a suscetibilidade das plantas e a presença e disseminação dos patógenos (EMBRAPA SOJA, 2013). Dentre as principais doenças destaca-se a antracnose, a qual tem como principais fontes de inóculo sementes infectadas e restos culturais. Desta forma, é uma das primeiras doenças a se estabelecer na cultura. Os sintomas podem ser observados na fase inicial, pelo tombamento das plântulas, lesões nos cotilédones e posteriormente em folhas e hastes, sendo na fase reprodutiva os danos mais significantes, causando redução no número de vagens, queda e abertura das vagens imaturas, germinação dos grãos em formação, além de induzir a planta à retenção foliar e haste verde (AMORIM et al., 2016).

Diferentes espécies de *Colletotrichum* têm sido relacionadas à antracnose da soja, e não apenas a espécie *C. truncatum*, geralmente indicada como agente causal da doença (BARBIERI et al., 2017; LEHMAN; WOLF, 1926; MAHMODI et al., 2013; RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012, 2014).

Considera-se, assim, um complexo de espécies responsáveis pela redução da produtividade no Brasil e no mundo, tendo sido relatadas perdas de 90 kg/ha de grãos para cada incremento de 1% da doença no norte do Brasil (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Para o controle da antracnose na soja são recomendados rotação de culturas, manejo adequado do solo e adubação potássica balanceada, espaçamentos maiores e densidades de plantas menores, tratamento de sementes com fungicidas e eficiente controle de plantas daninhas (AMORIM et al., 2016). É pouco citado o uso de cultivares resistentes, apesar de já terem sido identificadas algumas fontes de resistência à doença (COSTA et al., 2009).

O controle químico é amplamente utilizado nos campos de produção da soja, tanto para o tratamento de sementes, quanto em aplicações foliares voltadas, principalmente, ao controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizie*) e das doenças de final de ciclo (DFC). Nas regiões de cerrado, a incidência da doença é recorrente e, ainda assim, existem poucos trabalhos voltados para a eficiência de fungicidas no controle do patógeno (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016; PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016). São necessários mais estudos relacionados à eficiência do controle químico da doença, pois com o uso intenso de determinados ingredientes ativos sem monitoramento e manejo adequado, o risco de resistência às moléculas é alto (FRAC, 2018).

A alta variabilidade na morfologia e biologia de *Colletotrichum* sp. (SUTTON, 1992) dificulta a descrição e diferenciação das espécies, por isso, técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para essa finalidade. A espécie *C. cliviae*, atualmente reclassificada como *C. plurivorum* (DAMM et al., 2019), caracterizada molecularmente e identificada como patogênica à soja em isolados do estado do Mato Grosso (BARBIERI et al., 2017), é um exemplo da diversidade genética que essa doença apresenta. Portanto, identificar e conhecer as características de patogenicidade das espécies *Colletotrichum* que afetam uma das principais *commodities* do Brasil é fundamental para entender a epidemiologia da doença e obter sucesso no desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes.

Assim, os objetivos desse estudo foram: caracterizar de forma morfológica e cultural a espécie *C. plurivorum* comparando-a com *C. truncatum*, comparar a agressividade e a capacidade de transmissão semente-planta e planta-semente entre *C. plurivorum* e *C. truncatum* na cultura da soja; testar a reação de diferentes cultivares de soja a *C. plurivorum*; e verificar a sensibilidade *in vitro* de *C. plurivorum* a fungicidas registrados no Brasil para controle da antracnose da soja.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016.
- BARBIERI, M. C. G. et al. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, 20 set. 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2018. v. 5
- COSTA, I. F. D. DA et al. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 47–50, fev. 2009.
- COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), 1996.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1–46, 1 mar. 2019.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, mar. 2016.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013.
- FRAC. FRAC Code List ©*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). p. 14, 2018.
- FREITAS, M. DE C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–12, 2011.
- GOMES, R. P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1981.
- LEHMAN, S. G.; WOLF, F. A. Soy-bean anthracnose. **Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 4, p. 381–390, 1926.
- MAHMODI, F. et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 841–841, June 2013.
- MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1981.
- PESQUEIRA, A. DA S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203–212, 2016.
- RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. **Plant Disease**, v. 82, n. 8, p. 959–959, Aug. 1998.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. **Plant Disease**, v. 96, n. 11, p. 1699–1699, Nov. 2012.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 32–42, Jan. 2014.

2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E CULTURAL DE AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE DA SOJA (*Colletotrichum plurivorum* E *C. truncatum*) NO BRASIL

RESUMO

A antracnose é uma das doenças que tem causado perdas significativas na cultura da soja. Ela é associada principalmente à espécie *Colletotrichum truncatum*, porém nos últimos anos novas espécies do gênero *Colletotrichum* vêm sendo relatadas como causadoras da antracnose em soja. Estudar as características dessa variedade de agentes causais é um ponto importante no manejo da doença. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização cultural, morfológica e filogenética de isolados de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos, causadores de antracnose da soja no Brasil, comparando-os a isolados de *C. truncatum*. Foi realizada a análise filogenética de 19 isolados brasileiros de *Colletotrichum* por Inferência Bayesiana, com a combinação dos genes ACT, TUB2, GAPDH, HIS3 e ITS. A caracterização cultural foi realizada em três meios de cultura (BDA sintético, BDA semissintético e SNA), a 25°C, com sete isolados de *C. plurivorum* e dois de *C. truncatum*, nos quais foram obtidas a taxa de crescimento micelial diário (mm dia⁻¹) e a esporulação (esporos mm⁻²) dos isolados. Um isolado de cada espécie, *C. truncatum* e *C. plurivorum*, foram submetidos à técnica da microcultura e tiveram a morfologia registrada em imagens. Além disso, foram medidas as dimensões de conídios de seis isolados de *C. plurivorum* e de dois isolados de *C. truncatum*. Os isolados anteriormente chamados de *C. cliviae* foram reclassificados como *C. plurivorum*, juntamente com nove novos isolados que se agruparam no mesmo subclado. Um isolado coletado no estado do Mato Grosso foi classificado como *C. musicola*, primeiro relato dessa espécie isolada de planta sintomática de soja. Os isolados de *C. plurivorum* produziram conídios cilíndricos nos três meios de cultura avaliados e tiveram taxa de crescimento micelial maior do que os isolados de *C. truncatum*, que produziu conídios falcados. A esporulação dos isolados da segunda espécie foi numericamente superior aos da primeira. Os conídios de *C. plurivorum* tiveram como medida média 16,84 x 6,56 µm (comprimento x largura) e os de *C. truncatum* 23,02 x 3,95 µm. É necessário intensificar o monitoramento e identificação das espécies que estão causando antracnose nos diferentes campos de produção de soja, a fim de escolher as melhores formas de manejo dessa emergente doença.

Palavras-chave: *Colletotrichum cliviae*; *Colletotrichum musicola*; *Colletotrichum sojae*; *Glycine max*

ABSTRACT

Anthracnose is one of the diseases that causes significant losses in the soybean crop. It is mainly associated with *Colletotrichum truncatum*, but in recent years new species of the genus *Colletotrichum* have been reported as causal agents of soybean anthracnose. Studying the characteristics of the causal agents is important to manage the disease. This study aimed to perform the cultural, morphological and phylogenetic characterization of *Colletotrichum* strains with cylindrical conidia, causing soybean anthracnose in Brazil, comparing them to *C. truncatum* strains. Phylogenetic analysis of 19 Brazilian *Colletotrichum* strains by Bayesian Inference was performed with the combination of the ACT, TUB2, GAPDH, HIS3 and ITS genes. The cultural characterization was performed

in three culture media (synthetic BDA, semi-synthetic BDA and SNA) at 25° C, with seven *C. plurivorum* isolates and two of *C. truncatum*, through mycelial growth rate (mm day⁻¹) and sporulation (spores mm⁻²). One strains of each species, *C. truncatum* and *C. plurivorum*, were submitted to the microculture technique and their morphology characteristics were recorded. Besides, the conidia dimensions of six *C. plurivorum* and two *C. truncatum* strains were measured. The strains previously identified as *C. cliviae* were reclassified as *C. plurivorum*, along with nine new strains that were grouped in the same subclade. One strainse collected in the state of Mato Grosso was classified as *C. musicola*, being the first report of this species on symptomatic soybean. *C. plurivorum* strains produced cylindrical conidia on the three tested culture media and had a higher mycelial growth rate than *C. truncatum*, which produced falcate conidia. Sporulation of *C. truncatum* was higher than *C. plurivorum* on culture media. The conidia of *C. plurivorum* were 16.84 x 6.56 µm (length x width) and *C. truncatum* 23.02 x 3.95 µm. It is necessary to intensify the monitoring and identification of species that are causing anthracnose in different soybean production fields in order to choose the best strategy to manage this emergent disease.

Keywords: *Colletotrichum cliviae*; *Colletotrichum musicola*; *Colletotrichum sojae*; *Glycine max*

2.1. Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* (Linnaeus) Merrill) apresenta grande importância no mercado alimentar mundial e, principalmente, para a economia do Brasil, segundo maior produtor do grão (Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAOSTAT, 2017). Reduções na produtividade ocorrem devido principalmente às doenças, as quais podem ser responsáveis por perdas de até 100% da produção (GODOY et al., 2016). Dentre elas, a antracnose tem causado perdas significativas quando as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento (EMBRAPA SOJA, 2013).

A antracnose pode afetar a cultura da soja em qualquer estádio de desenvolvimento. Além de morte das plântulas, causa lesões escuras irregulares, formando depressões nas nervuras das folhas (face abaxial), hastes e vagens. As vagens infectadas no estádio inicial de formação adquirem coloração castanho-escuro a negras e ficam retorcidas. Na fase de granação, as lesões evoluem de estrias para manchas negras que podem atingir toda a vagem (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999), causando redução do número e, consequentemente, retenção foliar e haste verde (GODOY et al., 2016).

A primeira ocorrência da antracnose foi em 1917 na China (TIFFANY, 1951) e, desde então, tem sido relatada nas regiões de cultivo da soja associada principalmente à espécie *Colletotrichum truncatum* (DAMM et al., 2009), anteriormente denominado *C. dematium* var. *truncatum* (SINCLAIR, 1982). Outras espécies de *Colletotrichum* já foram descritas como

agente causal da doença, dentre elas *Glomerella glycines* (LEHMAN; WOLF, 1926), *C. graminicola* (MORDUE, 1967), *C. coccodes* (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) (CHEN et al., 2006; MAHMODI et al., 2013), *C. chlorophyti* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012), *C. incanum* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014), *C. destructivum* (DAMM et al., 2014) e, recentemente, *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017). O gênero *Colletotrichum* é considerado pela comunidade internacional de fitopatologistas um dos dez fungos fitopatogênicos de maior importância, devido a sua onipresença e seu potencial de destruição (DEAN et al., 2012).

C. cliviae foi descrito pela primeira vez por Yang et al. (2009) como causador de antracnose em clívia (*Clivia miniata*) e em orquídeas (*Arundina graminifolia* e *Cymbidium hookerianum*) na China (YANG et al., 2011). Seu espectro de hospedeiros foi recentemente estendido, incluindo *Cattleya* sp., *Calamus thwaitesii*, *Phaseolus* sp., *Saccharum* sp. (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2013), *Cymbidium pendulum* (CHOWDAPPA et al., 2014), *Mangifera indica* (manga) (VIEIRA et al., 2014), *Camellia sinensis* (LIU et al., 2015), *Capsicum* spp. (pimenta) (DIAO et al., 2017; SAINI; GUPTA; ANANDALAKSHMI, 2017), *Zamioculcas zamiifolia* (ZHOU; LI, 2017), *Phaseolus lunatus* L. (feijão-fava) (SOUSA et al., 2018), *Myrianthus arboreus* e *Citrus limon* (limão-siciliano) (DOUANLA-MELI; UNGER; LANGER, 2018). Damm et. al. (2019) reclassificaram os isolados já descritos da espécie *C. cliviae* em duas novas espécies, *C. cliviicola* e *C. plurivorum*. Em *C. cliviicola*, não foram observadas estruturas de reprodução sexuada e os isolados agrupados nessa espécie só foram identificados na cultura clívia. Os demais isolados foram agrupados em clados de *C. plurivorum*, nos quais foram observadas estruturas de reprodução sexuada e assexuada, causando doenças em diversas culturas.

A forma assexuada do que hoje é considerado *C. cliviicola* foi observada por Yang et al. (2009) no hospedeiro *Clivia miniata*. Enquanto que a forma assexuada do que hoje se conhece como *C. plurivorum* foi descrita por Saini et. al. (2017) de isolados de frutos de pimenta (*Capsicum* sp.) e, também, por Barbieri et al. (2017) em isolados de soja. Liu et al. (2015) relataram a ocorrência da forma sexuada da espécie *C. cliviae* em folhas destacadas de *Camellia sinensis*. Na haste de *Anthriscus* foram observados ascos globosos de coloração marrom a preta, cobertos por micélio aéreo escasso e branco, com parede externa composta por células angulosas achatadas. Ascósporos com arranjos uni ou bisseriados, hialinos, asseptados, de paredes lisas, com forma alantoide, elipsoidal ou ovoide com extremidades arredondadas, medindo $11\text{--}16.5 \times 4\text{--}6.5 \mu\text{m}$ (comprimento x largura). Este isolado foi reclassificado por Damm et. al. (2019) como *C. plurivorum*.

Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização cultural, morfológica e filogenética de isolados de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos, causadores de antracnose da soja no Brasil, comparando-os a isolados de *C. truncatum*.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados neste trabalho, listados na Tabela 1, provêm de isolados monospóricos preservados em fragmentos de papel filtro, armazenados em ultrafreezer a -80°C, do laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ-USP.

Em função da nova classificação proposta para isolados anteriormente identificados como *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017) e reclassificados como *C. plurivorum* (DAMM et al., 2019), foram analisados filogeneticamente os isolados de *C. cliviae* LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025 além do isolado LFN0009, classificado inicialmente como *Glomerella glycines* (BARBIERI; CIAMPI-GUILLARDI; MASSOLA, 2015). Foram também utilizados neste estudo os isolados CMES1059 e CMES1076 de *C. truncatum*, previamente caracterizados por Rogério et al. (2017).

Além disso, novos isolados de *Colletotrichum* exibindo conídios cilíndricos (LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053, LFN0074, LFN0088, LFN0104, LFN0116, LFN0145 e LFN0146), coletados de plantas sintomáticas de soja nos estados brasileiros de Mato Grosso e Goiás, nos anos de 2016 e 2017, foram caracterizados molecularmente neste trabalho.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados para a análise filogenética, caracterização cultural e morfológica. (continua)

| Espécie | Código | Hospedeiro | Origem | Acesso GenBank | | | | |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | GAPDH | HIS3 | TUB2 | ACT |
| <i>C. brevisporum</i> | CBS512.75 | <i>Carica papaya</i> | Austrália | MG600761 | MG600821 | MG600907 | MG601028 | MG600965 |
| | CBS129957 | <i>Anthurium</i> sp. | Tailândia | MG600762 | MG600822 | MG600908 | MG601029 | MG600966 |
| | BCC38876* | <i>Neoregalia</i> sp. | Tailândia | JN050238 | JN050227 | - | JN050244 | JN050216 |
| <i>C. cacao</i> | CBS119297* | <i>Theobroma cacao</i> | Costa Rica | MG600772 | MG600832 | MG600916 | MG601039 | MG600976 |
| <i>C. cattleyicola</i> | CBS170.49* | <i>Cattleya</i> sp. | Bélgica | MG600758 | MG600819 | MG600905 | MG601025 | MG600963 |
| <i>C. cliviicola</i> | CBS 125375* | <i>Clivia miniata</i> | China | MG600733 | MG600795 | MG600892 | MG601000 | MG600939 |
| | CSSS2 | <i>Clivia miniata</i> | China | GU109480 | GU085868 | - | GU085870 | GU085862 |
| | CBS 133705 | <i>Clivia</i> sp. | África do Sul | MG600732 | MG600794 | MG600891 | MG600999 | MG600938 |
| <i>C. coelogynes</i> | CBS 132504* | <i>Coelogyne</i> sp. | Alemanha | MG600713 | MG600776 | MG600882 | MG600980 | MG600920 |
| <i>C. dracaenophilum</i> | CBS 118200 | <i>Dracaena sanderana</i> | China | MG600710 | MG600773 | MG600879 | MG600977 | MG600917 |
| | CBS 118199* | <i>Dracaena sanderana</i> | China | JX519222 | JX546707 | JX546756 | JX519247 | JX519238 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | CBS 112999* | <i>Citrus sinensis</i> | Itália | JQ005152 | JQ005239 | JQ005413 | JQ005587 | JQ005500 |
| <i>C. lobatum</i> | IMI 79736* | <i>Piper catalpaefolium</i> | Trinidad e Tobago | MG600768 | MG600828 | MG600912 | MG601035 | MG600972 |
| <i>C. magnum</i> | CBS 519.97* | <i>Citrullus lanatus</i> | EUA | MG600769 | MG600829 | MG600913 | MG601036 | MG600973 |
| <i>C. merremiae</i> | CBS 124955* | <i>Merremia umbellata</i> | Panamá | MG600765 | MG600825 | MG600910 | MG601032 | MG600969 |
| <i>C. musicola</i> | CBS 132885* | <i>Musa</i> sp. | México | MG600736 | MG600798 | MG600895 | MG601003 | MG600942 |
| | CBS 127557 | <i>Musa</i> sp. | México | MG600737 | MG600799 | MG600896 | MG601004 | MG600943 |
| | LFN0074 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK142674 | MK163893 | MK142675 | - |
| <i>C. orchidearum</i> | CBS 135131* | <i>Dendrobium nobile</i> | Holanda | MG600738 | MG600800 | MG600897 | MG601005 | MG600944 |
| | CGMCC 3.14982* | <i>Monstera deliciosa</i> | China | KX853166 | KX893585 | - | KX893581 | KX893577 |
| | MAFF 240504 | <i>Vanda</i> sp. | Japão | MG600748 | MG600809 | - | MG601015 | MG600953 |
| | CBS 136877 | <i>Dendrobium nobile</i> | Holanda | MG600739 | MG600801 | MG600898 | MG601006 | MG600945 |
| <i>C. panamense</i> | CBS 125386* | <i>Merremia umbellata</i> | Panamá | MG600766 | MG600826 | MG600911 | MG601033 | MG600970 |
| <i>C. piperis</i> | IMI 71397, CPC 21195* | <i>Piper nigrum</i> | Malásia | MG600760 | MG600820 | MG600906 | MG601027 | MG600964 |
| <i>C. plurivorum</i> | MAFF243073 | <i>Amorphophallus rivieri</i> | Japão | MG600730 | MG600793 | - | MG600997 | MG600936 |
| | MAFF238875 | <i>Glycine max</i> | Japão | MG600725 | MG600788 | - | MG600992 | - |
| | CBS125473 | <i>Coffea</i> sp. | Vietnam | MG600717 | MG600780 | MG600886 | MG600924 | MG600984 |
| | CBS132443 | <i>Gossypium</i> sp. | Brasil | MG600719 | MG600782 | MG600888 | MG600986 | MG600926 |
| | CBS132444 | <i>Gossypium</i> sp. | Brasil | MG600720 | MG600783 | MG600889 | MG600987 | MG600927 |
| | CBS903.69 | <i>Phaseolus lunatus</i> | Benin | MG600721 | MG600784 | MG600890 | MG600988 | MG600928 |
| | CBS125474* | <i>Coffea</i> sp. | Vietnam | MG600718 | MG600781 | MG600887 | MG600985 | MG600925 |
| | LJTJ30* | <i>Capsicum annuum</i> | China | KP748221 | KP823800 | - | KP823853 | KP823741 |
| | CMM3742 | <i>Mangifera indica</i> | Brasil | KC702980 | KC702941 | - | KC992327 | KC702908 |
| | UTFC261 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | MG600722 | MG600785 | - | MG600989 | MG600929 |
| | LFN0007 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | MK142672 | MK139900 | KT696310 | MK139911 | KT696274 |
| | LFN0008 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696336 | KT696289 | KT696311 | KT696282 | KT696275 |
| | LFN0010 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696337 | KT696290 | KT696312 | KT696283 | KT696276 |
| | LFN0016 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | MK142673 | MK139901 | KT696313 | KT696284 | KT696277 |
| | LFN0018 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696338 | KT696291 | KT696314 | KT696285 | KT696278 |
| | LFN0019 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696339 | KT696292 | KT696315 | KT696286 | KT696279 |
| | LFN0023 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696340 | KT696293 | KT696316 | MK139912 | - |
| | LFN0025 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696341 | KT696294 | KT696317 | KT696287 | KT696280 |
| | LFN0039 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139902 | MK139922 | MK139913 | - |
| | LFN0045 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139903 | MK139923 | MK139914 | - |

Tabela 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados para a análise filogenética, caracterização cultural e morfológica.
(conclusão)

| Espécie | Código | Hospedeiro | Origem | Acesso GenBank | | | | |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------|----------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | GAPDH | HIS3 | TUB2 | ACT |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0051 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139904 | MK139924 | MK139915 | - |
| | LFN0053 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139905 | MK139925 | MK139916 | - |
| | LFN0088 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139906 | MK139926 | MK139917 | - |
| | LFN0104 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139907 | MK139927 | MK139918 | - |
| | LFN0116 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | - | MK139908 | MK139928 | MK139919 | - |
| | LFN0145 | <i>Glycine max</i> | Brasil/GO | - | MK139909 | MK139929 | MK139920 | - |
| | LFN0146 | <i>Glycine max</i> | Brasil/GO | - | MK139910 | MK139930 | MK139921 | - |
| <i>C. sojae</i> | CBS 128510 | <i>Medicago sativa</i> | EUA | MG600751 | MG600812 | MG600901 | MG601018 | MG600956 |
| | CBS 134.87 | <i>Glycine max</i> | Itália | MG600752 | MG600813 | MG600902 | MG601019 | MG600957 |
| | CBS 181.81 | <i>Glycine max</i> | Sérvia | MG600753 | MG600814 | MG600903 | MG601020 | MG600958 |
| | CBS 182.81 | <i>Glycine max</i> | Sérvia | MG600754 | MG600815 | MG600904 | MG601021 | MG600959 |
| | ATCC 62257* | <i>Glycine max</i> | EUA | MG600749 | MG600810 | MG600899 | MG601016 | MG600954 |
| | ATCC 11871 | <i>Medicago sativa</i> | EUA | MG600750 | MG600811 | MG600900 | MG601017 | MG600955 |
| | IL18A | <i>Glycine max</i> | EUA | KC110792 | KC110810 | KC110801 | KC110819 | KC110828 |
| | IL26A | <i>Glycine max</i> | EUA | KC110793 | KC110811 | KC110802 | KC110820 | KC110829 |
| | UTFC 301 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | MG600756 | MG600817 | - | MG601023 | MG600961 |
| | LFN0009 | <i>Glycine max</i> | Brasil/MT | KT696354 | KT696295 | KT696318 | KT696288 | KT696281 |
| <i>C. tropicicola 1</i> | CBS 127555, CPC 15927 | <i>Citrus sp.</i> | México | MG600715 | MG600778 | MG600884 | MG600982 | MG600922 |
| <i>C. truncatum</i> | CMES1059 | <i>Glycine max</i> | Brasil/PR | KJ614328 | KJ614374 | KJ614281 | - | - |
| | CMES1076 | <i>Glycine max</i> | Brasil/PR | KJ614316 | KJ614359 | KJ614267 | - | - |
| <i>C. vittalense</i> | CBS 181.82* | <i>Theobroma cacao</i> | Índia | MG600734 | MG600796 | MG600893 | MG601001 | MG600940 |

* Culturas ex-holotípico ou ex-epítipo.

** Isolados que iniciam com a sigla LFN e CMES utilizados nesse estudo estão armazenados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

*** Datas de coleta dos isolados: CMES1059 e CMES 1076 - 2004; LFN0025 - 2009; LFN0008 - 2012; LFN0007, LFN0009, LFN0010, LFN0016 e LFN0018 - 2013; LFN0019 e LFN0023 - 2014; LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053 e LFN0104 - 2016; LFN0074, LFN0088, LFN0116, LFN0145 e LFN0146 - 2017.

**** Isolados em negrito são os mesmos que foram utilizados por Damm et al. (2019).

2.2.2. Caracterização molecular ou filogenética

Para a caracterização molecular ou filogenética, foram incluídos os isolados LFN0007, LFN0008, LFN0009, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025, coletados em 2014, e os novos isolados LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053, LFN0074, LFN0088, LFN0104, LFN0116, LFN0145 e LFN0146, obtidos entre 2016 e 2017.

Foi realizada a extração de DNA genômico de colônias fúngicas cultivadas por 10 dias em meio BDA, a 25°C, com fotoperíodo, seguindo as etapas indicadas no Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Foram realizadas reações de PCR para a amplificação e posterior sequenciamento em ambas as direções do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e uma sequência parcial dos genes histona3 (HIS3) e beta-tubulina (TUB2) para todos os isolados listados acima, utilizando os pares de primers GDF1 + GDR1 (GUERBER et

al., 2003), CYLH3F + CYLH3R (CROUS et al., 2004) e Bt2a + Bt2b (GLASS; DONALDSON, 1995). As sequências foram editadas e alinhadas com o software Sequencher v.4.7.

As filogenias foram reconstruídas com base nos dados de cada região gênica amplificada e nas sequências concatenadas dos genes sequenciados. Para concatenar múltiplos alinhamentos, foi utilizado o programa Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2018). O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi estimado com o programa MrModeltest (NYLANDER, 2004), usando AIC (critério de informação akaike) para cada loco.

Para reconstrução filogenética baseada no alinhamento de múltiplos locos, foi utilizado o método de inferência bayesiana. A análise particionada foi executada duas vezes no programa MrBayes v 3.2.6 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), usando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para gerar árvores filogenéticas com probabilidade *a posteriori*. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente com 1.10^7 gerações. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas pelo programa FigTree v1.4.2 (RAMBAUT, 2018). As análises foram realizadas com a combinação dos genes ACT, TUB2, GAPDH, HIS3 e ITS. Foram incluídas sequências de outras espécies de *Colletotrichum* na análise filogenética, cujos códigos de acesso no NCBI/Genbank encontram-se listados na Tabela 1.

2.2.3. Caracterização cultural

Para a caracterização cultural, foram utilizados sete isolados de *C. plurivorum* (LFN0007, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025) e dois isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076). Os isolados foram cultivados em meio BDA modificado para esporulação (BDAes) (200g de batata, 10 g de dextrose, 16 g de ágar bacteriológico e 1 g de cloreto de sódio L⁻¹ de meio), incubados por 7 dias em BOD a 25°C e com fotoperíodo. Em seguida, discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo os meios BDA sintético (BDAsin) da marca Merck, BDAes e SNA (meio sintético com ágar pobre em nutriente: 1g de KH₂PO₄, 1g de KNO₃, 0,5g MGSO₄·7H₂O, 0,5g KCl, 0,2g glicose, 0,2g sacarose e 20g de ágar L⁻¹ de meio).

As placas foram incubadas em BOD, com fotoperíodo, a 25°C durante 15 dias. Foram feitas medições diárias do diâmetro das colônias durante seis dias (quando pelo menos uma das colônias alcançou os bordos da placa). As médias dos diâmetros foram aplicadas no cálculo da taxa de crescimento micelial diário TCMD (mm dia⁻¹), descrita por Oliveira (1991):

TCMD= $\sum(D-Da)/N$, onde D=diâmetro médio atual da colônia, Da=diâmetro médio da colônia no dia anterior e N=número de dias.

A quantidade de esporos produzidos por milímetro quadrado de colônia foi determinada 15 dias após o início do cultivo, quando os diâmetros ortogonais das colônias foram medidos novamente. As colônias foram acrescidas de 5 mL de água destilada esterilizada (ADE), raspadas gentilmente com o auxílio de um bisturi flambado e as suspensões filtradas em gaze estéril. Os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer (conídios mL^{-1}). O número total de conídios produzidos foi dividido pela área (mm^2) da colônia.

Para os dados de crescimento micelial e esporulação, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente aleatorizado, com três repetições por tratamento, em esquema fatorial de dois fatores (9 isolados x 3 meios de cultura). Os valores foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.2.4. Caracterização morfológica

Isolados de *C. plurivorum* (LFN0019) e *C. truncatum* (CMES1059) foram caracterizados morfológicamente utilizando a técnica de microcultura conforme Cai et al. (2009). Conídios, apressórios e setas foram observados e fotografados em microscópio de luz Axioskop 2 (Zeiss) equipado com contraste interferencial diferencial (DIC). Acérvulos em sementes inoculadas pelo método de restrição hídrica (COSTA et al., 2003) foram observados e fotografados em estereomicroscópio KH87000 (Hirox).

As dimensões médias de 30 conídios de nove isolados *Colletotrichum* spp. (LFN0007, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023, LFN0025, CMES1059 e CMES1076) foram avaliadas após 30 dias de crescimento em meio BDAes, a 25°C e fotoperíodo. A suspensão de conídios foi preparada conforme descrito em 2.2.2. Lâminas semipermanentes dessas suspensões foram confeccionadas e avaliadas em microscópio tipo Axioskop 2 (Zeiss). As imagens foram analisadas no programa Vision Rel 4.9. Os valores foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.3. Resultados

2.3.1. Caracterização molecular ou filogenética

A análise filogenética foi realizada com sequências de 19 isolados brasileiros de *Colletotrichum* (sigla iniciando com LFN), todos com conídios cilíndricos, dentre esses os caracterizados como *C. cliviae* por Barbieri et al. (2017), 18 sequências tipos e 25 representantes das principais espécies dos complexos *C. dracaenophilum*, *C. magnum* e *C. orchidearum* (DAMM et al., 2019), além do outgroup (*C. gloeosporioides* CBS112999), as quais foram obtidas no GenBank, totalizando 63 sequências (Tabela 1). Os limites dos genes foram: ACT 1-277, TUB2 278-737, GAPDH 738-1097, HIS3 1098-1518, ITS 1519-2075, totalizando 2075 caracteres. Para a inferência Bayesiana, os modelos de evolução baseados no critério de AIC foram (HKY+I) para ACT, (HKY+G) para TUB2, (GTR+G) para GAPDH, (HKY+G) para HIS3 e (GTR+I+G) para ITS, os quais foram incluídos na análise particionada.

A análise resultou na detecção de três clados principais, que compreendem os complexos *C. dracaenophilum*, *C. magnum* e *C. orchidearum* (DAMM et al., 2019), e 17 subclados que representam diferentes espécies de *Colletotrichum*. No clado do complexo *C. orchidearum*, os isolados anteriormente classificados como *C. cliviae* (LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025) e nove dos isolados coletados em 2016 e 2017 (LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053, LFN0088, LFN0104, LFN0116, LFN0145 e LFN0146) agruparam-se com 99% de probabilidade no subclado dos isolados de *C. plurivorum*. O isolado LFN0009, primeiramente caracterizado como *G. glycines*, foi reclassificado como *C. sojae*, ao se agrupar com 100% de probabilidade aos demais isolados da referida espécie. Um dos isolados da coleta de 2017 (LFN0074) se agrupou com 99% de probabilidade no subclado de *C. musicola* (Figura 1).

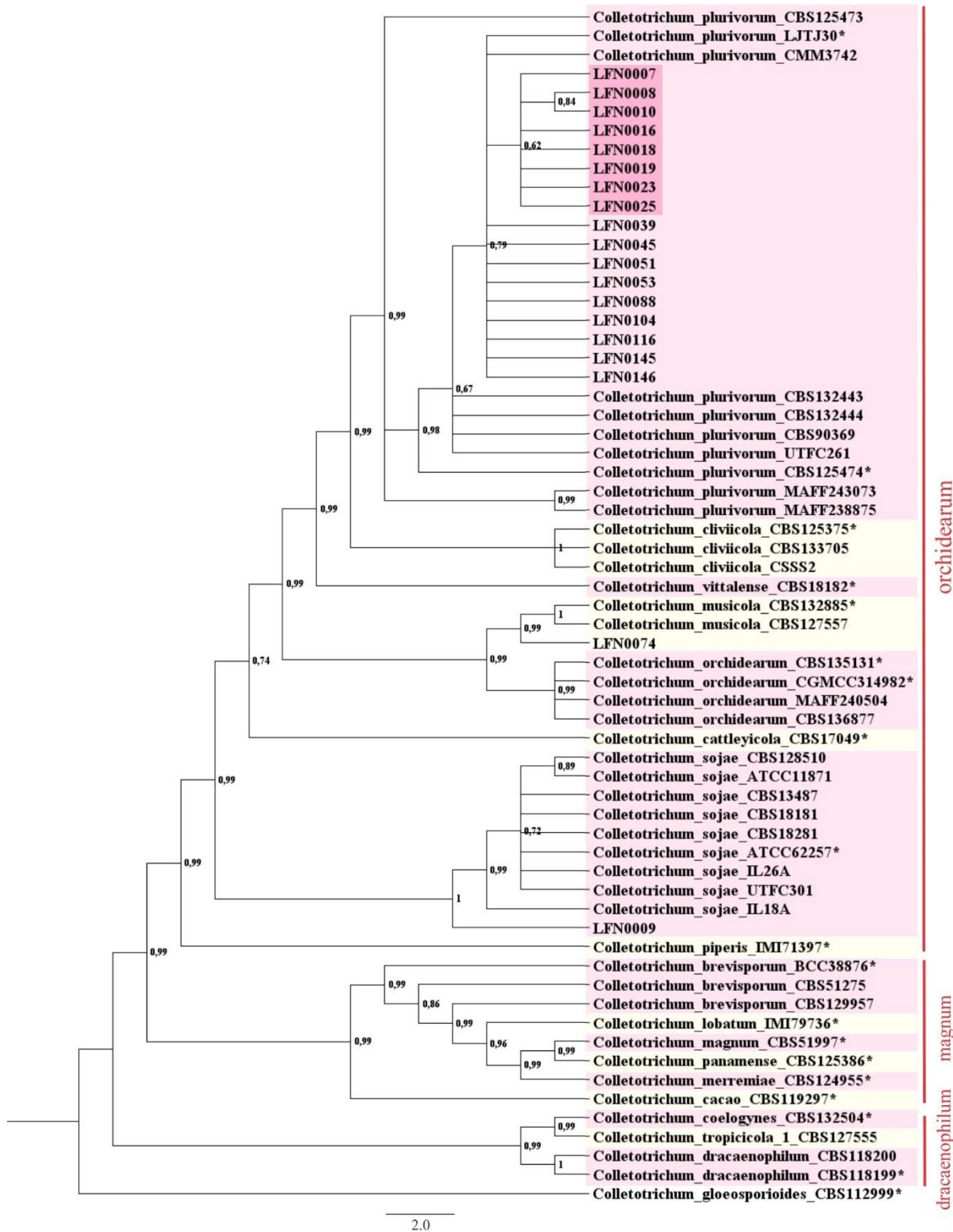


Figura 1. Árvore filogenética de 19 isolados de *Colletotrichum* spp., construída por Inferência Bayesiana de forma concatenada dos genes GAPDH, HIS3, ITS, β-tubulina e actina, incluindo sequências de isolados tipos (seguidos por asterisco) e de outras espécies do complexo *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* e *C. orchidearum*. Valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos nós.

2.3.1. Caracterização cultural

Analizando-se as médias gerais de cada fator, as taxas micelial de crescimento diário dos isolados de *C. truncatum* são menores do que as taxas dos isolados de *C. plurivorum*. Para os isolados de *C. plurivorum*, as médias variaram entre 10,23 e 11,25 mm dia⁻¹, já para os isolados de *C. truncatum* as médias foram de 4,89 e 5,35 mm dia⁻¹ para CMES1059 e CMES1076, respectivamente. Dentre os meios de cultura testados, o maior crescimento micelial, na média geral, foi observado no BDA sintético, seguido do BDA esporulação e por último o meio SNA (Tabela 2, Figura 2).

Considerando as médias gerais de cada fator, as maiores esporulações foram exibidas pelos isolados de *C. truncatum*: 5691,64 e 17122,51 esporos mm⁻² para CMES1059 e CMES1076, respectivamente. A esporulação dos isolados de *C. plurivorum* não diferiu entre si, com as médias variando entre 14,32 e 1100,71 esporos mm⁻². Analisando-se as médias do fator meio de cultura, a esporulação no meio SNA foi menor do que no meio BDAsin, enquanto que o meio BDAses não diferiu dos demais (Tabela 3).

Tabela 2. Médias da taxa de crescimento micelial diário (TCMD – mm dia⁻¹) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidas no experimento de caracterização cultural (CV=4,2%).

| Isolado | BDAses | BDAsin | SNA | Média |
|----------|-----------|----------|----------|-----------|
| LFN0007 | 11,97 aA | 12,22 aA | 9,57 aB | 11,25 a |
| LFN0010 | 10,80 bcb | 12,18 aA | 9,92 aC | 10,97 a |
| LFN0016 | 9,97 cB | 11,40 aA | 9,35 abB | 10,24 c |
| LFN0018 | 9,90 cB | 12,00 aA | 9,07 abC | 10,32 bc |
| LFN0019 | 11,37 abA | 11,78 aA | 9,02 abB | 10,72 abc |
| LFN0023 | 12,03 aA | 12,12 aA | 8,50 bB | 10,88 ab |
| LFN0025 | 10,27 cB | 11,53 aA | 8,90 abC | 10,23 c |
| CMES1059 | 5,60 dA | 6,07 bA | 3,00 dB | 4,89 d |
| CMES1076 | 5,35 dAB | 4,77 cB | 5,93 cA | 5,35 d |
| Média | 9,69 B | 10,45 A | 8,14 C | 9,43 |

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, com 5% de significância.

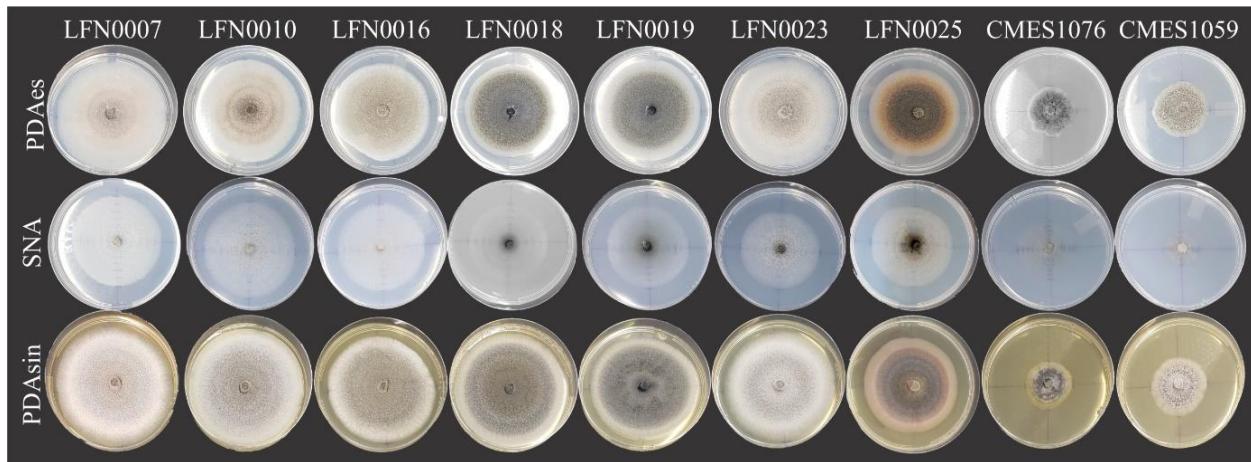


Figura 2. Influência de três meios de cultura no crescimento micelial de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. (25°C). Meios de cultura BDA modificado para esporulação (BDAes); BDA sintético (BDAsin) e SNA. *C. truncatum* (CMES1076; CMES1059); *C. plurivorum* (LFN0007; LFN0010; LFN0016; LFN0018; LFN0023 e LFN0025).

Tabela 3. Médias da esporulação (esporos mm⁻²) de *Colletotrichum* spp. obtidas no experimento de caracterização cultural (CV=66,51%).

| Isolado | BDAes | BDAsin | SNA | Média |
|----------|-------------|-------------|-------------|------------|
| LFN0007 | 71,96 bA | 6,61 cA | 40,02 bA | 39,53 c |
| LFN0010 | 45,52 bA | 4,41 cA | 192,01 bA | 80,65 c |
| LFN0016 | 302,52 bA | 43,32 bcA | 347,68 bA | 231,17 c |
| LFN0018 | 44,42 bA | 1854,12 bcA | 192,67 bA | 697,07 c |
| LFN0019 | 69,76 bB | 2863,68 bA | 368,68 bAB | 1100,71 c |
| LFN0023 | 35,61 bA | 1,84 cA | 5,51 bA | 14,32 c |
| LFN0025 | 12,48 bA | 2,20 cA | 79,67 bA | 31,45 c |
| CMES1059 | 8710,29 aA | 2973,82 bcB | 5390,81 aAB | 5691,64 b |
| CMES1076 | 13634,18 aB | 36197,57 aA | 1535,78 abC | 17122,51 a |
| Média | 2547,42 AB | 4883,06 A | 905,87 B | 2778,78 |

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, com 5% de significância.

2.3.2. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica de isolados representativos dos subclados das espécies *C. truncatum* (CMES1059) e *C. plurivorum* (LFN0019) foi realizada com o uso da técnica de microcultura (CAI et al., 2009).

Os conídios do isolado CMES1059 são falcados, hialinos e unicelulares (22,56 x 4,23 µm), produzidos em acérvulos de coloração preta ou a partir de células conidiogênicas. Os acérvulos possuem setas com tamanho médio de 143 x 7 µm (comprimento x largura da base). Os apressórios são isolados ou em cadeias, com formato predominante obovoide, truncado ou

ovoide, de bordas lisas ou onduladas e coloração marrom escuro, com tamanho médio de 13 x 7 μm (comprimento x largura) (Figura 3).

O isolado LFN0019 de *C. plurivorum* possui conídios cilíndricos, hialinos e unicelulares. Produz conídios em células conidiogênicas e também em acérvulos subepidermais (observados em sementes de soja inoculadas com o fungo) (Figura 4). Os acérvulos possuem setas de coloração preta com tamanho médio de 62 x 5 μm , com base elipsoidal. Os apressórios são individuais e possuem formato predominante obovoide, com bordas lisas ou onduladas, sendo encontrados também em formato ovoide ou truncado, de coloração marrom médio (Figuras 3 e 4).

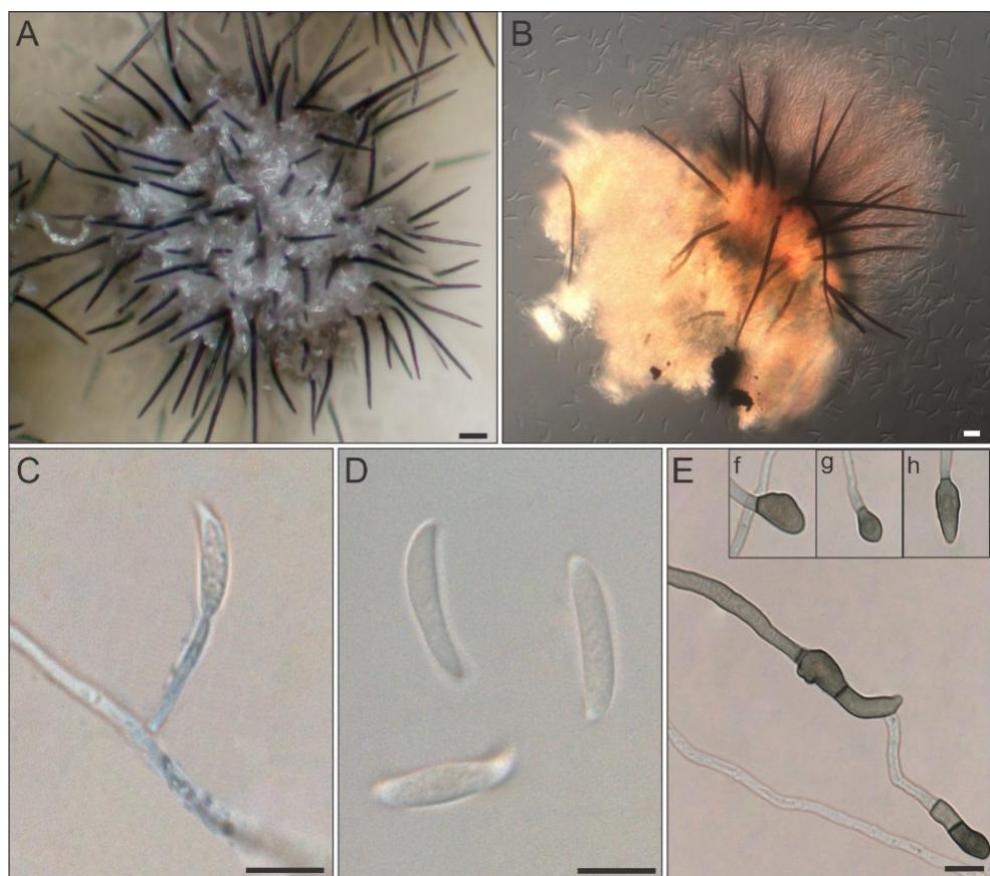


Figura 3. Características morfológicas de *Colletotrichum truncatum* (isolado CMES1059) cultivado em meio BDA semissintético ou sobre semente de soja inoculada. (A) acérvulo em semente inoculada; (B) acérvulo, setas e conídios; (C) conídio em conidióforo; (D) conídios; (E) apressórios. Escalas (A-E) 10 μm .



Figura 4. Características morfológicas de *Colletotrichum plurivorum* (isolado LFN0019) cultivado em meio BDA semissintético ou sobre semente de soja inoculada. (A) acérculo subepidermal em semente inoculada; (B) setas e conídios; (C) conídio em conidióforo; (D) conídios; (E) apressórios. Escalas (A-E) 10 μm .

No ensaio conduzido para a medição dos conídios, o isolado LFN0023 não apresentou a formação de conídios em meio BDAes, a 25°C e fotoperíodo, somente foram observados ascósporos na suspensão de esporos. Os ascósporos tinham em média 16,42 x 5,38 μm (comprimento x largura). Essas medidas não foram utilizadas na estatística comparativa das dimensões de conídios dos demais isolados.

Os conídios de *C. plurivorum* variam em comprimento e largura conforme o isolado analisado, tendo em média 16,84 x 6,56 μm (comprimento x largura), enquanto que os conídios dos isolados de *C. truncatum* têm em média 23,02 x 3,95 μm (Tabela 4). Em comprimento, os conídios dos isolados de *C. truncatum* são maiores do que os de *C. plurivorum*, característica já esperada devido à diferença na morfologia, enquanto que em largura os conídios do primeiro são menores do que os do segundo.

Tabela 4. Dimensões de conídios de isolados de *Colletotrichum plurivorum* e *C. truncatum* obtidos de plantas sintomáticas de soja.

| Isolado | Comprimento (μm) | Largura (μm) |
|----------|-------------------------------|---------------------------|
| LFN0007 | 20,63 b | 7,83 a |
| LFN0010 | 18,51 c | 7,42 a |
| LFN0016 | 17,17 c | 6,42 b |
| LFN0018 | 12,89 d | 5,66 c |
| LFN0019 | 13,39 d | 5,83 bc |
| LFN0025 | 18,42 c | 6,17 bc |
| CMES1059 | 22,56 a | 4,23 d |
| CMES1076 | 23,49 a | 3,68 d |
| Média | 18,38 | 5,91 |
| CV (%) | 11,8 | 13,66 |

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

2.4. Discussão

Além das espécies já conhecidas por anos como causadoras da antracnose da soja, por exemplo, *C. truncatum* (*C. dematium* var. *truncatum*) (DAMM et al., 2009; SINCLAIR, 1982), *G. glycines* (LEHMAN; WOLF, 1926) e *C. graminicola* (MORDUE, 1967), diversos trabalhos vêm relatando a ocorrência de novas espécies de *Colletotrichum* associadas à doença: *C. coccodes* (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) (CHEN et al., 2006; MAHMODI et al., 2013), *C. chlorophyti* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012), *C. incanum* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014) e *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017). No trabalho recente de Damm et al. (2019), a espécie *C. cliviae* foi reclassificada em duas espécies *C. cliviicola* e *C. plurivorum*. A espécie *C. plurivorum* pode ser identificada por sequências dos genes GAPDH, HIS3 e TUB2 com poucos nucleotídeos de diferença em cada gene em relação ao *C. cliviicola*.

Com a nova classificação, os primeiros isolados de *C. cliviae* relatados como causadores da antracnose na cultura da soja no Brasil (BARBIERI et al., 2017), coletados no estado de Mato Grosso, foram renomeados como *C. plurivorum*. Além disso, no presente trabalho, outros isolados coletados nos anos de 2016 e 2017 nos estados de Goiás e Mato Grosso foram agrupados com os isolados de *C. plurivorum*, mostrando que a espécie permanece presente em diferentes campos produtores da cultura no país. Um isolado de *C. cliviae*, provavelmente *C. plurivorum* na atual classificação, foi reportado também no estado do Tocantins na cultura da soja (DIAS et al., 2018). Além desses, já foram descritos isolados de *C. cliviae* em outros estados do país, como Pernambuco, de forma endofítica em *Mangifera*

indica (VIEIRA et al., 2014), além de Piauí e Alagoas, na cultura *Phaseolus lunatus* L. (SOUSA et al., 2018).

Outro isolado de soja (LFN0009), anteriormente denominado *G. glycines*, foi renomeado como *C. sojae* no trabalho de Damm et al. (2019), resultado que se confirmou na filogenia do presente trabalho. *G. glycines* era associado à forma assexuada de *C. destructivum*, porém no estudo em referência, alguns isolados anteriormente nomeados como *G. glycines* (ATCC 62257 de *G. max* and ATCC 11871 de *Medicago*) (MANANDHAR; HARTMAN; SINCLAIR, 1986) não eram intimamente relacionados a *C. destructivum* (DAMM et al., 2014). Esses isolados, que formam tanto esporos assexuados quanto sexuados, mas que diferem de *C. destructivum* e das demais espécies já classificadas, foram descritos como a nova espécie *C. sojae*. Essa nova espécie ocorre principalmente em hospedeiros da família Fabaceae (*Glycine*, *Medicago*, *Phaseolus*, *Vigna*), mas também em Amaranthaceae, Asteraceae, Solanaceae e Orchidaceae (DAMM et al., 2019).

Até então, não havia sido relatada a ocorrência da espécie *C. musicola* na soja. Essa espécie pertence, assim como as demais aqui citadas (*C. plurivorum* e *C. sojae*), ao complexo de espécies *C. orchidearum*, tendo sido relatada na cultura *Musa* sp. (DAMM et al., 2019). Desta forma, o isolado LFN0074, caracterizado molecularmente neste trabalho, representa o primeiro relato do isolamento de *C. musicola* de plantas sintomáticas de soja. Para que seja considerado um agente causal da antracnose na soja, mais estudos precisam ser desenvolvidos com o isolado, como a comprovação de patogenicidade na cultura.

As espécies caracterizadas cultural e morfologicamente nesse estudo, *C. truncatum* e *C. plurivorum*, diferem significativamente em crescimento micelial nos três meios de cultura (BDAes, BDAsin e SNA) e também no formato e tamanho dos conídios. O crescimento micelial dos isolados de *C. truncatum*, à 25°C no meio BDAsin, é de 4,8 a 6,07 mm dia⁻¹, valores inferiores ao encontrado no trabalho de Rogério et al. (2017), que apresentaram crescimento de 7,4 a 8,9 mm dia⁻¹, no qual foram avaliados, dentre outros, os mesmos isolados desse trabalho. A taxa de crescimento micelial de *C. truncatum* é menor do que a da espécie *C. plurivorum*, a qual teve 11,89 mm dia⁻¹ como taxa de crescimento micelial médio a 25°C no meio BDAsin. No trabalho de Saini et. al. (2017), a taxa de crescimento micelial de *C. plurivorum* de isolados obtidos em frutos de pimenta (*Capsicum* sp.) a 28°C, ciclos de 16/8h de claro/escuro, foi de 15 mm dia⁻¹, maior do que no presente trabalho. A diferença na taxa de crescimento micelial entre as duas espécies mencionadas também foi observada por Dias et al. (2018), em que a 27°C, no meio BDAsin, um isolado de *C. plurivorum* cresceu 13,86 mm dia⁻¹, enquanto que dois isolados de *C. truncatum* cresceram em média 7,36 mm dia⁻¹. A avaliação do crescimento micelial

continua sendo utilizada em análises taxonômicas do gênero *Colletotrichum* por ser considerada uma ferramenta útil na distinção de algumas espécies, apesar do crescimento no uso de caracterizações moleculares (CAI et al., 2009; SUTTON, 1992). Já na avaliação da esporulação, os isolados da espécie *C. plurivorum* esporularam menos do que os de *C. truncatum* nos três meios de cultura avaliados. Novos métodos que estimulem a esporulação dos isolados de *C. plurivorum* precisam ser estudados, para auxiliar em estudos futuros que envolvam essa espécie.

Além da taxa de crescimento micelial diferenciado entre as duas espécies, o formato dos conídios é uma característica relevante na classificação das mesmas. Os conídios dos isolados de *C. truncatum* são falcados, semelhantes aos das espécies *C. graminicola* (MORDUE, 1967), *C. chlorophyti* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012) e *C. incanum* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014), com tamanho médio de 23,02 x 3,95 µm (comprimento x largura). Já os conídios de *C. plurivorum* são cilíndricos (4,9-20,63 x 2,26-7,83 µm), assim como os das espécies *C. coccodes* (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998), *C. gloeosporioides* (CHEN et al., 2006; MAHMODI et al., 2013), *C. destructivum* (DAMM et al., 2014), *C. musicola* e *C. sojae* (DAMM et al., 2019).

Devido a esse complexo de espécies causando antracnose na cultura da soja, é necessário reforçar o monitoramento das espécies que estão associadas à doença nos diferentes campos de produção da cultura. Essa diversidade encontrada pode estar associada a diferenças na epidemiologia e no controle da doença, devido ao variado comportamento cultural, acarretando possíveis diferenças na sensibilidade a fungicidas, reação das cultivares de soja, entre outras características específicas de cada patógeno.

2.5. Conclusões

Isolados de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos, anteriormente nomeados *C. cliviae*, foram reclassificados como *C. plurivorum*. Nove novos isolados de soja sintomática dos estados do Mato Grosso e Goiás foram classificados como *C. plurivorum*. Um isolado coletado no estado do Mato Grosso foi classificado como *C. musicola*, sendo este o primeiro relato dessa espécie isolada de planta sintomática de soja.

No teste de caracterização cultural, os isolados de *C. plurivorum* tiveram taxa de crescimento micelial maior do que os isolados de *C. truncatum* nos três meios de cultura avaliados (BDA sintético, BDA semissintético e SNA), a 25°C, enquanto que a esporulação dos isolados da segunda espécie foi superior aos da primeira. Na medição das dimensões de

conídios, os isolados de *C. plurivorum* tiveram como média 16,84 x 6,56 µm (comprimento x largura) e os de *C. truncatum* 23,02 x 3,95 µm.

Referências

- BARBIERI, M. C. G. et al. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, Sept. 2017.
- BARBIERI, M. C. G.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; MASSOLA, N. S. Caracterização molecular de novas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da soja no Brasil. São Pedro - SP: Anais do 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2015
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CHEN, L. S. et al. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 11–12, p. 654–662, Dec. 2006.
- CHOWDAPPA, P. et al. Multilocus gene phylogeny reveals occurrence of *Colletotrichum cymbidiicola* and *C. cliviae* on orchids in north east India. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 2, p. 327–334, July 2014.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, Oct. 2003.
- CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 415–430, 2004.
- DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. 2009.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, Sept. 2014.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1–46, Mar. 2019.
- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.
- DIAO, Y.-Z. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia**, v. 38, p. 20–37, June 2017.
- DIAS, M. D. et al. Biology, pathogenicity, and haplotype analyses of *Colletotrichum cliviae*: a novel soybean anthracnose agent in warm tropical areas. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 5, p. 439–451, Oct. 2018.

- DOUANLA-MELI, C.; UNGER, J.-G. G.; LANGER, E. Multi-approach analysis of the diversity in *Colletotrichum cliviae* sensu lato. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 3, p. 423–435, Mar. 2018.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–30, Apr. 1995.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5 ed. ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres Ltda, 2016. p. 657–675.
- GUERBER, J. C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 872–895, 2003.
- HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. Fourth edition. ed. St. Paul Minnesota.: APS Press, 1999.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenyBioinformatics**, v.17, 2001. Disponível em: <<http://mrbayes.sourceforge.net>>. Acesso em: 03 set. 2018
- LEHMAN, S. G.; WOLF, F. A. Soy-bean anthracnose. **Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 4, p. 381–390, 1926.
- LIU, F. et al. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 63–86, Dec. 2015.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51**. Disponível em: <<http://www.mesquiteproject.org>>. Acesso em: 03 set. 2018.
- MAHMODI, F. et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 841–841, jun. 2013.
- MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, v. 76, n. 3, p. 282, 1986.
- MORDUE, J. E. M. *Colletotrichum graminicola*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, v. 132, 1967.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2. Program distributed by the author.** Evolutionary Biology Centre, Uppsala University Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plantulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*).** [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 1991.

RAMBAUT, A. **FigTree.** Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 03 set. 2018.

RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. **Plant Disease**, v. 82, n. 8, p. 959–959, Aug. 1998.

ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402–415, Feb. 2017.

SAINI, T. J.; GUPTA, S. G.; ANANDALAKSHMI, R. Detection of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum cliviae* in India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 12, n. 33, p. 1–4, Dec. 2017.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 3, n. 2, p. 194–220, 2013.

SINCLAIR, J. B. **Compendium of soybean diseases.** 2nd ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1982.

SOUSA, E. S. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78–84, Feb. 2018.

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

TIFFANY, L. H. The antracnose complex on soybean. **Review of Applied Mycology**, v. 30, p. 598–599, 1951.

VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 181–202, July 2014.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. **Plant Disease**, v. 96, n. 11, p. 1699–1699, Nov. 2012.

- YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 32–42, 20 Jan. 2014.
- YANG, Y. et al. Colletotrichum Species on Orchidaceae in Southwest China. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229–253, Sept. 2011.
- YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. **Fungal Diversity**, 2009.
- ZHOU, Z.; LI, Y. L. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on *Zamioculcas zamiifolia* in henan province, China. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 838–838, May 2017.

3. AGRESSIVIDADE, TRANSMISSÃO E REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A *Colletotrichum plurivorum*

RESUMO

As doenças na cultura da soja podem ser responsáveis por reduzir a produção em até 100%, dentre essas, a antracnose tem causado perdas significativas quando as condições climáticas são favoráveis. Com a diversidade de espécies do gênero *Colletotrichum* causando antracnose na soja é necessário entender as diferenças entre os agentes causais e como as características de cada um influenciam na epidemiologia da doença. Os objetivos com este trabalho foram comparar a agressividade e a capacidade de transmissão semente-planta e planta-semente entre *C. plurivorum* e *C. truncatum*, e testar a reação de cultivares de soja ao *C. plurivorum*. A agressividade dos isolados das duas espécies foi comparada por meio da inoculação de plantas de soja da cultivar AMS Tibagi no estágio V2-V3 por atomização de suspensões de esporos e avaliadas, após 18 dias, utilizando uma escala de notas de 0 a 5. No teste de transmissão semente-planta, sementes de soja foram inoculadas com dois isolados de *C. plurivorum* (LFN0008 e LFN0019) e dois isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076) pela técnica de restrição hídrica; avaliou-se o efeito na qualidade sanitária e fisiológica das mesmas e a taxa de transmissão dos patógenos para as plântulas. Para verificar a transmissão planta-semente, plantas no estágio R2 e R5 foram inoculadas por atomização com suspensões de esporos dos mesmos isolados utilizados no teste de transmissão semente-planta; avaliou-se a produção de vagens e peso de grãos, além da presença dos patógenos nos grãos por meio do teste de sanidade. Testes de reações de nove cultivares ao *C. plurivorum*, foram realizados por meio da inoculação de sementes com dois isolados (LFN0008 e LFN0019), utilizando-se a técnica da restrição hídrica; avaliou-se o efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes (porcentagem de vigor, germinação e emergência, e índice de velocidade de emergência). No teste de comparação de agressividade, o isolado de *C. truncatum* se mostrou mais agressivo do que os isolados de *C. plurivorum*. No teste de transmissão semente-planta, as taxas de transmissão de *C. plurivorum* e de *C. truncatum* da semente para a planta variaram entre 75% e 79%, exceto para o isolado de *C. plurivorum* LFN0019, que foi de aproximadamente 37%. Não foi observada transmissão dos patógenos para os grãos em teste de sanidade, além de não afetarem a produção de vagens e grãos. No teste de reação de cultivares de soja a *C. plurivorum*, a AMS Tibagi foi a que apresentou maior resistência, pois não teve sua qualidade fisiológica afetada na presença do inóculo, enquanto que as demais cultivares foram afetadas nos parâmetros avaliados. Deve-se ressaltar que epidemias de antracnose da soja podem ocorrer devido ao inóculo inicial ser trazido por sementes infectadas pelo patógeno, sendo necessário evitar essa disseminação utilizando sementes livres de *Colletotrichum*. O uso de cultivares com maior resistência deve ser levado em consideração, já que é um importante aliado no manejo integrado de doenças, principalmente, quando o controle químico não se mostra eficiente.

Palavras-chave: *Colletotrichum cliviae*; *Colletotrichum truncatum*; *Glycine max*; Antracnose

ABSTRACT

Aggressiveness, transmission and reaction of soybean cultivars to *Colletotrichum plurivorum*

Soybean crop diseases can be responsible for yield reduction up to 100%. Among them, anthracnose has caused significant losses when the climate is favorable. As several *Colletotrichum* species are related to soybean anthracnose it is necessary to understand the differences between causal agents and how the characteristics of each species influence the disease epidemiology. The aims of this study were to compare *C. plurivorum* and *C. truncatum* aggressiveness and the seed-plant and plant-seed transmission, and to verify the soybean cultivars reaction to *C. plurivorum*. Aggressiveness of the two species was compared by inoculating soybean plants of AMS Tibagi cultivar in the V2-V3 stage by spraying spore suspensions, following evaluation based on a 0 to 5 grades scale. In the seed-plant transmission test, soybean seeds were inoculated with two *C. plurivorum* strains (LFN0008 and LFN0019) and two *C. truncatum* strains (CMES1059 and CMES1076) by the water restriction technique; the effect on their sanitary and physiological quality and the pathogens transmission rates to the seedlings were evaluated. To verify plant-seed transmission, plants in stage R2 and R5 were inoculated by spore suspensions spraying with the same strains used in the seed-plant transmission test; pods number and grain weight, besides the presence of pathogens in the grains through the sanity test were evaluated. *C. plurivorum* reactions to nine cultivars were carried out by inoculating seeds with two strains (LFN0008 and LFN0019), using the water restriction technique; health and physiological quality of the seeds (vigor, germination and emergence percentage, and emergence rate index) effect were evaluated. *C. truncatum* was more aggressive than *C. plurivorum* in the aggressiveness test. *C. plurivorum* and *C. truncatum* transmission rates from the seed to the plant ranged from 75% to 79%, except for the strain LFN0019, which was approximately 37%. No pathogen transmission was observed from plant to grains under the tested conditions. Besides, inoculations with *C. truncatum* and *C. plurivorum* at the R2 and R5 stages did not affect the number of pods and grains weight. AMS Tibagi was the cultivar that showed the highest resistance, since its physiological quality was not affected after inoculation with *C. plurivorum*, while the other cultivars were affected in the evaluated parameters. It should be emphasized that soybean anthracnose epidemics can occur due to the initial inoculum being transported by infected seeds and it is necessary to avoid this dissemination using *Colletotrichum* free seeds. The use of cultivars with higher resistance must be taken into account, since it is an important strategy in the diseases management, especially when chemical control is not efficient.

Keywords: *Colletotrichum cliviae*; *Colletotrichum truncatum*; *Glycine max*; Anthracnose

3.1. Introdução

A soja (*Glycine max* (Linnaeus) Merrill) é originária da China e foi espalhada pelo mundo por viajantes ingleses e orientais (HYMOWITZ, 1990). No Brasil, a cultura foi introduzida na Bahia, em 1882, e passou a ser cultivada em maior escala no Rio Grande do Sul, de onde ocorreu a primeira exportação brasileira de soja, com cerca de 18 mil ton. A produção

foi impulsionada nos estados do sul do país com o início do cultivo sucessivo trigo/soja e teve crescimento na região do Brasil Central nos anos 70 e 80 (COSTA, 1996; MIYASAKA; MEDINA, 1981).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e seguido pela Argentina. Na safra 2016/17, esses três países foram os responsáveis por mais de 81% da produção mundial de soja, a qual foi superior a 351 milhões de ton (Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAOSTAT, 2017). Na safra de 2017/2018, a produção nacional atingiu 119,28 milhões de ton, de acordo com o último levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Nesse cenário, os principais estados produtores são Mato Grosso (27,1%), Paraná (16,1%), Rio Grande do Sul (14,4%), Goiás (9,9%) e Mato Grosso do Sul (8%). A produtividade média da safra foi de 3.394 kg ha⁻¹, valor 0,9% superior ao da safra 2016/2017. A área cultivada de 35,149 milhões de ha foi maior do que a da safra anterior, de 33,909 milhões de ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018).

Reduções ou o não incremento na produtividade ocorrem mesmo com o uso crescente de novas tecnologias nos campos. Uma das razões são as condições climáticas adversas que coincidem com as fases críticas de desenvolvimento da cultura. Concomitante a isso, a ocorrência de doenças é outro fator limitante na obtenção de maiores rendimentos. As doenças na cultura da soja podem ser responsáveis por afetar até 100% da produção (AMORIM et al., 2016) e, dentre essas, a antracnose tem causado perdas significativas quando as condições climáticas são favoráveis (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

No Brasil, a antracnose na soja foi observada pela primeira vez em 1961, no Rio Grande do Sul, e tem sido relatada, desde os anos 1980, com maior frequência nas regiões produtoras do cerrado brasileiro (DIAS et al., 2018). As plantas de soja podem ser afetadas pela doença em todos os estágios de desenvolvimento, atingindo folhas, pecíolos, hastes, vagens e pedicelos; porém, a fase mais destrutiva ocorre em plantas adultas. Quando a transmissão se dá por meio de sementes infectadas, ocorre queda na germinação e morte prematura das plantas (tombamento de pré e pós emergência) (KUCHAREK, 2001). As condições ideais para a ocorrência da antracnose são temperaturas em torno de 28°C a 34°C e alta umidade (ITO, 2013). Além disso, alta população de plantas, deficiência de potássio no solo, infestação e danos de percevejo, monocultura, estreitamento entre linhas e uso de sementes infectadas também são responsáveis pelo aumento da incidência da doença (EMBRAPA SOJA, 2013).

A antracnose na soja, além da morte das plântulas, pode causar lesões escuras, de forma irregular, formando depressões nas nervuras das folhas (face abaxial), nas hastes e

vagens. As vagens infectadas no estádio inicial de formação adquirem coloração castanho-escura a negras e ficam retorcidas. Nas vagens em granação, as lesões evoluem de estrias para manchas negras, podendo atingir toda a vagem. As lesões nas vagens são de forma indefinida, recobertas por acérvulos, característicos pela presença de setas negras que auxiliam na identificação do patógeno. Vagens infectadas no início de sua formação podem não produzir sementes e, em caso de infecções tardias, a qualidade das sementes é afetada (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999).

É importante ressaltar que as principais fontes de inóculo da doença são as sementes infectadas e os restos culturais. O inóculo também pode ser disseminado pelo vento, chuva, insetos e implementos agrícolas (ITO, 2013). Assim, é de grande importância o uso de sementes sadias e de técnicas de manejo integrado, dentre elas a rotação de culturas, o tratamento de sementes, a adequação de populações de plantas, o manejo adequado do solo, o uso de variedades com resistência moderada, já que não existem cultivares de soja resistentes à doença, e o tratamento químico com fungicidas (PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016).

A doença antracnose na soja, apesar de ser comumente associada à *Colletotrichum truncatum*, já foi descrita como sendo causada por outras espécies de *Colletotrichum*, dentre elas *C. graminicola* (MORDUE, 1967), *C. coccodes* (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) (CHEN et al., 2006; MAHMODI et al., 2013), *C. chlorophyti* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012), *C. incanum* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014), *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines*) (DAMM et al., 2014) e, recentemente, por *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017).

A espécie *C. cliviae*, descrita pela primeira vez por Yang et al. (2009) como causador de antracnose em clívia (*Clivia miniata*) e em orquídeas (*Arundina graminifolia* e *Cymbidium hookerianum*) na China (YANG et al., 2011), teve o espectro de hospedeiros estendido nos últimos anos em diferentes países (CHOWDAPPA et al., 2014; DIAO et al., 2017; DOUANLA-MELI; UNGER; LANGER, 2018; LIU et al., 2015; SAINI; GUPTA; ANANDALAKSHMI, 2017; SOUSA et al., 2018; VIEIRA et al., 2014; YANG et al., 2011; ZHOU; LI, 2017). Já a espécie *C. truncatum* pode infectar, também, outras culturas como lentilha, ervilha, grão de bico e feijão (WEIDEMANN; TEBEEST; CARTWRIGHT, 1988).

Damm et. al. (2019) reclassificaram os isolados já descritos da espécie *C. cliviae* em duas novas espécies, *C. cliviicola* e *C. plurivorum*. Na espécie *C. cliviicola*, não foram observadas estruturas de reprodução sexuada e os isolados só foram identificadas na cultura clívia (YANG et al., 2009). Os demais isolados, anteriormente nomeados como *C. cliviae*, foram agrupados em clados de *C. plurivorum*, nos quais foram observadas estruturas de

reprodução sexuada e assexuada, causando doenças em diversas culturas. Portanto, a espécie que causa doença na cultura da soja ficou classificada como *C. plurivorum*.

Com essa diversidade de espécies causando a antracnose na soja é necessário entender as diferenças entre os agentes causais e como as características de cada um influenciam na epidemiologia da doença. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram comparar a agressividade e a capacidade de transmissão semente-planta e planta-semente entre *C. plurivorum* e *C. truncatum* na cultura da soja, e testar a reação de cultivares de soja ao *C. plurivorum*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* utilizados neste trabalho provêm de isolados monospóricos preservados em fragmentos de papel filtro, armazenados em ultrafreezer a -80°C, do laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ-USP. Os isolados de *C. plurivorum* (LFN0008, LFN0019 e LFN0025) foram caracterizados molecularmente por Barbieri et al. (2017) e reclassificados no capítulo 2 deste estudo, e os isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076), por Rogério et al. (2017)(Tabela 5).

Tabela 5. Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados no trabalho, obtidos de plantas de soja (*Glycine max*) sintomáticas, e as respectivas sequências de DNA depositadas no NCBI/GenBank.

| Código | Espécie | Origem | Acesso GenBank | | | | |
|---------------|----------------------|---------------|-----------------------|--------------|------------|-------------------|------------|
| | | | ITS | GAPDH | HIS | β-tubulina | ACT |
| LFN0008 | <i>C. plurivorum</i> | MT - 2012 | KT696336 | KT696289 | KT696311 | KT696282 | KT696275 |
| LFN0019 | <i>C. plurivorum</i> | MT - 2014 | KT696339 | KT696292 | KT696315 | KT696286 | KT696279 |
| LFN0025 | <i>C. plurivorum</i> | MT - 2009 | KT696341 | KT696294 | KT696317 | KT696287 | KT696280 |
| CMES1059 | <i>C. truncatum</i> | PR - 2004 | KJ614328 | KJ614374 | KJ614281 | - | - |
| CMES1076 | <i>C. truncatum</i> | PR - 2004 | KJ614316 | KJ614359 | KJ614267 | - | - |

3.2.2. Comparação da agressividade

Esse experimento foi realizado a fim de comparar a agressividade dos isolados de *C. plurivorum* (LFN008, LFN0019 e LFN0025) e um isolado de *C. truncatum* (CMES1059), utilizando-se a metodologia de inoculação por aspersão de suspensão de esporos nas plantas de

soja. O experimento foi conduzido em estufa do campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP e, após a inoculação, em sala de crescimento.

3.2.2.1. Inoculação e avaliação

Foram utilizados vasos com capacidade de cinco litros, contendo solo autoclavado, e foram semeadas 10 sementes de soja por vaso. Antes da inoculação, foi realizado desbaste deixando cinco plantas por vaso, utilizando-se quatro repetições por nível de tratamento (20 plantas por isolado).

Os isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em meio BDA semissintético (BDAes), feito com caldo de batata coado após o cozimento em água destilada de 200g de batata, 10 g de dextrose, 16 g de ágar bacteriológico e 1 g de cloreto de sódio L⁻¹ de meio, e incubados a 25°C, com fotoperíodo. As placas com as colônias fúngicas foram lavadas e raspadas com água destilada estéril, após 20 dias de cultivo, e as suspensões filtradas em gaze estéril. Por meio de sucessivas diluições, em solução de Tween 80, as concentrações das suspensões foram ajustadas para 10⁵ esporos mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer.

Plantas no estágio de crescimento V2-V3 foram inoculadas por atomização com as suspensões dos isolados de *C. plurivorum* ou *C. truncatum* até o ponto de escorrimento. Plantas testemunha foram aspergidas com água destilada esterilizada. As plantas foram mantidas em câmara úmida no escuro a 28 ± 2°C por 72 horas. Posteriormente, foram transferidas para sala de crescimento e, após 18 dias, avaliadas quanto à presença de sintomas. O experimento foi instalado sob delineamento inteiramente aleatorizado, sendo executado duas vezes.

A avaliação da agressividade foi realizada utilizando uma escala de notas, em que 0 = ausência de sintomas visíveis, 1 = 1 a 10% da planta com sintomas (principalmente necrose nas nervuras das folhas), 2 = 11 a 35% da planta afetada (principalmente folhas e algumas necrose nos pecíolos), 3 = 36 a 65% da planta afetada (principalmente no pecíolo e algumas necroses nas hastes), 4 = 66 a 90% da planta afetada (folhas expandidas, pecíolos e necroses nas hastes) e 5 = 91 a 100% da planta afetada (necrose severa em toda a planta até a morte da planta) (YANG; HARTMAN, 2015). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2.2.2. Reisolamento

Após as avaliações no teste de comparação de agressividade, foi realizado o reisolamento dos patógenos, a partir dos tecidos sintomáticos, em meio BDAes. Foi realizada a extração de DNA desses reisolados, seguindo as etapas indicadas no Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), e, então foram realizadas reações de PCR para a amplificação e posterior sequenciamento parcial dos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona3 (HIS3) e beta-tubulina (TUB2), cujas condições de amplificação são apresentadas na Tabela 6. As sequências obtidas dos reisolados foram alinhadas às dos isolados inoculados, com uso do programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), a fim de confirmar se as linhagens do fungo reisoladas das plantas correspondem às mesmas linhagens inoculadas.

Tabela 6. Condições utilizadas para a amplificação dos genes GAPDH, HIS3 e TUB2 por PCR.

| Gene | Primers | Sequência do primer | Programa | Referência |
|-------|---------|-------------------------------------|--|--------------------------|
| GAPDH | GDF1 | 5'-GCCGTCAACGA CCCCTTCATTGA-3' | Desnaturação inicial de 2 min a 94°C, 34 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s 60°C e 1 min a 72°C, e desnaturação final de 10 min a 72°C | (GUERBER et al., 2003) |
| | GDR1 | 5'-GGGTGGAGTCGT ACTTGAGCATGT-3' | | |
| HIS3 | CYLH3F | 5'-AGGTCCACTG GTGGCAAG-3' | Desnaturação inicial de 5 min a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s 54°C e 30 s a 72°C, e desnaturação final de 7 min a 72°C | (CROUS et al., 2004) |
| | CYLH3R | 5'-AGCTGGATGT CCTTGGACTG-3' | | |
| TUB2 | Bt2a | 5'-GGTAACCAAATC GGTGCTGCTTTC-3' | Desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s 55°C e 1 min a 72°C, e desnaturação final de 10 min a 72°C | (GLASS; DONALDSON, 1995) |
| | Bt2b | 5'-ACCCTCAGTGTGA GTGACCCTTGGC-3' | | |

3.2.3. Teste de transmissão semente-planta

O experimento de transmissão semente-planta foi realizado duas vezes. Os resultados que serão apresentados são referentes a média dos dois experimentos.

3.2.3.1. Inoculação das sementes

As sementes de soja utilizadas (cultivar AMS Tibagi RR) foram previamente submetidas a testes de germinação e sanidade, a fim de verificar seu potencial germinativo e confirmar a ausência de *Colletotrichum* spp. Em seguida, foi realizada a assepsia superficial

das sementes (três minutos com hipoclorito de sódio a 1%) e posterior secagem por 24 horas em superfície asséptica.

Para obtenção de sementes portadoras dos patógenos, foi empregada a técnica de restrição hídrica, utilizando-se meio BDAes + Manitol -1,0 MPa (COSTA et al., 2003). Dois isolados de *C. plurivorum* (LFN0008 e LFN0019), selecionados a partir do teste de comparação de agressividade, e dois isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076), foram transferidos de colônias cultivadas por sete dias para placas de Petri com meio BDAes acrescido de Manitol. A quantidade de Manitol utilizada foi obtida por meio da fórmula de Van'tHoff (SALISBURY; ROSS, 1992). As placas foram colocadas na câmara de incubação a 25°C, sob alternância de luz. Depois de constatada a colonização total da superfície do meio, as sementes de soja foram distribuídas em camada única sobre a colônia fúngica, de forma que todas as sementes ficassesem em contato com o patógeno e, então, foram incubadas a 25°C e fotoperíodo, por diferentes períodos de contato com o fungo, 48 e 72 horas, correspondendo aos diferentes potenciais de inóculo. Após cada período de contato, as sementes foram retiradas das placas para secagem de forma natural, em superfície asséptica, durante 24 horas. Como testemunha, foi usado o meio BDAes com Manitol sem o fungo.

3.2.3.2. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes

A qualidade sanitária das sementes foi analisada utilizando-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009). Três folhas de papel filtro, previamente umedecidas com água destilada, foram colocadas em placas de Petri de nove cm de diâmetro e, sobre estas, 10 sementes separadas entre si. Em seguida, as placas foram colocadas em câmara de incubação sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo. As avaliações foram realizadas após sete dias de incubação, utilizando o microscópio estereoscópio. Foram utilizadas 12 repetições de 10 sementes por nível de tratamento.

O teste de germinação foi realizado pelo método do rolo de germinação (papel toalha), segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), em que o papel toalha é umedecido 2,5 vezes a massa seca do substrato com água destilada e são distribuídas 50 sementes sobre dois papéis e cobertas com um terceiro. Cada nível de tratamento teve três repetições (três rolos de germinação), acondicionados na posição vertical em germinador a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco e oito dias da instalação do experimento, obtendo-se os resultados de porcentagem de plântulas normais na primeira contagem (parâmetro de vigor) e na segunda contagem (parâmetro de germinação).

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), estande final e sobrevivência, as sementes, inoculadas e não inoculadas, foram semeadas em caixas plásticas de 21 x 48 x 12 cm (largura x comprimento x altura) contendo areia estéril, utilizando-se três repetições (caixas plásticas) de 50 sementes. As caixas foram mantidas em estufa e irrigadas diariamente até a saturação do solo. A velocidade de emergência foi determinada pela contagem diária de plântulas emergidas. Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo. A contagem foi feita até a estabilização do número das plântulas por três leituras consecutivas. O IVE foi calculado com base na fórmula de Maguire (1962), na qual $IVE = N_1 / D_1 + N_2 / D_2 + \dots + N_n / D_n$, onde: IVE = índice de velocidade de emergência de plântulas; N= número de plântulas emergidas do dia anterior até o dia que está sendo contado; D = número de dias da semeadura da primeira à última contagem. A porcentagem de emergência foi registrada no último dia de contagem após a estabilização do número de plantas, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem, e a sobrevivência foi registrada no dia em que as plantas foram coletadas para a determinação da taxa de transmissão, 21 dias após a semeadura.

3.2.3.3. Determinação da taxa de transmissão

Para todas as plantas sintomáticas e assintomáticas do ensaio foram calculadas as taxas de infecção (TI) e de transmissão (TT) de *Colletotrichum* por sementes, utilizando-se a metodologia adaptada de Teixeira e Machado (2003). No 21º dia após a semeadura, foi retirado um fragmento de tecido por planta, na inserção dos cotilédones com o caule, de todas as plantas das parcelas. Esses fragmentos foram seccionados e desinfestados com álcool 70% por um minuto, posteriormente, emergidos em hipoclorito de sódio 1% por três minutos e colocados em placas de Petri com meio de cultura BDAes. As placas foram mantidas em câmara de incubação, a 25°C, com fotoperíodo. Foi acompanhada diariamente a ocorrência de crescimento micelial em cada parte da planta, com o auxílio de microscópio estereoscópico e, quando necessário, as estruturas fúngicas foram examinadas com o auxílio do microscópio ótico. Para confirmar que a espécie reisolada era a que foi inoculada, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2.2.

A taxa de infecção foi obtida considerando-se o número de plantas com crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela (sobrevivência), expresso em porcentagem de plantas infecionadas. A taxa de transmissão foi determinada com base na

taxa de infecção e de incidência de *C. plurivorum* nas sementes inoculadas, em cada tratamento. A taxa de transmissão foi calculada com base na fórmula:

$$TT (\%) = [TI (\%) / IS (\%)] * 100$$

Em que:

TT = taxa de transmissão; TI = taxa de infecção; IS = incidência do patógeno em sementes inoculadas. A transmissão do patógeno da semente para a planta foi considerada positiva quando o fragmento da planta apresentou crescimento micelial do fungo inoculado.

Para todos os testes, o delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2.4. Teste de transmissão planta-semente

O teste de transmissão planta-semente foi conduzido em estufa do campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP. Foram utilizadas plantas de soja da cultivar AMS Tibagi RR, dois isolados de *C. plurivorum* (LFN0008 e LFN0019), selecionados a partir do teste de comparação de agressividade, e dois isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076).

Vasos plásticos com capacidade de 10 litros, contendo solo autoclavado, adubado conforme as recomendações para a cultura, foram semeados com 10 sementes de soja, e, após a emergência, foi realizado um desbaste das plântulas, mantendo-se apenas duas por vaso. Foram realizadas inoculações dos quatro isolados de *Colletotrichum* spp. e água destilada (controle) em uma parte das plantas em estágio reprodutivo R2 e, em outra parte, no estágio reprodutivo R5. O experimento foi realizado com quatro repetições, totalizando-se 40 vasos, dispostos em delineamento inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 5x2 (cinco isolados x duas épocas de inoculação).

Para a obtenção das suspensões de inóculo, com concentração de 10^5 esporos mL⁻¹, foi empregada a mesma técnica citada no item 3.2.2.1. As inoculações foram realizadas por meio de atomização, aspergindo-se a parte aérea das plantas até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara úmida no escuro por 12 h, na estufa. Os vasos permaneceram cobertos com sacos plásticos transparentes por 72 h após a inoculação, a fim de proporcionar maior umidade do ar ao redor das plantas inoculadas e também para impedir a contaminação das demais parcelas.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de vagens por planta, peso de grãos e transmissão do patógeno das plantas para as sementes. A avaliação da sanidade das sementes foi realizada utilizando-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009).

Após identificação nas sementes, no caso de haver transmissão, o patógeno foi reisolado em placas de Petri com meio de cultura BDAes e incubado em câmara de incubação a 25°C, com fotoperíodo, por sete dias. Fragmentos de colônia de cada isolado foram submetidos à extração de DNA, seguido de reações de PCR para amplificação e sequenciamento parcial dos genes GAPDH, HIS3 e TUB2 (Tabela 6). As sequências obtidas foram alinhadas às dos isolados inoculados, com uso do programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), a fim de comprovar que o patógeno reisolado foi o mesmo que foi inoculado.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2.5. Reação de cultivares a *C. plurivorum*

A reação de diferentes cultivares de soja à espécie *C. plurivorum* foi testada a partir da inoculação de sementes e posterior avaliação do efeito na qualidade fisiológica e sanitária. Dois ensaios foram conduzidos com a mesma metodologia, mudando apenas as cultivares utilizadas.

No primeiro ensaio, sementes das cultivares AMS Tibagi, TMG 7062, M 7739, NS 5909 e BMX 8579 foram inoculadas com dois isolados de *C. plurivorum* (LFN0008 e LFN0019), além de um tratamento sem inóculo, pela técnica da restrição hídrica, conforme detalhada no item 3.2.3.1. As sementes foram mantidas em contato com o inóculo por 48 horas. No segundo ensaio, foram utilizados os mesmos isolados de *C. plurivorum* para inoculação das sementes das seguintes cultivares: AMS Tibagi, NS 6909, BS 2606, M 6210 IPRO e BMX 8473.

A qualidade sanitária das sementes foi analisada utilizando-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009). Foram utilizadas 10 repetições de 10 sementes por nível de tratamento. O teste de germinação foi realizado pelo método do rolo de germinação (papel toalha), segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), no qual cada nível de tratamento teve três repetições.

Para o índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de emergência, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 3.2.3.2., com quatro repetições (caixas plásticas) de 50 sementes. A porcentagem de emergência foi registrada no último dia de

contagem após a estabilização do número de plantas, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

Os três testes foram instalados sob delineamento inteiramente aleatorizado. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.3. Resultados

3.3.1. Comparaçao da agressividade

Foram avaliados os sintomas causados pelos diferentes isolados inoculados e dadas notas nas duas repetições do ensaio. Na Tabela 7 estão apresentadas as médias das duas repetições. É possível observar que os isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* causaram sintomas típicos da antracnose, afetando na média entre 1 e 65% da planta, diferente das plantas não inoculadas (Figura 5). Segundo a escala de notas de Yang e Hartman (2015), os isolados de *C. plurivorum* não diferiram entre si quanto à agressividade; já o isolado de *C. truncatum* (CMES1059) foi mais agressivo do que os isolados de *C. plurivorum* avaliados. Os sintomas causados por *C. plurivorum* foram lesões necróticas nas folhas, afetando em baixa intensidade pecíolos e nervuras se comparados aos do *C. truncatum*.

Tabela 7. Notas de agressividade, segundo a escala de Yang e Hartman (2015), dos isolados de *Colletotrichum* inoculados em plantas de soja, avaliadas 18 dias após a inoculação.

| Tratamento | Nota de agressividade |
|-------------------|------------------------------|
| Testemunha | 0 c* |
| LFN0025 | 1,11 b |
| LFN0019 | 1,28 b |
| LFN0008 | 0,82 b |
| CMES1059 | 2,69 a |
| CV(%) | 5,81 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

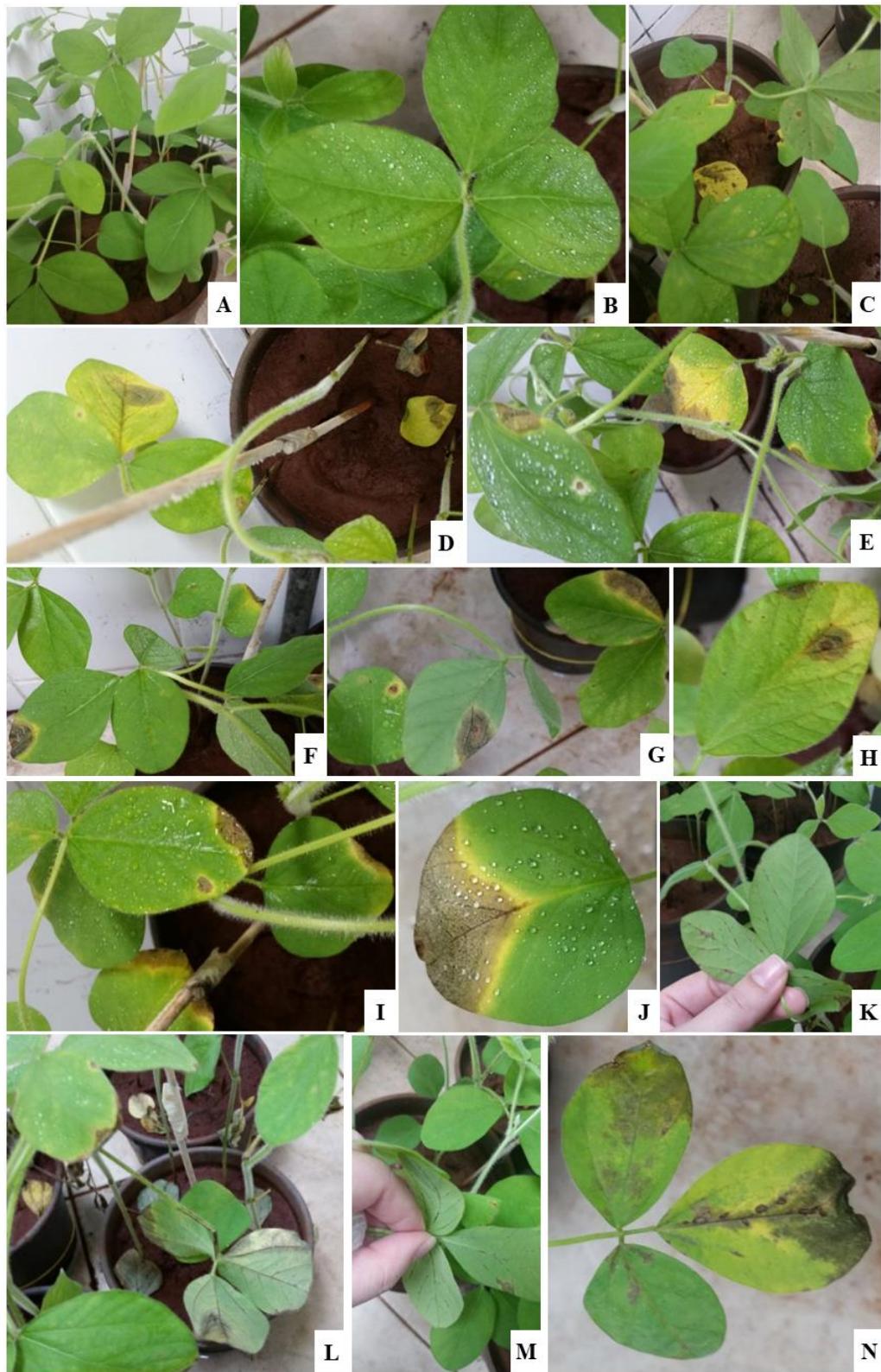


Figura 5. Comparação da agressividade à soja de isolados de *Colletotrichum plurivorum* e *C. truncatum*. A e B: plantas de soja saudáveis inoculadas com água destilada; C, D e E: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0025; F, G e H: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0019; I, J e K: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado LFN0008; e L, M e N: sintomas em plantas de soja inoculadas com o isolado CMES1059.

Foi realizado o reisolamento indireto dos patógenos, por meio de fragmentos dos tecidos sintomáticos e, no caso da testemunha, foram coletados fragmentos de plantas ao acaso. Nenhuma espécie de *Colletotrichum* foi reisolada da testemunha, confirmado a avaliação visual da ausência de sintomas. Os genes sequenciados das colônias obtidas por reisolamento foram comparados aos dos isolados inicialmente inoculados, com auxílio do programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e se mostraram 100% idênticos, confirmando a identidade dos isolados recuperados após inoculação.

3.3.2. Teste de transmissão semente-planta

Na avaliação da qualidade sanitária, todos os tempos de contato dos quatro isolados resultaram em 100% de incidência de *Colletotrichum*, enquanto que as sementes colocadas em contato com o meio de cultura sem inóculo não apresentaram incidência do patógeno.

Nas avaliações da qualidade fisiológica das sementes, referentes às 1^a e 2^a contagens de germinação, índice de velocidade de emergência e emergência, avaliando-se a variável tempo de contato, foi possível notar que, na média geral do fator em todos os testes, os tratamentos em que as sementes ficaram em contato por 72 h foram mais agressivos do que os tratamentos com 48 h de contato. Somente os controles sem inóculo não apresentaram diferença estatística entre os tempos de contato. Para a variável inóculo, os tratamentos inoculados com *C. truncatum* diferiram, no geral, dos demais, mostrando que os isolados testados dessa espécie são mais agressivos do que os isolados de *C. plurivorum*. Ainda em relação à qualidade fisiológica, o isolado LFN0008 diferiu estatisticamente do controle não inoculado em todos os testes, enquanto que o outro isolado de *C. plurivorum*, LFN0019, apenas diferiu do controle nos resultados obtidos pelo teste de germinação (Tabelas 8, 9, 10 e 11).

A taxa de transmissão apresentou interação para o fator inóculo, em que todos os isolados diferiram dos tratamentos sem inóculo, e, entre isolados, apenas o LFN0019 diferiu dos demais com uma taxa de transmissão menor. Para os isolados LFN0008, CMES1059 e CMES1076, a taxa de transmissão do patógeno da semente para a planta variou entre 75% e 79% e para o isolado LFN0019 foi de, aproximadamente, 37%. Para a variável tempo de contato não houve interação no teste de F, ou seja, as médias desse fator não diferiram entre si. Somente no para o isolado LFN0008 a taxa de transmissão foi maior com 72 h de contato do que com 48 h (Tabela 12). Os reisolados do teste de transmissão foram sequenciados e confirmou-se que eram os mesmos que foram inoculados nas sementes.

Tabela 8. Resultado da primeira contagem do teste de germinação (%) de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h).

| Inóculo | Tempo de contato | | Média |
|-----------------|-------------------------|------------|--------------|
| | 48h | 72h | |
| Sem | 75,33 aA | 72,33 aA | 73,83 a |
| LFN0008 | 52,67 bA | 41,33 bB | 47,00 c |
| LFN0019 | 60,67 bA | 64,67 aA | 62,67 b |
| CMES1059 | 31,33 cA | 8,67 cB | 20,00 e |
| CMES1076 | 40,67 cA | 17,33 cB | 29,00 d |
| Média | 52,13 A | 40,87 B | CV(%) = 9,98 |

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 9. Resultado da segunda contagem do teste de germinação (%) de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059 e CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h).

| Inóculo | Tempo de contato | | Média |
|-----------------|-------------------------|------------|--------------|
| | 48h | 72h | |
| Sem | 78,33 aA | 75,33 aA | 76,83 a |
| LFN0008 | 56,67 bA | 43,66 bB | 50,17 c |
| LFN0019 | 64,33 bA | 66,33 aA | 65,33 b |
| CMES1059 | 31,33 cA | 8,67 cB | 20,00 e |
| CMES1076 | 41,00 cA | 17,33 cB | 29,17 d |
| Média | 54,33 A | 42,27 B | CV(%) = 9,64 |

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 10. Resultado do índice de velocidade de emergência (IVE), obtido no teste de emergência de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h).

| Inóculo | Tempo de contato | | Média |
|-----------------|-------------------------|------------|--------------|
| | 48h | 72h | |
| Sem | 7,85 aA | 8,18 aA | 8,02 a |
| LFN0008 | 7,42 abA | 6,49 bB | 6,95 b |
| LFN0019 | 8,22 aA | 7,43 abA | 7,82 ab |
| CMES1059 | 4,03 cA | 2,05 cB | 3,04 d |
| CMES1076 | 6,50 bA | 3,18 cB | 4,84 c |
| Média | 6,80 A | 5,46 B | CV(%) = 8,58 |

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 11. Resultado da porcentagem de emergência de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h).

| Inóculo | Tempo de contato | | Média |
|-----------------|-------------------------|------------|--------------|
| | 48h | 72h | |
| Sem | 75,33 aA | 77,00 aA | 76,17 a |
| LFN0008 | 67,67 abA | 60,33 bA | 64,00 b |
| LFN0019 | 73,33 abA | 72,33 abA | 72,83 ab |
| CMES1059 | 36,67 cA | 17,67 cB | 27,17 d |
| CMES1076 | 61,67 bA | 30,33 cB | 46,00 c |
| Média | 62,93 A | 51,53 B | CV(%) = 9,33 |

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 12. Resultado da taxa de transmissão (%) semente-planta de sementes de soja AMS Tibagi inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059, CMES1076, com dois tempos de contato (48h e 72h).

| Inóculo | Tempo de contato | | Média |
|-----------------|-------------------------|------------|---------------|
| | 48h | 72h | |
| Sem | 0,00 cA | 0,00 cA | 0,00 c |
| LFN0008 | 69,08 aB | 81,76 aA | 75,42 a |
| LFN0019 | 34,81 bA | 39,57 bA | 37,19 b |
| CMES1059 | 78,72 aA | 80,56 aA | 79,64 a |
| CMES1076 | 75,76 aA | 76,75 aA | 76,26 a |
| Média | 51,67 A | 55,73 A | CV(%) = 13,82 |

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.3.3. Teste de transmissão planta-semente

Após a colheita dos grãos e instalação do teste de sanidade, não foi observado crescimento dos fungos que haviam sido inoculados nas plantas. Desta forma, considera-se que não ocorreu transmissão de nenhum dos isolados que foram inoculados nas plantas, tanto em R2 quanto em R5. Além disso, o teste de F não foi significativo para as variáveis peso de grãos e número de vagens das plantas para o fator isolado, ou seja, não há diferença estatística entre os níveis de tratamento dos isolados avaliados para essas variáveis resposta (Tabela 13). Também não houve interação significativa entre os fatores isolado e época de inoculação.

Tabela 13. Médias de produção de vagens e de grãos de plantas de soja, cultivar AMS Tibagi, inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019, CMES1059 e CMES1076.

| Isolado | Produção de vagens (nº de vagens/planta) | | Produção de grãos (g/planta) | |
|------------------|---|-----------|-------------------------------------|-----------|
| | R2 | R5 | R2 | R5 |
| Ausente | 41,00 | 36,13 | 10,81 | 11,09 |
| LFN0008 | 40,00 | 35,63 | 11,05 | 10,44 |
| LFN0019 | 41,38 | 29,75 | 10,62 | 7,03 |
| CMES 1059 | 38,88 | 34,63 | 9,07 | 8,34 |
| CMES 1076 | 38,00 | 32,75 | 10,37 | 8,47 |

3.3.4. Reação de cultivares a *C. plurivorum*

Nos dois ensaios, as sementes inoculadas exibiram 100% de incidência do inóculo no teste de sanidade e, de modo geral, as quatro variáveis resposta tiveram resultados bastante semelhantes, em que o isolado LFN0008 foi o que mais afetou a qualidade fisiológica das sementes, diferindo das sementes não inoculadas e do isolado LFN0019 (Figuras 6 e 7).

No primeiro ensaio com as cultivares AMS Tibagi, TMG 7062, M 7739, NS 5909 e BMX 8579, o isolado LFN0019 diferiu das sementes não inoculadas somente no teste de germinação para as cultivares M 7739 e BMX 8579, que teve a média de plântulas normais inferior do que as sementes sem inóculo, em ambas as contagens. Ainda, essas duas cultivares foram as que tiveram maior redução nos parâmetros avaliados quando inoculadas com o isolado LFN0008. A cultivar M 7739 teve a porcentagem de vigor (segunda contagem do teste de germinação) e o IVE reduzidos em torno de 60%, quando comparado o tratamento sem inóculo com o isolado LFN0008. Já a cultivar BMX 8579, nessa mesma condição, apresentou redução de 82% na porcentagem de vigor e em torno de 70% nos outros 3 parâmetros avaliados.

No segundo ensaio com as cultivares AMS Tibagi, NS 6909, BS 2606, M 6210 IPRO e BMX 8473, a cultivar M 6210 IPRO inoculada com o isolado LFN0008 apresentou redução de, aproximadamente, 50% nos parâmetros avaliados no teste de germinação (primeira e segunda contagem) e quase 25% de redução do IVE e porcentagem de emergência em relação ao tratamento sem inóculo.

Em ambos os ensaios, a cultivar com maior resistência foi a AMS Tibagi, a qual não teve nenhum dos quatro parâmetros avaliados influenciados pelos dois isolados de *C. plurivorum*.

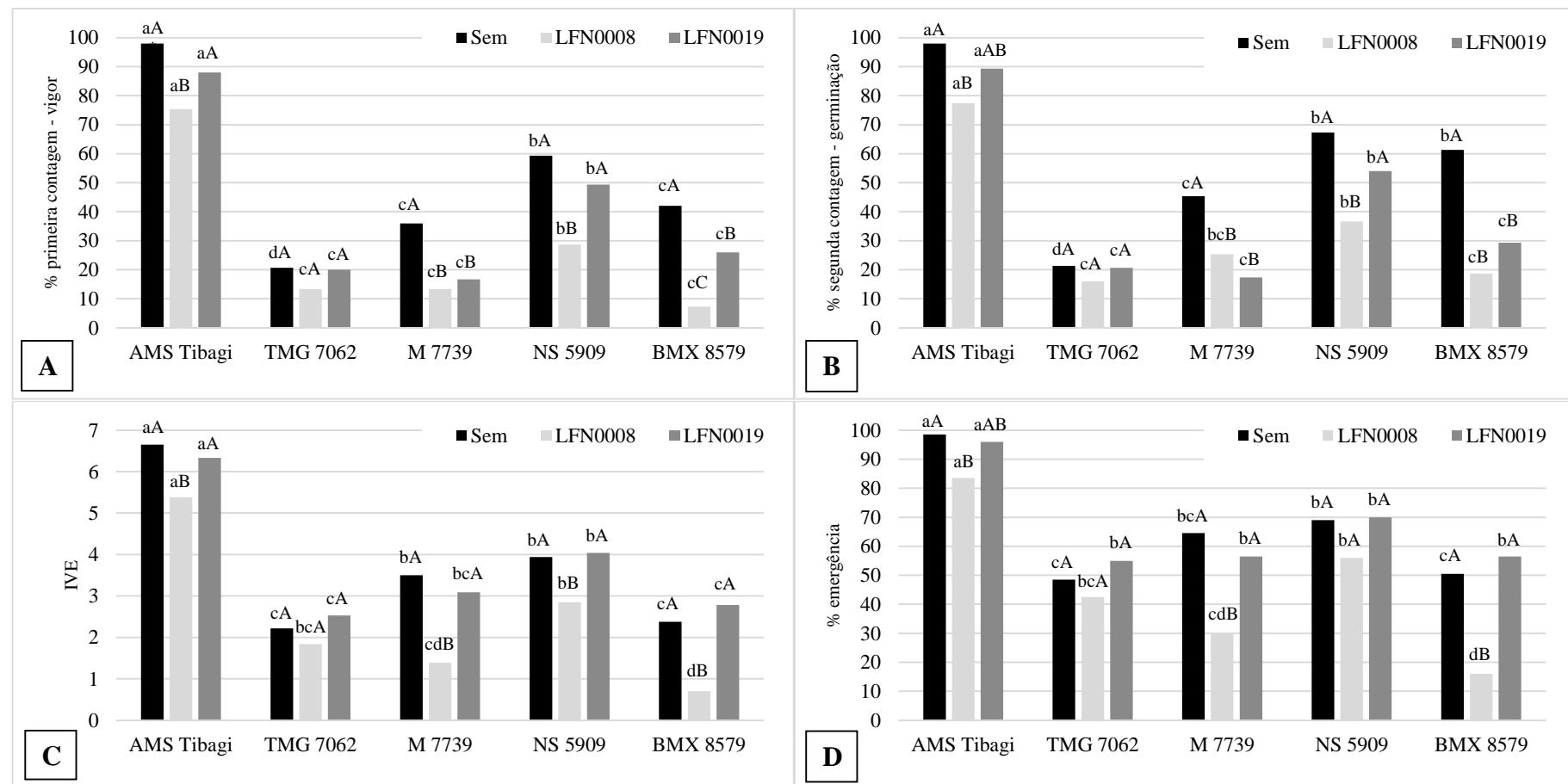


Figura 6. Resultados do primeiro teste de reação de cultivares à infecção de *C. plurivorum*. Foram usadas as variedades AMS Tibagi, TMG 7062, M 7739, NS 5909 e BMX 8579, em que as sementes foram inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019. A: primeira contagem do teste de germinação (% vigor); B: segunda contagem do teste de germinação (% germinação); C: índice de velocidade de emergência obtido no teste de emergência; e D: emergência de plântulas (%). *Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas entre cultivares no mesmo isolado e maiúsculas entre isolados na mesma cultivar, em cada gráfico, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

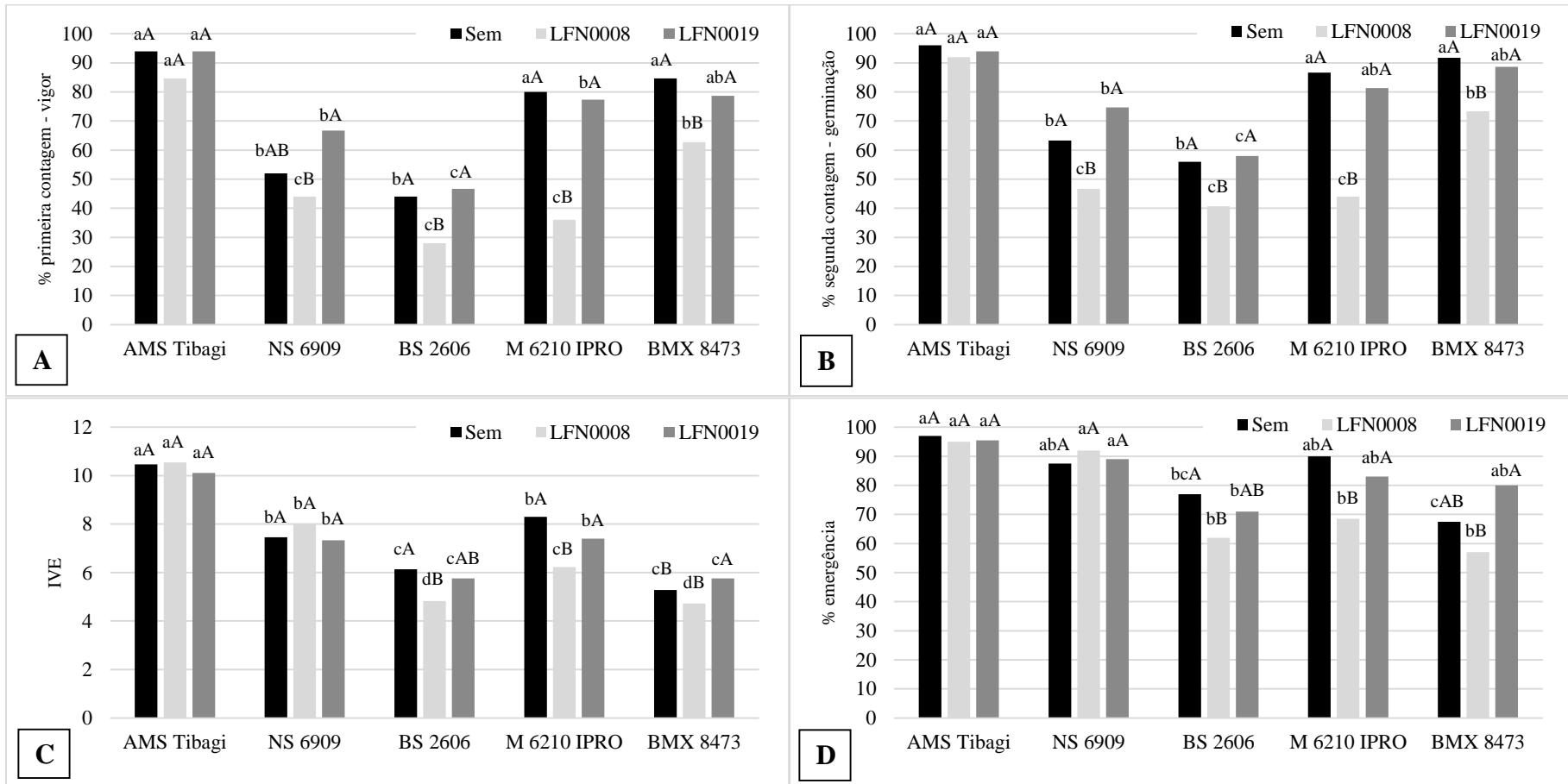


Figura 7. Resultados do segundo teste de reação de cultivares à infecção de *C. plurivorum*. Foram usadas as variedades AMS Tibagi, NS 6909, BS 2606, M 6210 IPRO e BMX 8473, em que as sementes foram inoculadas com os isolados LFN0008, LFN0019. A: primeira contagem do teste de germinação (% vigor); B: segunda contagem do teste de germinação (% germinação); C: índice de velocidade de emergência obtido no teste de emergência; e D: emergência de plântulas (%). *Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas entre cultivares no mesmo isolado e maiúsculas entre isolados na mesma cultivar, em cada gráfico, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.4. Discussão

Sabe-se que a ocorrência da espécie *C. plurivorum*, anteriormente denominada de *C. cliviae*, associada à antracnose da soja, vem sendo relatada em regiões quentes e úmidas do Brasil como nos estados do Tocantins, Mato Grosso, Pernambuco, Alagoas e Piauí (BARBIERI et al., 2017; DIAS et al., 2018; SOUSA et al., 2018; VIEIRA et al., 2014). Ainda não foi esclarecido se a espécie é endêmica ou se foi introduzida no país por meio de materiais vegetais contaminados como, por exemplo, sementes. O trabalho de Dias et al. (2018), após análises de haplótipos de *C. plurivorum* (*C. cliviae*) patogênicos à soja, indicou que a espécie poderia estar presente no país há alguns anos sem ser reconhecida, já que só foi descrita recentemente. Também não foi excluída a hipótese de que ela tenha sido introduzida no país por meio de sementes de soja infestadas, pois o centro de origem de *C. cliviae* coincide com o da cultura (China) (HYMOWITZ, 1990; YANG et al., 2011, 2009).

Os resultados do teste de transmissão semente-planta demonstraram que sementes de soja que transportam inóculo de *C. truncatum* e *C. plurivorum*, mesmo que não tenham sua qualidade fisiológica afetada pelo patógeno, podem transmitir para a planta o fungo. Além disso, os resultados desse experimento reforçam o que foi apresentado no teste de comparação da agressividade, que os isolados de *C. truncatum* foram mais agressivos do que os isolados de *C. plurivorum* na cultivar avaliada (AMS Tibagi). Sajeesh et. al. (2014) observaram que sementes de soja inoculadas com *C. truncatum*, além de redução severa na germinação, apresentaram sintomas 20 dias após a semeadura, confirmando a transmissão do fungo para as plantas. Várias espécies de *Colletotrichum* já foram reportadas como causadoras de infecções em plântulas a partir de sementes, podendo ou não manifestar sintomas (BEN-DANIEL; BAR-ZVI; TSROR (LAHKIM), 2010; CARDWELL, 1989; GAMARNIK, 1994; GROVER; BANSAL, 1970; THOMAS; SWEETINGHAM, 2003). Outros dois estudos que avaliaram a transmissão semente-planta do fungo *C. lindemuthianum* em feijão apresentaram altas taxas de transmissão (de 70 a 100%) do patógeno das sementes para as plantas (REY et al., 2009; VECCHIATO; KOHARA; MENTEN, 1997).

É necessário chamar a atenção para o fato de que epidemias de antracnose da soja podem ser iniciadas pela introdução do inóculo na área por meio de sementes infectadas pelo patógeno (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Não somente pela transmissão do fungo da semente para a planta, mas também devido ao fato de que quanto maior o inóculo primário, maior a transmissão do mesmo para as sementes próximas à fonte de inóculo, conforme Noetzold et al. (2014) concluíram ao testar diferentes porcentagens de sementes inoculadas com

C. truncatum em uma área. O trabalho de Thangavel et. al. (2018) ressaltou a importância de identificar fontes de inóculo iniciais a fim de evitar a disseminação e manejar doenças de importância global. Ele mostrou que sementes de papoula transmitiram com sucesso o patógeno de sementes infestadas para plântulas infectadas, podendo ser responsáveis pela disseminação de duas espécies causadoras de míldio na cultura ao transportarem oósporos e micélios viáveis.

No presente trabalho, não foi observada transmissão dos isolados de *C. truncatum* e *C. plurivorum* para os grãos quando inoculados em plantas de soja nos estágios R2 e R5, além de não afetarem a produção de vagens e grãos quando comparados ao tratamento não inoculado. Masson et al. (2015), ao testarem a transmissão planta-semente de *C. truncatum*, também não encontraram interferência no número de vagens e peso de grãos na soja ao inocular o patógeno em diferentes estágios fenológicos. No entanto, os autores relataram que as plantas são mais susceptíveis à formação de lesões nas vagens quando inoculadas em R5 (formação e enchimento de grãos) e que mais inoculações em estágios anteriores ao R5, como em V2 e R2, contribuem para o aumento do número de vagens lesionadas. Concluíram, também, que a intensidade da ocorrência da doença interfere na transmissão do patógeno da planta para a semente. Para Manandhar e Hartman (1999), a cultura da soja é mais suscetível ao fungo nas fases da floração ao enchimento de grãos. Diferente disso, Costa et al. (2006) observaram que plantas inoculadas em estágios fenológicos mais avançados têm maior índice de resistência, assim como o número de lesões que são menores se comparado com plantas inoculadas mais jovens. Segundo Klingelfuss e Yorinori (2001), o fungo *Colletotrichum truncatum* pode estar presente tanto nas folhas quanto nas hastes das plantas muito antes do aparecimento de sintomas da doença, uma vez que isolaram o patógeno desde o estágio R5.2 sem apresentar sintomas de antracnose até o final do ciclo. Sendo umas das características do gênero *Colletotrichum*, a de permanecer quiescente até os órgãos parasitados iniciarem a senescência.

Sementes infectadas podem ocasionar damping-off de pré e pós emergência e cancros sobre os cotilédones, os quais podem se desprender da plântula em épocas de chuva e disseminar o patógeno para outras plantas (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Os danos causados pelo inóculo transportado por sementes podem ser reduzidos por meio do tratamento químico das sementes, o que já é amplamente utilizado na cultura da soja no país. Porém, é necessário um acompanhamento da sensibilidade dos isolados desse complexo de espécies aos fungicidas utilizados, já que os relatos de ocorrência da antracnose em campos de soja do centro-oeste do Brasil vêm crescendo nos últimos anos. Isso vem ocorrendo apesar de, além do tratamento químico das sementes, serem utilizadas aplicações foliares de fungicidas ao longo da safra, o que indica claramente que o controle não está sendo eficaz.

A maior agressividade do isolado de *C. truncatum* nos testes realizados pode estar associada à diferente reação da cultivar de soja utilizada quando comparado aos isolados de *C. plurivorum*. Dentro da mesma espécie de *C. truncatum*, já foram observados diferentes níveis de agressividade entre isolados (ROGÉRIO et al., 2017) e também diferentes comportamentos dos isolados em diferentes cultivares (MAYONJO; KAPOORIA, 2003). Há escassez de informações sobre níveis de agressividade entre diferentes isolados de *C. plurivorum* associados à antracnose da soja. Além do presente estudo, há apenas um único comparando níveis de agressividade de isolados de *C. plurivorum* e *C. truncatum* de soja no Brasil (DIAS et al., 2018). Ao avaliar lesões no epicótilo e cotilédones de plântulas de combinações de 16 linhagens de soja, distintas das cultivares testadas aqui, após inoculação de um isolado de *C. plurivorum* e cinco isolados de *C. truncatum*, observou-se que o isolado de *C. plurivorum* não diferiu em agressividade da maioria dos isolados de *C. truncatum* inoculados.

Ao estudar a resistência de cultivares por meio da inoculação de sementes com os isolados de *C. plurivorum*, foi possível notar que, dentre as nove cultivares testados, o AMS Tibagi foi o que apresentou maior resistência, por não ter sua qualidade fisiológica afetada na presença do inóculo. Essa cultivar foi utilizada nos testes de transmissão deste estudo, podendo essa característica de possuir maior resistência ter influenciado no desenvolvimento de sintomas e na transmissão dos isolados de *C. plurivorum* para as sementes.

Apesar da cultivar AMS Tibagi não ter sido influenciada nos parâmetros de qualidade fisiológica avaliados no teste de reação de cultivares, a mesma cultivar foi utilizada no teste de comparação de agressividade entre os isolados de *Colletotrichum* e apresentou sintomas alguns dias após a inoculação. Ela também foi capaz de transmitir o inóculo da semente para as plântulas no teste de transmissão semente-planta. Não foi quantificado o quanto esses sintomas do teste de agressividade e a transmissão das sementes para as plântulas afetariam a produção da cultivar. Conclui-se então que, mesmo tendo um maior grau de resistência do que as demais cultivares testadas, a AMS Tibagi não possui resistência completa às duas espécies de *Colletotrichum* avaliadas nesse estudo.

A resistência completa ou imunidade de cultivares de soja à antracnose nunca foi relatada, inclusive o uso de cultivares com moderada resistência ao patógeno, já identificada em poucos trabalhos (COSTA et al., 2009; GALLI et al., 2007; SINGH, 1993; YANG; HARTMAN, 2015), não é citado como opção para o manejo da doença em recomendações agronômicas ou em livros que esclarecem sobre a etiologia, sintomatologia e controle de doenças na cultura da soja no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2013; GODOY et al., 2016). O uso de cultivares com maior resistência deve ser levado em consideração, já que é um importante

aliado no manejo integrado de doenças, por ser uma alternativa de baixo custo e boa eficiência em relação, por exemplo, ao controle químico. Ainda não se sabe os mecanismos de resistência envolvidos nesse patossistema. Futuras pesquisas precisam determinar se há, dentre as cultivares utilizadas no país ou nos programas de melhoramento, mais fontes que tenham um grau elevado de resistência à antracnose, o que não é um simples estudo, devido à complexidade do conjunto de espécies do gênero *Colletotrichum* que podem causar a doença.

3.5. Conclusões

No teste de comparação de agressividade entre *C. plurivorum* e *C. truncatum* na cultivar de soja AMS Tibagi, o isolado da segunda espécie se mostrou mais agressivo do que os isolados de *C. plurivorum* avaliados. O mesmo comportamento foi observado no teste de transmissão semente-planta, em que para os isolados LFN0008, CMES1059 e CMES1076, a taxa de transmissão do patógeno da semente para a planta variou entre 75% e 79% e para o isolado LFN0019 foi de, aproximadamente, 37%.

Não foi observada transmissão dos isolados de *C. truncatum* e *C. plurivorum* para os grãos quando inoculados em plantas de soja da cultivar AMS Tibagi nos estágios R2 e R5, além de não afetarem a produção de vagens e grãos quando comparados ao tratamento não inoculado.

No teste de reação de cultivares a *C. plurivorum*, dentre as nove cultivares inoculadas com dois isolados do fungo, a AMS Tibagi foi a que apresentou maior resistência, pois não teve sua qualidade fisiológica afetada na presença do inóculo, enquanto que as demais cultivares foram afetadas nos parâmetros avaliados. Esse resultado deve ser levado em consideração em futuras pesquisas com a espécie *C. plurivorum*, inclusive em repetições dos testes de transmissão realizados neste estudo.

Referências

- AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016.
- BARBIERI, M. C. G. et al. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, Sept. 2017.
- BEN-DANIEL, B.; BAR-ZVI, D.; TSROR (LAHKIM), L. Transmission of *Colletotrichum coccodes* via tomato seeds. **Phytoparasitica**, v. 38, n. 2, p. 167–174, 27 Apr. 2010.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009.

- CARDWELL, K. F. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. **Plant Disease**, v. 73, n. 3, p. 255–257, 1989.
- CHEN, L. S. et al. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 11–12, p. 654–662, Dec. 2006.
- CHOWDAPPA, P. et al. Multilocus gene phylogeny reveals occurrence of *Colletotrichum cymbidiicola* and *C. cliviae* on orchids in north east India. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 2, p. 327–334, July 2014.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Brasília, 2018. v. 5
- COSTA, I. F. D. DA et al. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1684–1688, dez. 2006.
- COSTA, I. F. D. DA et al. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 47–50, Feb. 2009.
- COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), 1996.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, out. 2003.
- CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 415–430, 2004.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, Sept. 2014.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1–46, Mar. 2019.
- DIAO, Y.-Z. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia**, v. 38, p. 20–37, June 2017.
- DIAS, M. D. et al. Biology, pathogenicity, and haplotype analyses of *Colletotrichum cliviae*: a novel soybean anthracnose agent in warm tropical areas. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 5, p. 439–451, Oct. 2018.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, Mar. 2016.

- DOUANLA-MELI, C.; UNGER, J.-G. G.; LANGER, E. Multi-approach analysis of the diversity in *Colletotrichum cliviae* sensu lato. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 3, p. 423–435, Mar. 2018.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013.
- GALLI, J. A. et al. **Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum***. Arq. Inst. Biol. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74_2/galli.pdf>. Acesso em: 05 out. 2018.
- GAMARNIK, A. Prevention of infection of soybean seeds by *Colletotrichum truncatum* by polyamine biosynthesis inhibitors. **Phytopathology**, v. 84, n. 12, p. 1445–1448, 1994.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–30, Apr. 1995.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5 ed. ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres Ltda, 2016. p. 657–675.
- GROVER, R. K.; BANSAL, R. D. **Seed borne nature of *Colletotrichum capsici* in chilli seeds and its control by seed dressing fungicides**. [s.l.] Indian Phytopathological Society, 1970. v. 23
- GUERBER, J. C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 872–895, 2003.
- HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. Fourth edition. ed. St. Paul Minnesota.: APS Press, 1999.
- HYMOWITZ, T. Soybeans: The Success Story. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **Advances in new crops**. Portland, OR: Timber Press, 1990. p. 159–163.
- ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83–101, June 2013.
- KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158–164, June 2001.
- KUCHAREK, T. **Some common soybean leaf and stem diseases** Plant Pathology Fact Sheet Gainsville Plant Pathology Department, IFAS, University of Florida, 2001. Disponível em: <<https://plantpath.ifas.ufl.edu/media/plantpathifasufledu/factsheets/pp0016.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2018

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, July 2016.
- LIU, F. et al. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 63–86, Dec. 2015.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176–177, Nov. 1962.
- MAHMODI, F. et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 841–841, June 2013.
- MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. Fourth ed. St. Paul Minnesota: APS Press, 1999. p. 13–14.
- MASSON, G. DE L. et al. Transmissão planta-semente de *Colletotrichum truncatum* em soja. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 35–42, 2015.
- MAYONJO, D. M.; KAPOORIA, R. G. Occurrence and variability of *Colletotrichum truncatum* on soybean in Zambia. **EPPO Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 339–341, Aug. 2003.
- MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1981.
- MORDUE, J. E. M. *Colletotrichum graminicola*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, v. 132, 1967.
- NOETZOLD, R. et al. Variabilidade espacial de *Colletotrichum truncatum* em campo de soja sob três níveis de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 16–23, mar. 2014.
- PESQUEIRA, A. DA S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203–212, 2016.
- REY, M. S. et al. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 465–470, 2009.
- RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. **Plant Disease**, v. 82, n. 8, p. 959–959, Aug. 1998.
- ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402–415, Feb. 2017.

- SAINI, T. J.; GUPTA, S. G.; ANANDALAKSHMI, R. Detection of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum cliviae* in India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 12, n. 33, p. 1–4, Dec. 2017.
- SAJEEESH, P. K.; RAO, L.; JAHAGIRDAR, S. Molecular detection, transmission and histopathological studies of seed-borne fungal infection of soybean (*Glycine max* (L.) Merill). **The Bioscan**, v. 9, n. 1, p. 247–251, 2014.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992.
- SINGH, D. P. Relative susceptibility of soybean cultivars to pod blight caused by *Colletotrichum truncatum* (Schw.). **Agricultural Science Digest (Karnal)**, v. 13, n. 2, p. 90–92, 1993.
- SOUSA, E. S. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78–84, Feb. 2018.
- TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. DA C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1045–1052, out. 2003.
- THANGAVEL, T. et al. Detection of two *Peronospora* spp., responsible for downy mildew, in opium poppy seed. **Plant Disease**, p. PDIS-03-18-0503, Sept. 2018.
- THOMAS, G. J.; SWEETINGHAM, M. W. Fungicide seed treatments reduce seed transmission and severity of lupin anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 1, p. 39, 2003.
- VECHIATO, M. H.; KOHARA, E. Y.; MENTEN, J. O. M. Transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 265–269, 1997.
- VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 181–202, 28 July 2014.
- WEIDEMANN, G. J.; TEBEEST, D. O.; CARTWRIGHT, R. D. Host specificit of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aechynonebe* and *C. truncatum* in the Leguminosae. **Phytopathology**, v. 78, n. 7, p. 986–990, 1988.
- YANG, H.-C.; HARTMAN, G. L. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 99, n. 1, p. 143–148, Jan. 2015.
- YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. **Plant Disease**, v. 96, n. 11, p. 1699–1699, Nov. 2012.

- YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov.,
a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p.
32–42, Jan. 2014.
- YANG, Y. et al. Colletotrichum Species on Orchidaceae in Southwest China. **Cryptogamie,
Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229–253, Sept. 2011.
- YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. **Fungal Diversity**, 2009.
- ZHOU, Z.; LI, Y. L. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on *Zamioculcas
zamiifolia* in henan province, China. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 838–838, May 2017.

4. SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE SOJA A FUNGICIDAS

RESUMO

A diversidade de espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose na soja resulta em diferentes níveis de sensibilidade aos fungicidas utilizados no manejo da doença. Como existem poucos estudos atuais sobre a eficiência dos produtos registrados para o controle da doença no Brasil, objetivou-se com o trabalho determinar a sensibilidade a fungicidas de isolados de *C. plurivorum*, *C. truncatum*, *C. sojae* e *C. musicola* associados à soja e caracterizar molecularmente possíveis resistências aos grupos químicos estrobilurina (QoIs) e benzimidazol. A sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* foi avaliada pelos métodos de gradiente espiral de diluição com os fungicidas fludioxonil e difenoconazol, mistura dos fungicidas tiofanato-metílico e piraclostrobina ao meio fundente e germinação de esporos em meio de cultura com trifloxistrobina e piraclostrobina. Foram caracterizadas mutações ligadas a resistência aos fungicidas QoIs no citocromo *b* e aos benzimidazóis no gene da beta-tubulina. Isolados de *C. plurivorum* e *C. musicola*, provenientes de plantas sintomáticas de soja, apresentaram insensibilidade, baixa ou média sensibilidade aos fungicidas trifloxistrobina e piraclostrobina, pertencentes ao grupo das estrobilurinas, quanto à inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos. Para esses mesmos fungicidas, os isolados de *C. truncatum* e *C. sojae* foram classificados como altamente sensíveis (CE_{50} menor que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os isolados de *C. plurivorum* e *C. musicola* apresentaram a mutação E198A no gene da beta-tubulina, que confere resistência ao tiofanato-metílico, enquanto que os isolados de *C. truncatum* foram considerados altamente sensíveis ao produto no teste de inibição do crescimento micelial e não apresentaram a mutação no gene analisado. Isolados de *C. plurivorum* e de *C. truncatum*, avaliados no teste de inibição do crescimento micelial, foram considerados altamente sensíveis aos fungicidas difenoconazol e fludioxonil. A ineficiência dos fungicidas no controle da antracnose da soja no Brasil vem sendo relatada, acarretando em perdas na produção, sendo necessário o acompanhamento e a identificação das espécies envolvidas no patossistema e o monitoramento de resistências. Fungicidas com diferentes modos de ação devem ser investigados, além de estratégias de anti-resistência, visando estender a vida útil dos produtos químicos usados para controle de doenças.

Palavras-chave: *Colletotrichum plurivorum*; *Colletotrichum truncatum*; *Glycine max*; QoI; Benzimidazol

ABSTRACT

The diversity of *Colletotrichum* species that cause soybean anthracnose results in different levels of sensitivity to the fungicides used in the disease management. As there are few current studies on the efficiency of registered products for disease control in Brazil, the aim of this study was to determine the

fungicide sensitivity of *C. plurivorum*, *C. truncatum*, *C. sojae* and *C. musicola* associated with soybean and to characterize molecularly possible resistances to chemical groups strobilurin (QoIs) and benzimidazole. Fungicide sensitivity was evaluated *in vitro* by the spiral gradient dilution method with fludioxonil and difenoconazole, mixing the thiophanate-methyl and pyraclostrobin fungicides to the medium and spore germination in culture medium with trifloxystrobin and pyraclostrobin. Mutations linked to QoI fungicides resistance on cytochrome b and benzimidazoles in the beta-tubulin gene were characterized. *C. plurivorum* and *C. musicola* strains from symptomatic soybean plants showed insensitivity, low or medium sensitivity to trifloxystrobin and pyraclostrobin (QoIs) fungicides in mycelial growth and spore germination inhibition tests. For these same fungicides, the *C. truncatum* and *C. sojae* strains were classified as highly sensitive (EC_{50} less than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). *C. plurivorum* and *C. musicola* strains showed the E198A mutation in the beta-tubulin gene, which confers thiophanate-methyl resistance, whereas *C. truncatum* strains were considered highly sensitive to the product in the mycelial growth inhibition test and did not present the mutation in the analyzed gene. *C. plurivorum* and *C. truncatum* strains evaluated through the mycelial growth inhibition test were considered highly sensitive to difenoconazole and fludioxonil fungicides. The fungicides inefficiency for the soybean anthracnose control in Brazil has been reported, leading to losses in production. Thus, the identification of the species involved in the pathosystem and fungicide resistance monitoring are necessary. Fungicides with different modes of action should be investigated as well as anti-resistance strategies to extend the useful life of the chemicals used to control this disease.

Keywords: *Colletotrichum cliviae*; *Glycine max*; Fungicide resistance; QoI; Benzimidazole

4.1. Introdução

O gênero *Colletotrichum* é responsável por causar doenças em diversas culturas no mundo, normalmente conhecidas com o nome de antracnose. Na cultura da soja (*Glycine max* (Linnaeus) Merrill), a doença é comumente associada à espécie *C. truncatum*, porém há relatos da ocorrência de outras espécies de *Colletotrichum* associadas à doença (CHEN et al., 2006; DAMM et al., 2014; LEHMAN; WOLF, 1926; MAHMODI et al., 2013; MORDUE, 1967; RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012, 2014). Recentemente, foi relatada no Brasil uma nova espécie causando antracnose na soja, nomeada inicialmente como *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017) e atualmente reclassificada como *C. plurivorum* (DAMM et al., 2019).

O manejo da doença pode ser realizado com o uso do manejo integrado, associando o controle genético (uso de cultivares com resistência moderada), controle cultural (rotação de

culturas, adequação de populações de plantas, manejo adequado do solo, etc.) e controle químico (tratamento de sementes e parte aérea) (AMORIM et al., 2016).

Mais de 70 produtos comerciais estão registrados no Brasil para o controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da soja (AGROFIT, 2018). Alguns são registrados para o tratamento químico de sementes, uma das mais eficientes estratégias de controle de doenças transmitidas por sementes. Estes produtos são importantes na prevenção de infecções de patógenos presentes no solo ou de disseminação de inóculo transportado pela semente, que causam tombamento na fase inicial, garantindo maior uniformidade no estande de plantas e desenvolvimento da cultura (MUNKVOLD et al., 2014). Os demais produtos são registrados para aplicação na parte aérea, a fim de prevenir a infecção do patógeno ou paralisar sua colonização, além de reduzir as fontes de inóculo. Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis têm sido muito utilizados e se destacaram por algum tempo pela sua eficiência, tanto usados de forma isolada, quanto em mistura com outros ingredientes ativos, como triazóis e estrobilurinas (PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016).

Existem poucos estudos atuais sobre a eficiência dos produtos registrados para o controle da doença no Brasil. Dias et al. (2016) mostrou que a eficiência de nove fungicidas testados é limitada, com um valor máximo de 41,7% de eficiência de controle. Alguns fatores podem influenciar nesses resultados, como a redução na sensibilidade dos patógenos aos ingredientes ativos, o que se intensifica com a falta de monitoramento e manejo adequado da doença. A diversidade de espécies associadas à doença também dificulta o controle da antracnose na soja. No México, relatou-se a resistência de 20 isolados de *C. truncatum*, obtidos de plantas sintomáticas de pimentão, mamão e *Jatropha*, aos fungicidas azoxistrobina e tiabendazol (TORRES-CALZADA et al., 2015).

Os fungicidas do grupo das estrobilurinas possuem como modo de ação a inibição da síntese de quinona externa (QoIs), em que é inibida a transferência de elétrons, interferindo na síntese de ATP durante a respiração mitocondrial dos fungos, ligando-se ao sítio Qo do citocromo *bc₁* (*Cytb*) (XIAO et al., 2003). A resistência de fungos aos QoIs pode ocorrer como resultado de mutações pontuais no gene do citocromo b (*Cytb*). Foram relatadas três substituições de aminoácidos que conferem diferentes níveis de resistência aos QoIs. A mutação G143A resulta da substituição do aminoácido glicina pela alanina no códon 143, que confere alto nível de resistência, sendo a mutação mais encontrada nos isolados resistentes (GISI et al., 2002). Outras duas mutações são a F129L, mudança do aminoácido fenilalanina pela leucina no códon 129, e a G137R, referente a mudança do aminoácido glicina pela arginina na posição 137, as quais estão ligadas a níveis moderados de resistência (BARTLETT et al., 2002).

Os fungicidas do grupo do tiofanato-metílico (benzimidazóis) atuam na inibição da divisão celular, ligando-se à molécula da beta-tubulina (β -tub) e interrompendo a segregação e migração dos cromossomos (BRENNAN et al., 2007). A resistência a esses fungicidas é conferida quando ocorre uma das mutações já reportadas no gene da beta-tubulina. Cinco substituições de aminoácidos foram reveladas como responsáveis pela resistência ao tiofanato-metílico: a substituição de um ácido glutâmico (E) por alanina (A), glicina (G) ou lisina (K) no códon 198, ou a substituição de fenilalanina (F) por tirosina (Y) nos códons 167 ou 200 (CHUNG et al., 2006; MA; MICHAILIDES, 2005; WONG et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. de soja a fungicidas registrados no Brasil para o controle da antracnose e caracterizar molecularmente possíveis resistências aos grupos químicos estrobilurina e benzimidazol.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Isolados de *Colletotrichum*

Os isolados de plantas sintomáticas de soja das espécies *C. plurivorum*, *C. musicola*, *C. sojae* e *C. truncatum* utilizados neste trabalho provêm de isolados monospóricos preservados em fragmentos de papel filtro, armazenados em ultrafreezer a -80°C, do laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ-USP. Oito isolados de *C. plurivorum* (LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025) foram previamente caracterizados molecularmente (BARBIERI et al., 2017) e reclassificados no capítulo dois deste estudo. Neste mesmo capítulo foram caracterizados molecularmente os demais isolados da mesma espécie (LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053, LFN0088, LFN0104, LFN0116, LFN0145 e LFN0146), de *C. musicola* (LFN0074) e de *C. sojae* (LFN0009). Os dois isolados de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1076) foram caracterizados por Rogério et al. (2017).

4.2.2. Sensibilidade *in vitro* a fungicidas

Os fungicidas utilizados nos testes de sensibilidade *in vitro* estão descritos na Tabela 14 e foram selecionados com base nos ingredientes ativos registrados para controle da antracnose na cultura da soja no Brasil (AGROFIT, 2018).

Tabela 14. Fungicidas selecionados com base em ingredientes ativos registrados no Brasil para o controle de *Colletotrichum* spp. da soja, que foram avaliados nos ensaios de sensibilidade *in vitro*.

| Ingrediente ativo (i.a.) | Nome comercial | Grupo químico | Concentração i.a. | Classe toxicológica | Classe ambiental |
|--------------------------|-----------------|---------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| Tiofanato-metílico | Cercobin 700 WP | Benzimidazol | 700 g kg ⁻¹ | I - Extremamente tóxico | II- Muito perigoso |
| Fludioxonil | Maxim | Fenilpirrol | 25 g L ⁻¹ | IV - Pouco tóxico | III - Perigoso |
| Difecononazol | Score | Triazol | 250 g L ⁻¹ | I - Extremamente tóxico | II- Muito perigoso |
| Trifloxistrobina | Flint 500 WG | Estrobilurina | 500 g kg ⁻¹ | I - Extremamente tóxico | II- Muito perigoso |
| Piraclostrobina | Comet | Estrobilurina | 250 g L ⁻¹ | II - Altamente tóxico | II- Muito perigoso |

4.2.2.1. Crescimento micelial – método de gradiente espiral de diluição

No método de gradiente espiral de diluição foi determinada a CE₅₀ (concentração eficaz capaz de inibir 50% do crescimento fúngico) de dez isolados de *Colletotrichum* (*C. plurivorum*: LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023 e LFN0025; e *C. truncatum* CMES1059, CMES1076) a três fungicidas: tiofanato-metílico, fludioxonil e difenoconazol (FÖRSTER; KANETIS; ADASKAVEG, 2004).

Primeiramente, 50 mL de BDA semissintético contendo um adicional de 14 g L⁻¹ de ágar (BDAA⁺) foi vertido em placas de Petri (150 mm de diâmetro) para se obter uma camada espessa de 3,3 mm de BDAA⁺. Suspensões de esporos de cada isolado, obtidas a partir de colônias incubadas por 15 dias em câmara de incubação com alternância de luz, foram calibradas para 10⁵ esporos mL⁻¹. Um volume de 1 mL dessas suspensões foi transferido para o meio de cultura BDAA⁺ (um isolado por placa de Petri) e distribuído com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas a 25°C sob luz constante por três dias, até que a superfície da placa fosse completamente colonizada pelo fungo.

As soluções estoques dos fungicidas foram calculadas de acordo com o software Spiral Gradient Endpoint (SGE) e 50 µL destas soluções foram aplicadas em placas de Petri (150 mm de diâmetro com meio BDA semissintético em camada de 3,3 mm) de modo exponencial usando o equipamento Spiral Plate (Autoplate 4000, Spiral Biotech), de acordo com o intervalo de doses desejado do fungicida, resultando em um gradiente radial de 1:100. Para o tiofanato-metílico, foram utilizadas doses entre os intervalos de 0,03 a 3 µg mL⁻¹. Nos testes com fludioxonil, as doses avaliadas foram de 0,003 a 0,3 µg mL⁻¹, enquanto que para difenoconazol foram avaliadas doses entre 0,02 e 2 µg mL⁻¹.

Quatro tiras de inóculo, obtidas pelo corte em tamanhos iguais (45 x 6 mm) de faixas das colônias cultivadas em meio BDAA⁺, foram colocadas sobre as placas contendo fungicidas (duas tiras / isolado). Cada isolado foi repicado em três placas para cada fungicida.

Um tratamento controle (sem fungicida) foi incluído neste experimento. Neste caso, quatro isolados foram cultivados na mesma placa (quatro faixas, uma por isolado, distribuídos de forma equidistante), com três repetições. As placas foram incubadas a 25°C sob luz constante por três dias. Após este período, o crescimento micelial dos isolados do tratamento controle foi avaliado por meio da medição do crescimento radial (a partir da borda das tiras de BDAA⁺) e a média das três repetições foi dividida por dois, o que representa 50% do crescimento do patógeno. Nos tratamentos com fungicidas, foi marcado o ponto onde o crescimento radial foi 50% da média do crescimento micelial nas placas do controle e, então, obtida a distância deste ponto para o centro da placa. Finalmente, usando o software SGE, foi calculada a concentração de fungicida no ponto em que foi verificado 50% do crescimento micelial e a CE₅₀ de cada isolado para cada fungicida foi estimada.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. Os testes foram realizados duas vezes com os três produtos e os 10 isolados. Após o cálculo da CE₅₀, média das duas repetições, os isolados de *Colletotrichum* foram classificados em quatro categorias de sensibilidade, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971), em que: CE₅₀< 1 µg mL⁻¹: alta sensibilidade (AS); CE₅₀ = 1-10 µg mL⁻¹: moderada sensibilidade (MS); CE₅₀ = 10-50 µg mL⁻¹: baixa sensibilidade (BS); CE₅₀> 50 µg mL⁻¹: insensibilidade (I).

4.2.2.2. Crescimento micelial – método de incorporação do fungicida ao meio fundente

A sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. ao tiofanato-metílico e à piraclostrobina foi testada usando o método de incorporação do fungicida ao meio fundente, haja visto que não foi possível determinar a CE₅₀ do tiofanato-metílico pelo método de gradiente espiral de diluição e, a partir de testes prévios, também foi decidido testar a sensibilidade ao fungicida piraclostrobina por este método.

Discos de micélio (6 mm de diâmetro) dos isolados de *Colletotrichum* spp. (para tiofanato-metílico: LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023, LFN0025, CMES1059 e CMES1076; para piraclostrobina: LFN0007, LFN0008, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023, LFN0025, LFN0039, LFN0116, LFN0146, LFN0009, LFN0074, CMES1059 e CMES1076), cultivados por 7 dias em placas com meio

BDA, foram transferidos para placas contendo BDA semissintético incorporado com tiofanato-metílico e, em outro ensaio, com piraclostrobina nas concentrações 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e placas com BDA sem fungicida. As placas foram incubadas sob luz constante, por 5 dias, a 25°C. Foram utilizadas três repetições por tratamento.

No teste com a piraclostrobina, foi utilizado o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM, 99% i.a.; Sigma-Aldrich), um inibidor da rota alternativa de respiração dos fungos, o qual foi dissolvido em metanol e adicionado ao meio autoclavado em concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Foram calculadas as médias dos diâmetros das colônias a partir de duas medidas perpendiculares. Com isso, a inibição do crescimento micelial foi obtida por meio da fórmula: $\text{ICM} = ((C-TF)/C)*100$, em que ICM é a inibição do crescimento micelial, C é o diâmetro da colônia do tratamento controle e TF é o diâmetro da colônia do tratamento com fungicida. A partir da porcentagem da inibição do crescimento micelial, foram realizadas análises de regressão e estimados os valores da CE_{50} dos fungicidas. A sensibilidade dos isolados foi determinada de acordo com a escala de Edgington et al. (1971).

4.2.2.3. Germinação de esporos

A sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. à estrobilurina foi testada pelo método de germinação de esporos. Para isso, foi utilizado o método de incorporação do fungicida no meio de cultura fundente.

Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade de um isolado de *C. truncatum* (CMES1059) para o fungicida trifloxistrobina nas concentrações 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para cinco isolados de *C. plurivorum* (LFN0007, LFN0010, LFN0016, LFN0019 e LFN0025) na concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em ambos os casos foi utilizado um tratamento controle sem fungicida. Foi utilizado apenas uma dose para os isolados de *C. plurivorum* pois já havia sido observado, em testes preliminares, que os mesmos não eram sensíveis as doses menores.

O fungicida foi incorporado ao meio de cultura ágar-água, ainda em estado fundente (60°C), para se obter placas de Petri (90 x 15 mm) com as concentrações acima citadas, além do controle sem fungicida. Foram utilizadas três repetições por tratamento. Cada placa recebeu três gotas de 30 μL de suspensão de esporos de 1 a 8×10^4 esporos mL^{-1} , em local demarcado na parte inferior da placa, sendo as suspensões obtidas conforme técnica citada no item 3.2.2.1. As placas foram mantidas em câmara de incubação a 25°C, no escuro, por 12 horas para os isolados de *C. truncatum* e por 18 horas para os isolados de *C. plurivorum*. Para pausar a germinação após o tempo determinado, adicionou-se 30 μL de lactoglicerol azul sobre o local demarcado.

Foi avaliada a porcentagem de germinação dos esporos em cada gota, sendo contabilizados os 100 primeiros esporos avaliados por gota de suspensão. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de comprimento maior do que o comprimento do esporo.

Na segunda repetição do teste, foram utilizados dois ingredientes ativos do grupo das estrobilurinas, a trifloxistrobina e a piraclostrobina. Nesta repetição, foram avaliados os seguintes isolados: LFN0007, LFN0010, LFN0016, LFN0019, LFN0039, CMES1059 e CMES1076, na concentração 100 µg mL⁻¹ para os dois produtos, e o controle sem fungicida, com o mesmo número de repetições e metodologia citada acima.

Em todos os testes foi utilizado o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM, 99% i.a.; Sigma-Aldrich) dissolvido em metanol e adicionado ao meio autoclavado em concentração de 100 µg mL⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. A partir dos dados obtidos, foi calculada a porcentagem de germinação de esporos dos tratamentos. O resultado da porcentagem de inibição da germinação de esporos de *C. truncatum* foi submetido à análise de regressão (com os dados da primeira repetição do teste). Por meio da equação de regressão, foi estimado o valor da CE₅₀ do fungicida e sua sensibilidade, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971).

4.2.3. Caracterização molecular das mutações que conferem resistência a fungicidas

4.2.3.1. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas inibidores extracelulares de quinona (QoI - estrobilurinas): gene do citocromo b (*cytb*)

Para investigar possíveis mutações no gene do citocromo b (*cytb*) em *C. plurivorum*, o gene do *cytb* foi parcialmente amplificado de dois isolados (LFN0010 e LFN0023) por PCR, utilizando os primers grami1F (5'-GAAGAGGTATGTTACGGTTCATATAG-3') e grami1R (5'-TAGCAGCTGGAGTTGCATAG-3') de Forcelini et al. (2016). A PCR foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega), 8,5 µL de água livre de nucleasse, 10 µM de cada primer e 50 ng µL⁻¹ de DNA. Os parâmetros da reação de amplificação foram iguais aos descritos por Forcelini et al. (2016), somente reduzindo a temperatura de anelamento para 48°C, devido à dificuldade de amplificar essa região nas amostras de DNA de *C. plurivorum*. Para aumentar a concentração do produto de PCR obtido,

foi realizada uma *nested* PCR, em que o produto de PCR da primeira reação foi usado como molde para a amplificação na segunda reação, mantendo-se os demais parâmetros.

Os produtos das *nested* PCRs foram separados em gel de agarose 3%, de onde os fragmentos de tamanho esperado (aproximadamente 500 pb) foram cortados e purificados com o auxílio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). As amostras foram enviadas para sequenciamento e, a partir das sequências obtidas, foram desenhados novos pares de *primers* para amplificar o gene do *cytb* em todos os isolados de *C. plurivorum* do trabalho.

Com as duas sequências consensos obtidas, foram desenhados dois pares de primers, com o auxílio do programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012) para teste: o par CytbPlu-1, composto pelos iniciadores CytbPlu_1F (5'-GTAGCTATGGTATAGG-3') e CytbPlu_1R (5'-AGGGTTACTGATCCTACTG-3'), o qual amplifica um fragmento de 267 pares de bases; e o par CytbPlu-2, com os iniciadores CytbPlu_2F (5'-CTTAGCTATGGTATAGGTT-3') e CytbPlu_2R (5'-GGCATGAAGAATAACAAATAGGC-3'), que amplificam um fragmento de 386 pares de bases do citocromo b. As reações foram testadas utilizando-se os DNAs de isolados de *C. plurivorum* e um gradiente de temperatura de anelamento. Após avaliação das amostras em corrida eletroforética em gel de agarose 3%, concluiu-se que o melhor par foi o CytbPlu-2. A PCR foi realizada em um volume de 25 µL contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega), 8,5 µL de água livre de nucleasse, 10 µM de cada primer CytbPlu-2 e 50 ng µL⁻¹ de DNA. Os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, e a desnaturação final de 5 min a 72°C.

Foram realizadas reações de PCR com o par de *primers* CytbPlu-2 para as amostras de DNA dos isolados LFN0007, LFN0008, LFN0009, LFN0010, LFN0016, LFN0018, LFN0019, LFN0023, LFN0025, LFN0039, LFN0045, LFN0051, LFN0053, LFN0074, LFN0088, LFN0104, LFN0116, LFN0145, LFN0146, CMES1059 e CMES1076. Os produtos de PCR foram purificados (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega) e as amostras foram enviadas para sequenciamento em ambas as direções. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com o software Sequencher v.4.7, traduzidas para aminoácidos com o auxílio do Expasy Bioinformatics Resource Portal, em seguida foram analisadas com o auxílio do software Mega7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) para observar se possuem as mutações, especialmente nos códons 129, 137 e 143.

4.2.3.2. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas benzimidazóis (tiofanato-metílico): gene da beta-tubulina (β -tub)

A fim de identificar mutações no gene da beta-tubulina, na região em que geralmente ocorre mutações nos códons 167, 198 e 200 (WONG et al., 2008; YOUNG et al., 2010), amplificou-se e sequenciou-se parte do gene beta-tubulina dos isolados analisados no item anterior de *C. plurivorum*, *C. musicola*, *C. sojae* e *C. truncatum*. Foram utilizados para amplificação o conjunto de primers TUB2 (WONG et al., 2008): T2-1 (5'-CTCCCTTGGTGGAGGTACTG-3') e T2-2 (5'-AGAGGCAGCCATCATGTTCT-3') para amplificar um fragmento de 499 pb, contendo os aminoácidos dos códons 138 a 303. A reação de PCR foi realizada segundo Wong et al. (2008) e a purificação das amostras e sequenciamento foram realizados conforme o item 4.2.3.

4.3. Resultados

4.3.1. Sensibilidade *in vitro* a fungicidas

4.3.1.1. Crescimento micelial – método de gradiente espiral de diluição

Os valores da CE₅₀ dos isolados de *C. plurivorum* para o fungicida difenoconazol variaram entre 0,052 e 0,148 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valor médio de 0,088 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em comparação, para os isolados de *C. truncatum*, os valores da CE₅₀ para o mesmo produto variaram entre 0,748 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,814 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valor médio de 0,781 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 15). Apesar da média da CE₅₀ dos isolados de *C. truncatum* ser quase nove vezes maior do que a média da CE₅₀ dos isolados de *C. plurivorum*, todos os isolados analisados foram considerados altamente sensíveis ao difenoconazol (CE₅₀ < 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) segundo a escala de Edgington et al. (1971).

Para o fludioxonil, os isolados de *C. plurivorum* apresentaram valores da CE₅₀ variando entre 0,031 e 0,148 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o valor médio foi de 0,054 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Enquanto que os valores da CE₅₀ dos isolados de *C. truncatum* para o mesmo fungicida variaram entre 0,063 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,069 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valor médio de 0,066 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 15). Para este produto, também, os dez isolados avaliados foram considerados altamente sensíveis.

O teste de sensibilidade ao fungicida tiofanato-metílico pelo método de gradiente espiral de diluição não foi conclusivo, já que o espectro de dose utilizado nas duas repetições foi muito baixo, não sendo possível determinar a CE₅₀ dos isolados. Por essa razão, foi realizado o teste de sensibilidade pelo método de incorporação do fungicida ao meio fundente.

Tabela 15. Sensibilidade (CE_{50}) de isolados de *Colletotrichum* aos fungicidas difenoconazol e fludioxonil, obtidos utilizando o método de gradiente espiral de diluição.

| Isolados | CE_{50} Difenoconazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CE_{50} Fludioxonil ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|----------------------------|---|---|
| LFN0007 | 0,071 | 0,033 |
| LFN0008 | 0,053 | 0,148 |
| LFN0010 | 0,148 | 0,038 |
| LFN0016 | 0,140 | 0,049 |
| LFN0018 | 0,052 | 0,038 |
| LFN0019 | 0,080 | 0,064 |
| LFN0023 | 0,106 | 0,031 |
| LFN0025 | 0,055 | 0,029 |
| CMES1059 | 0,814 | 0,063 |
| CMES1076 | 0,748 | 0,069 |
| Média <i>C. plurivorum</i> | 0,088 | 0,054 |
| Média <i>C. truncatum</i> | 0,781 | 0,066 |

4.3.1.2. Crescimento micelial – método de incorporação do fungicida ao meio fundente

Os oito isolados de *C. plurivorum*, testados pelo método de incorporação do fungicida tiofanato-metílico ao meio fundente, tiveram a CE_{50} muito maior do que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, pela escala de Edgington et al. (1971) eles são considerados insensíveis ao produto. Enquanto que os dois isolados de *C. truncatum* apresentaram a CE_{50} menor do que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerados altamente sensíveis ao fungicida tiofanato-metílico (Figura 8).

No teste com o fungicida piraclostrobina, os isolados CMES1059, CMES1076 (ambos *C. truncatum*) e LFN0009 (*C. sojae*) tiveram a CE_{50} menor do que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, são altamente sensíveis ao fungicida. Os isolados LFN0146 (*C. plurivorum*) e LFN0074 (*C. musicola*) foram considerados moderadamente sensíveis ($CE_{50} = 1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$), o isolado LFN0008 (*C. plurivorum*) foi considerado insensível, com a $CE_{50} 5194 \mu\text{g mL}^{-1}$, e os demais isolados de *C. plurivorum* tiveram baixa sensibilidade ($CE_{50} = 10-50 \mu\text{g mL}^{-1}$), segundo a escala de Edgington et al. (1971) (Tabela 16).

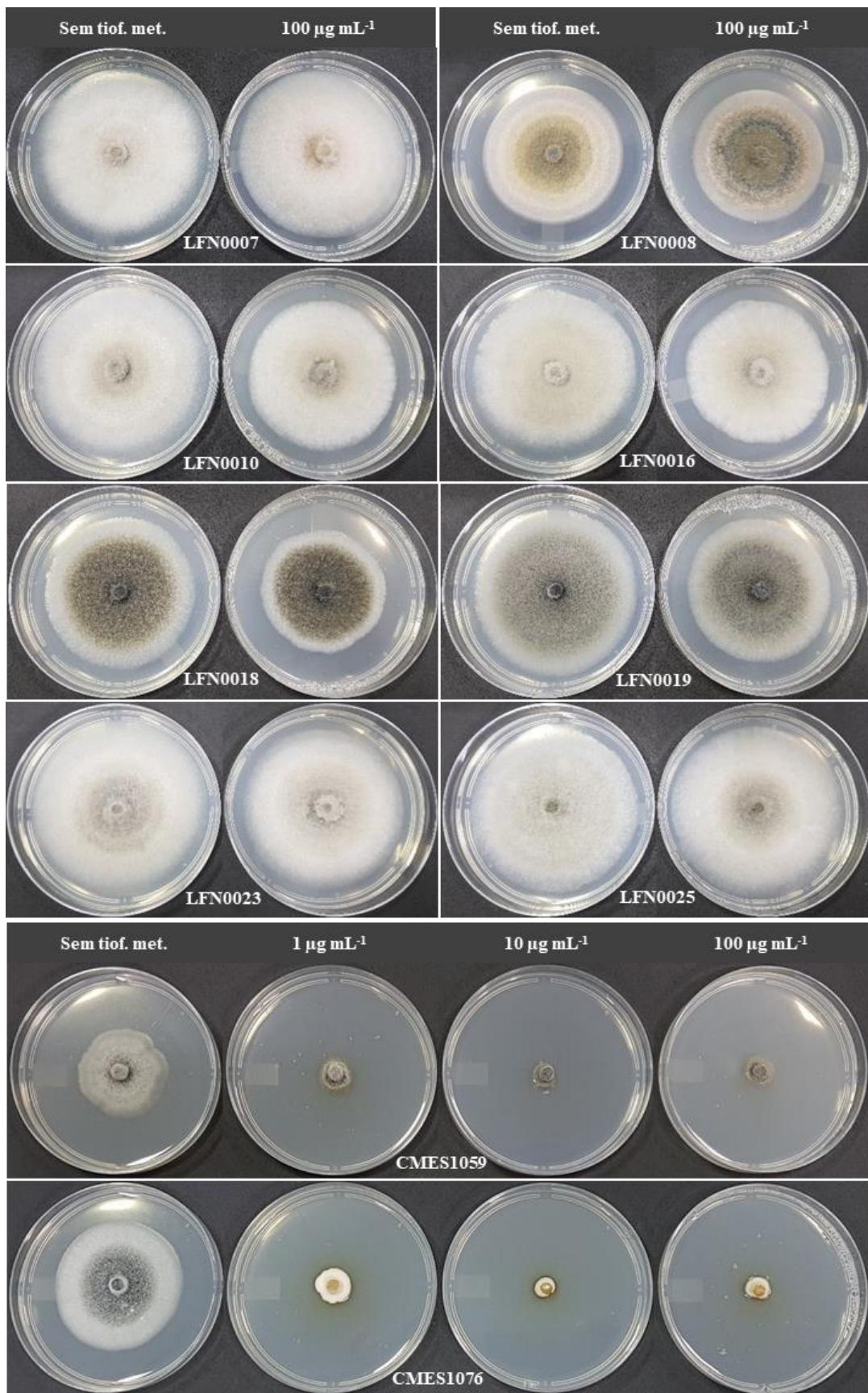


Figura 8. Aspectos das colônias de *Colletotrichum* spp., em meio BDA semissintético, com (1, 10 e 100 µg mL⁻¹) e sem tiofanato-metílico, após cinco dias de crescimento sob luz constante.

Tabela 16. Sensibilidade (CE_{50}) de isolados de *Colletotrichum* ao fungicida piraclostrobina, obtidos utilizando o método de incorporação do fungicida ao meio fundente.

| Isolado | CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|----------|-------------------------------------|
| LFN0007 | 11,03 |
| LFN0008 | 5194,24 |
| LFN0010 | 16,55 |
| LFN0016 | 15,48 |
| LFN0018 | 30,21 |
| LFN0019 | 19,51 |
| LFN0023 | 16,95 |
| LFN0025 | 27,87 |
| LFN0039 | 29,84 |
| LFN0116 | 21,59 |
| LFN0146 | 8,87 |
| LFN0074 | 3,91 |
| LFN0009 | < 0,02 |
| CMES1059 | 0,02 |
| CMES1076 | < 0,02 |

4.3.1.1. Germinação de esporos

A germinação dos esporos de *C. plurivorum* não foi inibida pelos fungicidas do grupo das estrobilurinas (trifloxistrobina e piraclostrobina) com concentrações de até $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 17 e 18), por isso não foi possível estimar a CE_{50} dos isolados ao produto. Para o isolado de *C. truncatum* CMES1059, a CE_{50} obtida para o produto trifloxistrobina pela equação de regressão foi de $0,51 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerado altamente sensível.

Tabela 17. Porcentagem de germinação de esporos de isolados de *Colletotrichum plurivorum* em meio de cultura ágar-água com trifloxistrobina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sem fungicida, com SHAM, após 18 horas de incubação.

| Isolado | Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Germinação de esporos (%) |
|---------|--------------------------------|---------------------------|
| LFN0007 | 0 | 43,75 |
| | 10 | 46,25 |
| LFN0010 | 0 | 31,75 |
| | 10 | 33,75 |
| LFN0016 | 0 | 33,25 |
| | 10 | 32,5 |
| LFN0019 | 0 | 64,5 |
| | 10 | 71,5 |
| LFN0025 | 0 | 27,75 |
| | 10 | 33 |

Tabela 18. Porcentagem de germinação de esporos de isolados de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura ágar-água com trifloxistrobina e piraclostrobina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sem fungicida, com SHAM, após 18 horas de incubação.

| Isolado | Fungicida | Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Germinação de esporos (%) |
|----------------|------------------|--|----------------------------------|
| LFN0007 | ausente | 0 | 72,67 |
| | trifloxistrobina | 100 | 78,00 |
| | piraclostrobina | 100 | 79,44 |
| LFN0010 | ausente | 0 | 68,00 |
| | trifloxistrobina | 100 | 64,11 |
| | piraclostrobina | 100 | 64,44 |
| LFN0016 | ausente | 0 | 77,67 |
| | trifloxistrobina | 100 | 76,44 |
| | piraclostrobina | 100 | 76,67 |
| LFN0019 | ausente | 0 | 71,33 |
| | trifloxistrobina | 100 | 76,33 |
| | piraclostrobina | 100 | 60,67 |
| LFN0039 | ausente | 0 | 71,67 |
| | trifloxistrobina | 100 | 78,22 |
| | piraclostrobina | 100 | 74,22 |
| CMES1059 | ausente | 0 | 95,56 |
| | trifloxistrobina | 100 | 0 |
| | piraclostrobina | 100 | 0 |
| CMES1076 | ausente | 0 | 76,11 |
| | trifloxistrobina | 100 | 0 |
| | piraclostrobina | 100 | 0 |

A partir dos resultados dos testes de sensibilidade aos fungicidas realizados, é possível verificar na Tabela 19 a classificação da sensibilidade dos isolados de espécies de *Colletotrichum*, segundo a escala de Edgington et al. (1971).

Tabela 19. Classificação da sensibilidade de isolados de soja de *Colletotrichum* spp. aos fungicidas difenoconazol, fludioxonil, tiofanato-metílico, trifloxistrobina e piraclostrobina, segundo a escala de Edginton et al. (1971).

| Isolados | Espécie | Difenconazol | Fludioxonil | Tiofanato-metílico | Trifloxistrobina | Piraclostrobina |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | | Crescimento micelial | Crescimento micelial | Crescimento micelial | Germinação de esporos | Crescimento micelial |
| LFN0007 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | I | BS |
| LFN0008 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | - | I |
| LFN0010 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | I | BS |
| LFN0016 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | I | BS |
| LFN0018 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | - | BS |
| LFN0019 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | I | BS |
| LFN0023 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | - | BS |
| LFN0025 | <i>C. plurivorum</i> | AS | AS | I | I | BS |
| LFN0039 | <i>C. plurivorum</i> | - | - | - | - | BS |
| LFN0116 | <i>C. plurivorum</i> | - | - | - | - | BS |
| LFN0146 | <i>C. plurivorum</i> | - | - | - | - | MS |
| LFN0074 | <i>C. musicola</i> | - | - | - | - | MS |
| LFN0009 | <i>C. sojae</i> | - | - | - | - | AS |
| CMES1059 | <i>C. truncatum</i> | AS | AS | AS | AS | AS |
| CMES1076 | <i>C. truncatum</i> | AS | AS | AS | AS | AS |

*Escala de Edginton et al. (1971): CE₅₀< 1 µg mL⁻¹: alta sensibilidade (AS); CE₅₀ = 1-10 µg mL⁻¹: moderada sensibilidade (MS); CE₅₀ = 10-50 µg mL⁻¹: baixa sensibilidade (BS); CE₅₀> 50 µg mL⁻¹: insensibilidade (I); (-) = isolado não avaliado.

4.3.2. Caracterização molecular das mutações que conferem resistência a fungicidas

4.3.2.1. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas inibidores extracelulares de quinona (QoI - estrobilurinas): gene do citocromo b (*cyt b*)

As sequências de nucleotídeos traduzidas de parte do gene do *cyt b* de 17 isolados de *C. plurivorum*, um isolado de *C. musicola*, um isolado de *C. sojae* e dois isolados de *C. truncatum* não apresentaram substituições de aminoácidos nos três códons de interesse, ou seja, nem mesmo os isolados que foram insensíveis aos fungicidas do grupo das estrobilurinas no teste *in vitro* apresentaram mutações que expliquem a insensibilidade (Figura 9).

| Espécie | Isolado | Sensibilidade <i>in vitro</i> | Acesso GenBank | 129 | | | 137 | | | 143 | | |
|----------------------|----------|----------------------------------|-------------------|-------|---|---------------|-----|-----------|---|-------------|---|--|
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0007 | Insensível | MK163894 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0008 | Não testado | MK163895 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0010 | Insensível | MK163896 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0016 | Insensível | MK163897 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0018 | Não testado | MK163898 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0019 | Insensível | MK163899 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0023 | Não testado | MK163900 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0025 | Insensível | MK163901 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0039 | Insensível | MK163902 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0045 | Não testado | MK163903 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0051 | Não testado | MK163904 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0053 | Não testado | MK163905 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0088 | Não testado | MK163906 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0104 | Não testado | MK163907 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0116 | Não testado | MK163908 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0145 | Não testado | MK163909 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0146 | Não testado | MK163910 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. musicola</i> | LFN0074 | Não testado | MK163911 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. sojae</i> | LFN0009 | Não testado | MK163912 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. truncatum</i> | CMES1059 | Sensível | MK163913 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |
| <i>C. truncatum</i> | CMES1076 | Sensível | MK163914 | G I G | F | L G Y V L P Y | G | Q M S L - | G | A T V I T N | L | |

Figura 9. Sequências alinhadas de aminoácidos de parte do gene do citocromo b, códons 126 a 150, de espécies de *Colletotrichum* spp. isoladas de plantas de soja. Não foram observadas mutações nos códons 129, 137 e 143, associadas à resistência a estrobilurinas, em nenhum dos isolados. Aminoácidos: A – alanina; F - fenilalanina; G - glicina; I - isoleucina; L - leucina; M - metionina; N - asparagina; P - prolina; Q - glutamina; S - serina; T - treonina; V - valina; Y - tirosina.

4.3.2.2. Mutações ligadas a resistência aos fungicidas benzimidazóis (tiofanato-metílico): gene da beta-tubulina (β -tub)

As sequências de nucleotídeos do gene da beta-tubulina (correspondente aos códons 152 a 300) obtidas dos 17 isolados de *C. plurivorum*, um isolado de *C. musicola*, um isolado de *C. sojae* e dois isolados de *C. truncatum*, após serem traduzidas para proteínas, não apresentaram mutações nos códons 167 e 200. Porém, no códon 198, nas sequências de proteínas dos isolados da espécie *C. plurivorum* e *C. musicola*, há uma substituição do aminoácido ácido glutâmico (E) por alanina (A), o que confere resistência ao tiofanato-metílico, confirmando os resultados do teste *in vitro* realizado com alguns isolados de *C. plurivorum*. Já os isolados de *C. truncatum* e *C. sojae* não apresentaram a mutação (Figura 10).

| Espécie | Isolado | Acesso GenBank | | 170 | 190 | 200 | |
|----------------------|-----------------|----------------|-------|---------------|---------------------|---------------|--|
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0007 (res) | MK188480 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0010 (res) | MK188481 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0016 (res) | MK188482 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0018 (res) | MK188483 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0019 (res) | MK188484 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0023 (res) | MK188485 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0025 (res) | MK188486 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0039 (res) | MK188487 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0045 (res) | MK188488 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0051 (res) | MK188489 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0053 (res) | MK188490 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0088 (res) | MK188491 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0104 (res) | MK188492 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0116 (res) | MK188493 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. plurivorum</i> | LFN0145 (res) | MK188494 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. musicola</i> | LFN0074 (res) | MK188495 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D A | T F C I D N E | |
| <i>C. sojae</i> | LFN0009 (sens) | MK188496 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D E | T F C I D N E | |
| <i>C. truncatum</i> | CMES1059 (sens) | MK188497 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D E | T F C I D N E | |
| <i>C. truncatum</i> | CMES1076 (sens) | MK188498 | A T F | S V V P | V H Q L V E N S D E | T F C I D N E | |

Figura 10. Sequências alinhadas de aminoácidos de parte do gene da beta-tubulina, códons 165 a 171 e 189 a 205, de espécies de *Colletotrichum* spp. isoladas de plantas de soja. Destacado em preto, é possível observar mutações no códon E198A em todos os isolados de *C. plurivorum* e no isolado de *C. musicola*. Aminoácidos: A - alanina; D - ác. aspártico; E - ác. glutâmico; F - fenilalanina; H - histidina; I - isoleucina; L - leucina; N - asparagina; P - prolina; Q - glutamina; S - serina; T - treonina; V - valina.

4.4. Discussão

O manejo de doenças na cultura da soja no Brasil é realizado principalmente pelo controle químico, considerado uma forma eficiente, com resultados rápidos, facilmente aplicáveis e com utilização cada vez mais difundida. Porém, o uso intenso e, às vezes, de forma inadequada pode acarretar seleção de isolados fúngicos resistentes aos ingredientes ativos utilizados (FRAC, 2018).

Os fungicidas que apresentam maior risco ao desenvolvimento de resistência são os sítio-específico (unisítio), aqueles com modos de ação específicos e que foram introduzidos mais recentemente no mercado. Eles atuam em processos celulares específicos, diferente das moléculas mais antigas, que são conhecidas como inibidores multi-sítio por atuarem em uma ampla gama de processos celulares. Desta forma, a insensibilidade aos sítio-específico pode ocorrer com a mudança de uma única proteína alvo, enquanto que para os multi-sítio são necessárias múltiplas mudanças. Essas características, somadas ao modo de ação altamente ativo, sistematicidade nas plantas, bom controle com doses baixas, a biologia e epidemiologia dos patógenos, fazem com que os sítio-específico tenham alta vulnerabilidade ao

desenvolvimento de resistências. Os fungicidas com modo de ação unisítio são altamente seletivos a determinados organismos e, ao mesmo tempo, pouco tóxicos aos seres humanos e a outras espécies não-alvo. Alguns exemplos de grupos químicos de fungicidas sítio-específico são os benzimidazóis, estrobilurinas, triazóis e carboxamidas. Dos multi-sítio, os mais utilizados são os ditiocarbamatos (mancozeb), cloronitrilas (clorotalonil), cúpricos e sulfurados (BRENT; HOLLOMON, 2007; LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015).

Apesar dos fungicidas serem aplicados comumente em misturas no Brasil, ação importante no manejo de resistências, isso não foi suficiente no caso dos isolados de *C. plurivorum*, que apresentaram insensibilidade ou baixa sensibilidade aos fungicidas QoIs e resistência ao tiofanato-metílico. Nos ensaios *in vitro*, o fludioxonil (fenilpirrol) se mostrou eficiente no controle de oito isolados de *C. plurivorum* e de dois isolados de *C. truncatum*. Gao et al. (2018) determinaram a sensibilidade de 205 isolados de pimenta de *C. acutatum* ao fludioxonil e estes tiveram em média a CE₅₀ de 0,031 µg mL⁻¹, sendo que não foram encontradas populações de campo resistentes ao produto. O valor foi próximo da média encontrada nos isolados do presente trabalho (CE₅₀ de 0,056 µg mL⁻¹), considerados altamente sensíveis. No estudo de Cruz Jimenez et al. (2018) o mesmo produto não foi eficiente na inibição do crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum* coletados de plantas sintomáticas de soja. O modo de ação do fludioxonil não foi elucidado, mas há sugestões de que seu alvo químico seja a via de transdução de sinal reguladora osmótica (FURUKAWA et al., 2012). Desta forma, apesar dos isolados testados serem sensíveis a essa molécula, é importante acompanhar os níveis de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. e de outras espécies fúngicas causadoras de doenças na soja a este produto, pois, por ser muito utilizado no tratamento de sementes no país, a seleção de isolados resistentes pode ocorrer.

Da mesma forma, os isolados estudados foram sensíveis ao difenoconazol. De acordo com esse comportamento, Dias et al. (2016) mostraram que dentre nove fungicidas testados, somente a mistura de azoxistrobina e ciproconazol (mesmo grupo químico do difenoconazol) reduziu significativamente a incidência da antracnose na soja comparada ao tratamento sem aplicação de fungicidas. A espécie associada à doença no trabalho citado foi *C. truncatum*, o qual também teve, no presente estudo, dois isolados avaliados *in vitro* (CMES1059 e CMES1076) e foi considerado altamente sensível à trifloxistrobina (mesmo grupo químico da azoxistrobina). O modo de ação do difenoconazol é a inibição da síntese de membranas (DMIs), por meio da inibição da síntese do ergosterol, ligando-se à enzima 14α-desmetilase, sendo, portanto, um fungicida sítio-específico. Apesar de ter o modo de ação específico, a ocorrência de resistência decorrente do uso de DMIs em fungos fitopatogênicos é relativamente rara, tendo

sido relatada em *Phakopsora pachyrhizie*, *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *Monilinia fructicola*, *Erysiphe necator* e *Blumeria graminis* (BRENT; HOLLOMON, 2007; CHEN; LIU; SCHNABEL, 2013; MAIR et al., 2016; RALLOS; BAUDOIN, 2016; SCHMITZ et al., 2014; WYAND; BROWN, 2005).

A sensibilidade dos isolados de *C. plurivorum* testados no método de germinação de esporos teve como resultado insensibilidade aos fungicidas trifloxistrobina e piraclostrobina, enquanto que no método de inibição de crescimento micelial, com a mistura do fungicida piraclostrobina no meio fundente, os isolados de *C. plurivorum* foram considerados insensíveis, com baixa ou moderada sensibilidade segundo a escala de Edginton et al. (1971). Esse comportamento já foi observado em trabalhos como o de Torres-Calzada et al. (2015), em que isolados de *C. truncatum* tiveram a sensibilidade avaliada pelo método de inibição de crescimento micelial, com fungicida incorporado ao meio de cultura, e se mostraram insensíveis ou com sensibilidade intermediária ao fungicida azoxistrobina (CE_{50} entre 37,7 e 6318,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Isolados de *C. acutatum* de plantas de pimenta na China, testados quanto a sensibilidade a três fungicidas QoIs, se mostraram sensíveis à piraclostrobina tanto na inibição do crescimento micelial quanto na germinação de esporos, porém para azoxistrobina a CE_{50} chegou à 5,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (moderada sensibilidade) e para a picoxistrobina à 44,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (baixa sensibilidade) (GAO et al., 2017). No trabalho de Forcelini et al. (2016), um nível de resistência similar foi encontrado em alguns isolados de *C. acutatum*, coletados de morangos nos períodos de 2012-13, 2013-14 e 2014-15, os quais foram considerados altamente resistentes aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina quando a CE_{50} era superior a 100 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Ou seja, se fosse levada em consideração a classificação desse trabalho para o fungicida piraclostrobina, em que os isolados com a CE_{50} acima de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados altamente resistentes, dez isolados de *C. plurivorum* no presente trabalho seriam considerados altamente resistentes, ao invés de possuírem baixa sensibilidade conforme classificados na escala de Edginton et al. (1971). A resistência aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina em *C. acutatum* de morangos foi conferida por dois pontos de mutação no citocromo b: em 18 isolados, as sequências indicaram a presença das substituições de aminoácidos de F129L (resistência moderada) e G143A (alta resistência) (FORCELINI et al., 2016). Essas mutações, além da G137R, já haviam sido relatadas anteriormente (BAGGIO; PERES; AMORIM, 2018; BARTLETT et al., 2002; GISI et al., 2002; GRASSO et al., 2006; HU et al., 2015; NEDDAF et al., 2017).

Era esperado que ocorressem mutações no gene do *cytb* nos isolados de *C. plurivorum*, já que eles se mostraram insensíveis aos fungicidas do grupo das estrobilurinas. Uma possível

explicação para esse comportamento poderia ser a heteroplasmia do gene do citocromo *b*, em que podem ocorrer frequências alélicas diferentes no mesmo organismo, ou seja, isolados resistentes podem expressar alelos que caracterizam sensibilidade e, neste caso, estaria sendo expresso o alelo G143. No trabalho de Angelini et al. (2012), mutantes espontâneos de *Botrytis cinerea* com resistência à trifloxistrobina foram selecionados em laboratório a partir de isolados sensíveis do tipo selvagem, porém a mutação G143A não foi detectada. Já nos isolados resistentes do campo, todos apresentaram a mutação. Esses autores sugeriram que isso se deve ao estado heteroplasmático das mitocôndrias resistentes, em que os mutantes de laboratório eram instáveis na ausência de seleção de fungicidas, acarretando a rápida perda de resistência.

Também se referiram à heteroplasmia do *cytb* Vielba-Fernández et al. (2018). Eles detectaram a mutação G143A tanto em isolados resistentes de *Podosphaera xanthii* como em isolados sensíveis. Para entender melhor a problemática, os autores desenvolveram um qPCR alelo-específico para quantificar a abundância dos alelos G143 (sensível) e A143 (resistente). Nos isolados resistentes, foi detectada alta abundância do alelo A143 (70%), enquanto que os isolados sensíveis também carregavam o alelo mutante em frequências de 10 a 60%. Como apenas foi utilizado PCR convencional no presente trabalho, não foi realizada a quantificação de frequências alélicas, porém estudos nesse sentido poderiam ser desenvolvidos com isolados de *C. plurivorum* para tentar explicar a insensibilidade à estrobilurina. Além disso, outros possíveis mecanismos de resistência aos QoIs podem ser investigados, como o efluxo de moléculas indesejáveis (proteínas transportadoras de efluxo) (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008; HAWKINS; FRAAIJE, 2018). A importância desse esclarecimento é grande, pois vale ressaltar que as doses recomendadas do produto estrobilurina, intensamente utilizadas em campos de produção tanto de soja, quanto das culturas de sucessão (milho, feijão, algodão, trigo, etc.), para o controle da antracnose e das demais doenças não iriam funcionar para essa nova espécie de patógeno. Relatos recentes da antracnose causando perdas na produção podem estar associadas à insensibilidade aos fungicidas dessas espécies envolvidas no patossistema (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Diferente dessa situação, a resistência dos isolados de *C. plurivorum* ao fungicida tiofanato-metílico, identificada primeiramente no ensaio *in vitro*, foi comprovada pela ocorrência da mutação E198A em todos os isolados caracterizados molecularmente, além do isolado de *C. musicola*. Já os isolados de *C. truncatum* não apresentaram a substituição de aminoácidos, estando de acordo com o teste *in vitro*, juntamente com o isolado de *C. sojae*. A mutação supracitada já havia sido detectada em isolados de *C. truncatum* no trabalho de Torres-

Calzada et al. (2015), além de outros trabalhos com o gênero *Colletotrichum* (HAN et al., 2018; HU et al., 2015; WONG et al., 2008; YOUNG et al., 2010).

É possível observar que os dois fungicidas para os quais isolados da nova espécie causadora da antracnose na soja, *C. plurivorum*, apresentaram insensibilidade ou resistência são sítio-específicos, ou seja, aqueles com modo de ação específicos e maiores riscos de desenvolvimento de resistências (BRENT; HOLLOMON, 2007). Como este é o primeiro estudo de sensibilidade a fungicidas da espécie *C. plurivorum*, não se sabe se as resistências são restritas apenas aos isolados testados ou se a espécie carrega esta característica em todas as populações. Outra informação que deve ser ressaltada é que já foi relatada a presença de reprodução sexuada e produção de ascósporos na espécie (DAMM et al., 2019), permitindo gerar mais genótipos adaptados do fungo por recombinação genética. Esporos sexuais podem ser disseminados a longas distâncias, conferindo maior dificuldade no controle da doença. Sob uma perspectiva evolutiva, populações de fungos submetidas a ciclos de reprodução sexual e assexual são consideradas como de alto risco em termos do seu potencial para superar resistência a medidas de controle como aplicações de fungicidas e uso de cultivares resistentes (MCDONALD; LINDE, 2002). Neste caso, o controle químico da doença se torna cada vez mais difícil, necessitando um acompanhamento periódico da eficiência dos produtos utilizados.

Conforme citado anteriormente (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016), a ineficiência dos fungicidas no controle da antracnose da soja no Brasil vem sendo relatada, acarretando em perdas na produção, sendo necessário o acompanhamento e identificação das espécies envolvidas no patossistema e o monitoramento de resistências. Este estudo demonstrou que a caracterização de novas espécies causando doenças nos campos de soja é importante, já que a sensibilidade aos fungicidas frequentemente utilizados pode alterar, não só a seleção de isolados resistentes em espécies já recorrentes, mas também o aparecimento de novas espécies insensíveis a diferentes ingredientes ativos. A ocorrência de mutações que conferem resistências a fungicidas em isolados de *C. truncatum* patogênicos à soja nunca foi relata no mundo. No entanto, para *C. plurivorum*, recém relatado como patogênico à soja no país (BARBIERI et al., 2017; DAMM et al., 2019), uma mutação que confere resistência ao tiofanato-metílico foi detectada neste trabalho em todos os isolados, juntamente com a insensibilidade ou baixa sensibilidade à fungicidas QoIs (trifloxistrobina e piraclostrobina), enquanto que os isolados de *C. truncatum* avaliados apresentaram alta sensibilidade a esses dois grupos químicos. Para ambas as espécies, os isolados também foram altamente sensíveis ao fludioxonil e difenoconazol. Estes dois últimos ingredientes ativos citados associados a outros fungicidas com diferentes modos de ação, por exemplo os multi-sítio, poderiam ser utilizados

de modo conjunto em aplicações foliares e no tratamento de sementes. Vale reforçar que o uso de misturas só é eficiente quando os princípios ativos utilizados, testados de forma isolada, são efetivos no controle da doença.

Assim, fungicidas com diferentes modos de ação devem ser investigados, além de estratégias de anti-resistência, visando estender a vida útil dos produtos químicos. Além disso, pode-se estudar a viabilidade e eficiência do uso de controle alternativo com produtos biológicos e também de pesquisas visando seleção de cultivares resistentes.

4.5. Conclusões

Isolados de *Colletotrichum plurivorum* e *C. musicola*, provenientes de plantas sintomáticas de soja, apresentaram insensibilidade, baixa ou média sensibilidade aos fungicidas do grupo das estrobilurinas (QoIs) trifloxistrobina e piraclostrobina quanto à inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos. Para esses mesmos fungicidas, os isolados de *C. truncatum* e *C. sojae* foram classificados como altamente sensíveis (CE_{50} menor que 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os isolados de *C. plurivorum* e *C. musicola* apresentaram a mutação E198A no gene da beta-tubulina, que confere resistência ao tiofanato-metílico. Dos isolados caracterizados molecularmente quanto à resistência, oito isolados de *C. plurivorum* foram também testados *in vitro* e apresentaram insensibilidade ao fungicida na dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados de *C. truncatum* foram considerados altamente sensíveis ao produto no teste de inibição do crescimento micelial e não apresentaram a mutação no gene analisado, assim como o isolado de *C. sojae*.

Os oito isolados de *C. plurivorum* e os dois isolados de *C. truncatum*, avaliados no teste de inibição do crescimento micelial, foram considerados altamente sensíveis aos fungicidas difenoconazol e fludioxonil.

Referências

- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em: 22 maio 2018.
- AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016.

- ANGELINI, R. M. D. M. et al. Genetic analysis and molecular characterisation of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. **Pest Management Science**, v. 68, n. 9, p. 1231–1240, Sept. 2012.
- BAGGIO, J. S.; PERES, N. A.; AMORIM, L. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. **Plant Disease**, v. 102, n. 9, p. 1803–1810, Sept. 2018.
- BARBIERI, M. C. G. et al. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, 20 set. 2017.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, July 2002.
- BRENNAN, G. P. et al. Understanding triclabendazole resistance. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, n. 2, p. 104–109, Apr. 2007.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance:** the assessment of risk. [s.l.] FRAC, 2007.
- CHEN, F.; LIU, X.; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1063–1068, Aug. 2013.
- CHEN, L. S. et al. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 11–12, p. 654–662, Dec. 2006.
- CHUNG, W.-H. et al. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, v. 90, n. 4, p. 506–512, Apr. 2006.
- CRUZ JIMENEZ, D. R. et al. Isolate–cultivar interactions, in vitro growth, and fungicide sensitivity of *Fusarium oxysporum* isolates causing seedling disease on soybean. **Plant Disease**, v. 102, n. 10, p. 1928–1937, Oct. 2018.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, 1 Sept. 2014.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1–46, Mar. 2019.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, Mar. 2016.

- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, n. 1, p. 42–44, 1971.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, p. 1–9, 2008.
- FORCELINI, B. B. . et al. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitors fungicides. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2050–2056, 2016.
- FÖRSTER, H.; KANETIS, L.; ADASKAVEG, J. E. Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus–fungicide interactions. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 163–170, Feb. 2004.
- FRAC. FRAC Code List ©*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). p. 14, 2018.
- FURUKAWA, K. et al. Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. **FEBS Letters**, v. 586, n. 16, p. 2417–2422, July 2012.
- GAO, Y.-Y. et al. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 6, p. 521–528, Nov. 2017.
- GAO, Y. et al. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 3, p. 639–651, Mar. 2018.
- GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859–867, Sept. 2002.
- GRASSO, V. et al. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 62, n. 6, p. 465–472, June 2006.
- HAN, Y. et al. Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 1391–1400, June 2018.
- HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 339–360, Aug. 2018.
- HU, M.-J. et al. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 806–814, June 2015.

- LEHMAN, S. G.; WOLF, F. A. Soy-bean anthracnose. **Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 4, p. 381–390, 1926.
- LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v. 90, p. 29–92, Jan. 2015.
- MA, Z.; MICHAELIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853–863, Oct. 2005.
- MAHMODI, F. et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 841–841, June 2013.
- MAIR, W. J. et al. Demethylase inhibitor fungicide resistance in *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* associated with target site modification and inducible overexpression of *Cyp51*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1279, Aug. 2016.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 349–379, Sept. 2002.
- MORDUE, J. E. M. *Colletotrichum graminicola*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, v. 132, 1967.
- MUNKVOLD, G. P. et al. Benefits of chemical seed treatments on crop yield and quality. In: **Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 89–103.
- NEDDAF, H. M. et al. Equal distribution of mating type alleles and the presence of strobilurin resistance in algerian *Zymoseptoria tritici* field populations. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 544–549, Apr. 2017.
- PESQUEIRA, A. DA S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203–212, 2016.
- RALLOS, L. E. E.; BAUDOIN, A. B. Co-occurrence of two allelic variants of CYP51 in *Erysiphe necator* and their correlation with over-expression for DMI resistance. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. e0148025, Feb. 2016.
- RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. **Plant Disease**, v. 82, n. 8, p. 959–959, Aug. 1998.
- ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402–415, Feb. 2017.

- SCHMITZ, H. K. et al. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 378–388, Mar. 2014.
- TORRES-CALZADA, C. et al. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and Characterization of Thiabendazole-Resistant Isolates. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, 2015.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, Aug. 2012.
- VIELBA-FERNÁNDEZ, A. et al. Heteroplasmy for the cytochrome *b* gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain. **Plant Disease**, v. 102, n. 8, p. 1599–1605, Aug. 2018.
- WONG, F. P. et al. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. **Plant Disease**, v. 92, n. 2, p. 239–246, Feb. 2008.
- WYAND, R. A.; BROWN, J. K. M. Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 726–735, Aug. 2005.
- XIAO, K. et al. Effect of famoxadone on photoinduced electron transfer between the iron-sulfur center and cytochrome *c* ₁ in the cytochrome *bc* ₁ complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11419–11426, Mar. 2003.
- YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. **Plant Disease**, v. 96, n. 11, p. 1699–1699, Nov. 2012.
- YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 32–42, Jan. 2014.
- YOUNG, J. R. et al. Two mutations in β-tubulin 2 gene associated with thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereale* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. **Plant Disease**, v. 94, n. 2, p. 207–212, Feb. 2010.