



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**ETIOLOGIA, DIVERSIDADE DO AGENTE CAUSAL E
CONTROLE QUÍMICO DA ANTRACNOSE DA SOJA**

MOAB DIANY DIAS

**Brasília – DF
2014**

MOAB DIANY DIAS

**ETIOLOGIA, DIVERSIDADE DO AGENTE CAUSAL E CONTROLE QUÍMICO DA
ANTRACNOSE DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientador

Prof. Dr. Adalberto C. Café Filho

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Moab Diany

Etiologia, diversidade do agente causal e controle da antracnose da soja./ Moab Diany Dias

Brasília, 2014.

Número de páginas p. 146 il.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título.

*Ao meu esposo Valdeci e ao meu querido
filho Pedro Augusto*

OFEREÇO.

*Aos meus pais Divino e Marta e
ao meu irmão Dierry.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por permitir a realização dos meus sonhos.

Aos meus pais por todos os esforços, compreensão, amor e confiança em mim depositados ao longo dos anos e por cuidar da minha família na minha ausência.

Ao meu esposo, pelo amor, carinho, compreensão em todos os momentos que passamos juntos e naqueles em que estive ausente, e colaboração na condução dos trabalhos.

Ao meu filho Pedro Augusto pela paciência, tolerância e por ter suportado a minha ausência em momentos tão delicados da sua infância, sempre me apoiando com muito amor.

À Universidade Federal do Tocantins pela liberação das minhas atividades para a realização do curso.

Aos professores da UFT Wilson Ferreira e Aloísio pelo apoio e colaboração.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor Dr. Adalberto C. Café Filho, pela orientação e ensinamentos transmitidos e por sua amizade.

Ao Dr. Mauricio Conrado Meyer e a Dra. Norma Formento, pelo envio de isolados e amostras de soja com sintomas de antracnose, contribuindo diretamente na viabilização deste trabalho.

Aos professores, Dr. José Carmine Dianese, Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, Dr. Joenes Mucci Peluzio e a Dra. Maria Ester Noronha F. Boiteux., por ter aceito o convite para participar desta banca e pelas sugestões.

Aos amigos Leandro, Roberto C. Branco e Jacir Luís Sgorla pela colaboração e confiança.

À Embrapa CENARGEN e CNPH por disponibilizar suas estruturas.

Ao Dr. Márcio Elias Ferreira pela colaboração nos trabalhos executados no CENARGEM.

A Agrícola Wehrmann por ceder espaço físico e sementes de soja do seu banco de germoplasma para realização dos testes de patogenicidade e comportamento varietal. E ao funcionário e amigo Daniel Lage pela colaboração na condução dos ensaios.

Aos meus queridos amigos, Justino, Liamar e Maria do Desterro pelo companheirismo, dedicação, e pela grande amizade.

Aos professores do programa de pós graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos.

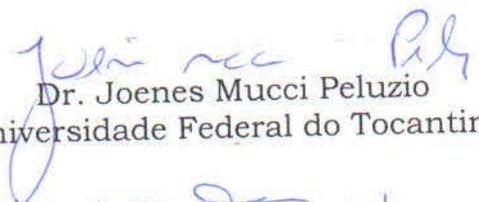
Aos colegas de curso pelos momentos compartilhados.

À CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de estudos.

**ETIOLOGIA, DIVERSIDADE DO AGENTE CAUSAL E CONTROLE QUÍMICO DA
ANTRACNOSE DA SOJA**

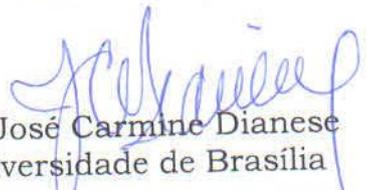
MOAB DIANY DIAS

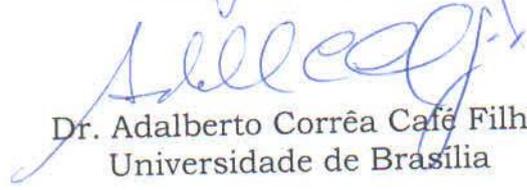
TESE APROVADA em 25/04/2014 por:


Dr. Joenes Mucci Peluzio
Universidade Federal do Tocantins


Dra. Maria Esther Noronha Fonseca Boiteux
Embrapa Hortaliças


Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Universidade de Brasília


Dr. José Carmine Dianese
Universidade de Brasília


Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL – 2014

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	xiv
THESIS ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	14
CAPÍTULO 1	15
VARIABILIDADE MORFO-MOLECULAR DE <i>Colletotrichum truncatum</i> ASSOCIADO À ANTRACNOSE DA SOJA NA AMÉRICA DO SUL	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1-INTRODUÇÃO	17
2-MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1- Origem dos isolados	20
2.2- Obtenção dos isolados	21
2.3- Obtenção das culturas puras e manutenção	21
2.4- Caracterização morfológica, morfométrica e cultural	22
2.5- Produção de micélio para extração de DNA	23
2.6- Extração e quantificação do DNA	23
2.7- Reação de amplificação e visualização dos fragmentos de DNA	24
2.8- Análise dos dados	25
2.9- Análise de Componentes Principais	26
2.10- Caracterização de isolados por sequenciamento do gene CHS-1	26
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1- Caracterização morfométrica	27
3.2- Sequenciamento	29

3.3- Análise da estrutura das populações de <i>C. truncatum</i> da América do Sul pela técnica RAPD.	29
4- CONCLUSÕES	34
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2	53
CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE <i>Colletotrichum cliviae</i> e <i>C. truncatum</i> COMO AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE DA SOJA.	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1- INTRODUÇÃO.....	55
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 - Obtenção dos isolados.....	59
2.2. Caracterização morfométrica, morfológica e cultural	60
2.3- Caracterização molecular	60
2.3.1- Extração do DNA.....	60
2.3.2- Amplificação e sequenciamento de regiões gênicas	61
2.3.3 - Alinhamento das sequências	62
2.3.4- Análises filogenéticas	62
2.4 - Patogenicidade e agressividade dos isolados e reação de cultivares.....	63
2.4.1 -Produção do inóculo e inoculação.....	63
2.4.2- Inoculação e avaliação da incidência e severidade da doença	64
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1- Caracterização morfológica, morfométrica e cultural.....	65
3.3- Análise filogenética.....	67
3.4-Patogenicidade e agressividade de <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>C. cliviae</i> em plântulas de soja	69
3.4.1-Incidência em cotilédones	69
3.4.2- Incidência em caule.....	69
3.4.3-Agressividade.....	70

3.4.4- Reação de cultivares de soja	71
4-CONCLUSÕES	74
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
CAPÍTULO 3	110
AVALIAÇÃO DE FUNGICIDAS E PERDAS DE PRODUTIVIDADE CAUSADAS PELA ANTRACNOSE DA SOJA.....	110
RESUMO	110
ABSTRACT	111
1-INTRODUÇÃO	112
2-MATERIAL E MÉTODOS	115
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
3.1-Incidência da doença e perdas de produtividade em campo, safra 2010/2011.....	117
3.2-Incidência da doença e perdas de produtividade em campo, safra 2011/2012.....	117
4-CONCLUSÕES	122
5-REFERÊNCIAS.....	123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Características culturais das colônias de isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de regiões produtoras de soja do Brasil e da Argentina, aos 7 dias de cultivo em meio BDA, 12 horas luz a 25°C±2. UnB: 2014. (D = Diâmetro; VC = Velocidade de crescimento, MC = Margem da colônia, ZC = Zona de Crescimento)40

Tabela2- Matriz diagonal de distância genética entre os isolados provenientes das diversas regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina43

Tabela 3- Primers e suas respectivas sequências utilizados no estudo de variabilidade de *C. truncatum*, via RAPD, número de bandas por primer e tamanho dos fragmentos gerados em pb por cada primer44

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Primers usados para amplificação PCR e sequenciamento do DNA de *Colletotrichum cliviae*80

Tabela 2- Isolados de *Colletotrichum* usados neste estudo, com número do GenBank para seis genes.....81

Tabela 3 – Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* cultivados em meio BDA por 7 dias e incubados a 25°C ± 2°C.82

Tabela 4- Dimensões de conídios e apressórios de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* cultivados em meio BDA durante 7 dias e incubados a 24°C ± 2°C.....83

Tabela 5- Descrição da análise estatística para Actina, β-tubulina, CAL, CHS1, GPDH e ITS, determinado pelo PAUP84

Tabela 6: Experimento fatorial com sua respectiva análise de variância, com as fontes de variação: experimento, cultivar, isolado e interações entre os fatores para a variável, incidência em cotilédone. Programa, ASSISTAT versão 7.7 beta (2013). UnB:2014.....85

Tabela 7- Incidência da antracnose em cotilédones de 16 cultivares inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae*.....86

Tabela 8- Incidência de seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* em cotilédones de 16 cultivares de soja.Brasilia:2014.....87

Tabela 9: Experimento fatorial com sua respectiva análise de variância, com as fontes de variação: experimento, cultivar, isolado e interações entre os fatores para a variável incidência em caule. Programa, ASSISTAT versão 7.7 beta (2013)88

Tabela 10- Incidência da antracnose em Caule de 16 cultivares inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* na cultura da soja.....89

Tabela 11- Incidência de seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* em caule inoculados em 16 cultivares de soja.....90

Tabela 12: Análise de variância referente ao segundo ensaio, conduzido em fevereiro de 2012. Fontes de variação, isolado e cultivar. Variável analisada: tamanho de lesão no caule. Programa estatístico SISVAR, teste de media Scott Knott 5%.UnB:2014.....91

Tabela 13- Tamanho de lesão típica de antracnose em caule, induzidas por 5 isolados de *Colletotrichum truncatum* e 1 isolado de *C. cliviae* em 16 cultivares de soja.....92

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1- Morfotipos de colônias de *Colletotrichum truncatum* provenientes de diversas regiões do Brasil e da Argentina, cultivadas em meio BDA por um período de 7 dias.45

Figura 2- Variabilidade dos conídios de isolados *Colletotrichum truncatum*, provenientes do Brasil e da Argentina, sequenciados, tendo a região gênica CHS como referência. Segue os isolados: **A-** 1.2EB, **B-** 4.3AR3, **C-** 10.3MM, **D-** 10C3MM, **E-** 11A2MM, **F-** 3.3AR3, **G-** 12.3AR3, **H-**13.1AR, **I-** 15.3MM, **J-** 5.1MM, **K** 6.1MM e **L-**14.3AR3.....46

Figura 3 – A-H - Produção de conídios de *C. truncatum* em setas férteis, mostrando detalhes da conidiogênese47

Figura 4- Produção de conídios de *C. truncatum* em conidiomas no interior dos acérvulos. **A, B, C, D, E, F-** detalhes da conidiogênese e das células conidiogênicas com formato cilíndrico-falcado e hialinas.....48

Figura 5- Diversidade genética da coleção de isolados de *Colletotrichum* associados a soja com uso do primer OPD-3.UnB 2014.....49

Figura 6- Dendograma de dissimilaridade genética de 54 isolados de *Colletotrichum truncatum* originários de diversas regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, agrupados pelo método UPGMA com o coeficiente de Jaccard, através da técnica RAPD...50

Figura 7- Projeção gráfica das distâncias genéticas de 54 isolados de *C. truncatum*, provenientes das principais regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, com base no coeficiente de Jaccard. UnB: 201451

Figura 8- Projeção gráfica tridimensional das distâncias genéticas de 54 isolados de *C. truncatum*, provenientes das principais regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, com base no coeficiente de Jaccard. UnB: 201452

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Sintomas de antracnose observados em lavouras comerciais de soja nos estados do TO e DF. **A,** lesão típica em cotilédones. **B,** sintomas no caule. **C,** lesão avermelhada deprimida na base do pecíolo. **D,** lesões nas nervuras com coloração castanha. **E,** lesões necróticas em vagens em granação. **F,** seca do pecíolo em vagem. **G,** vagem retorcida e negra. **H,** acérvulos com abundante esporulação em vagem. **I,** detalhes da massa de esporos produzidas pelos acérvulos. **J,** setas emergindo da massa de esporos dos acérvulos em vagem.94

FIGURA 2. Inoculação e sintomas induzidos por *Colletotrichum cliviae* isolado de

plantas de soja naturalmente infectadas.. **A**, Planta de taboa. **B**, Detalhes da produção de inóculo em Taboa autoclavada com abundante colonização. **C**, Estadio de desenvolvimento da plântula no momento da inoculação. **D**, detalhes do processo de inoculação. **E**. Vista geral do ensaio em casa de vegetação. **F**, testemunha. **G**, sintoma no caule após 10 dias da inoculação com *C. cliviae*. **H**, sintoma nas folhas cotiledonares após 10 dias da inoculação com *C. cliviae*.....95

FIGURA 3. *Colletotrichum truncatum*, isolado 10C3MM obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**, Estroma setoso. **B e F**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios falcados. **C-E**, setas férteis com produção de conídios a partir da extremidade. **G**, detalhes dos conídios. **H e I**, apressórios de formato variado.....96

FIGURA 4. *Colletotrichum truncatum*, isolado 5.1MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**, Estroma setoso. **B e D**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios cilíndrico-falcado. **C**, setas férteis com produção de conídios a partir da extremidade. **E,F,G** Apressórios. **H**, conidiogênese a partir de hifas **I**, detalhes dos conídios.....97

FIGURA 5. *Colletotrichum truncatum*, isolado 11.7MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica **A**, Estroma setoso. **B e C**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios cilíndrico-falcado. **D**, grupo de conídios **E**, Apressórios formando hifas em cultura. **F-G**, Apressórios oriundos da germinação de conídios. **I,J e H**, apressórios de formato variado.....98

FIGURA 6. *Colletotrichum truncatum*, isolado 6.1MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**, Estroma setoso. **B**, Célula conidiogênica formada em esporodóquio contida no estroma setoso. **C**, detalhes dos conídios **E-G**, Apressórios de formato variado99

FIGURA 7. *Colletotrichum truncatum*, isolado 11A2MM, obtidos de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**. Estroma setoso. **B**, Detalhes das setas. **C**, Célula conidiogênica fialídica portando um conídio. **D**, Massa de conidióforos **E**, conidióforo septados, alguns com células conidiogênicas. **F**, Grupo de células conidiogênicas. **G**, conídios. **H-K**, Apressórios na extremidade de tubos germinativos.....100

FIGURA 8. *Colletotrichum cliviae* isolado I5H visto em cultura e colonizando folha de Taboa, obtidos de plantas de soja naturalmente infectadas. **A**. aspecto da colônia. **B**. Estroma setoso. **C**. Detalhes das setas. **D**. Detalhes de uma seta verrugulosa. **E**. Massa de conídios. **F**. Conídio germinado

dando origem a apressório marrom escuro formando tubo de penetração. **G-H.** Apressórios de formato variado. **I,** Hifas e conídios. **J.** Ascoma Peritecióide suepidérmico em folha de Taboa autoclavadas. **K** Conjunto de ascos típicos de glomerella. **L,** Grupo de ascósporos.....101

Figura 9 – Cladograma consenso obtida pela análise de máxima parcimônia a partir das sequências da região ACT, GPDH, CAL, β -TUB, CHS1 (CHS1-79F CHS1-354R) , e ITS de *Colletotrichum* sp. associados a soja.....102

Figura 10 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica actina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum cliviae*, *C. coccodes*, *C. destructivum*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, associados a cultura da soja.....103

Figura 11 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica calmodulina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. cliviae*, *I5H* associados a cultura da soja. UnB:2014.....105

Figura 12 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica CHS1, entre os diversos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. cliviae*, *C. Coccodes*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, *I5H* associados a cultura da soja.UnB:2014.....106

Figura 13 – Comparação por alinhamento de sequências de DNA da região gênica que codifica GPDH , entre os diversos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. cliviae*, *C. Coccodes*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, associados a cultura da soja.UnB:2014.....107

Figura 14 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA do espaçador interno transcrito região ITS, entre os diversos isolados de *Colletotrichum coccodes*, *C.cliviae*, *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, associados a cultura da soja.UnB:2014.....108

Figura 15 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica β -tubulina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum cliviae*, *C. coccodes*, *C. destructivum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *I5H*. associados a cultura da soja.UnB:2014.....109

CAPÍTULO 3

Figura 1- Médias de temperatura e precipitação pluviométrica ocorridas nos períodos de condução dos ensaios. **1A-**condição climática do ensaio conduzido de novembro a Abril, referente a safra 2010/2011. **1B-** condição climática do ensaio conduzido de novembro a Abril, referente a safra 2011/2012.....125

Figura 2. Porcentagem da Incidência da antracnose em vagens, em função do controle químico, safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B) no município de Alvorada,TO. UnB:2014.126

Figura 3. Produtividade da soja em função do controle químico da antracnose, safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B), no município de Alvorada, TO.....127

Figura 4. Correlação entre incidência da antracnose em vagens e produtividade. safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B), no município de Alvorada, TO.....128

RESUMO GERAL

A soja (*Glycine max*) é considerada a mais importante cultura do agronegócio brasileiro. Se consideradas as lavouras contíguas da Argentina, atualmente mais de 50% da produção mundial de soja é procedente da América do Sul. Dentre diversas doenças, tem aumentado a prevalência e a intensidade da antracnose, causada principalmente por *Colletotrichum truncatum*. Relatos de epidemias severas, com expressiva redução de produtividade, são frequentes, especialmente nos plantios da região Centro-Norte. Pouco se sabe sobre a variabilidade morfológica, cultural e molecular de *C. truncatum* e de outras espécies associadas à antracnose da soja no cone sul da América do Sul. Desta forma, as características morfo-moleculares de 54 isolados de *C. truncatum* provenientes de regiões produtoras de soja do Brasil e da Argentina foram investigadas. Estudos morfométricos e culturais de *C. truncatum*, assim como o uso de RAPD, confirmam a existência desta diversidade nos isolados de *C. truncatum*. Alguns isolados apresentaram três tipos de conidiogênese, incluindo a formação de conídios através de células conidiogênicas nas extremidades das hifas, em conidomas no interior de esporodóquios setosos, através de setas férteis, e forma inédita para a espécie *C. truncatum*. O sistema RAPD foi eficaz para detectar a diversidade genética dos isolados de *C. truncatum* provenientes da América do Sul e para estabelecer o grau de similaridade entre eles. Este foi maior dentro do grupo de isolados provenientes da Argentina e menor dentro do grupo de isolados do Brasil. Além disso, os resultados correlacionaram diferentes grupos com a respectiva origem geográfica, com agrupamentos exclusivos ou quase exclusivos de isolados das províncias argentinas e brasileiras em grupos distintos. Além disso, foi reportada e caracterizada a patogenicidade de *Colletotrichum cliviae*, espécie de conídios cilíndricos, à soja, em comparação com *C. truncatum* e outras espécies de *Colletotrichum*. Um isolado de *C. cliviae* originário do Estado do Tocantins foi caracterizado morfológicamente e sua relação filogenética com *C. truncatum* e outras espécies foi estabelecida pelo sequenciamento parcial das regiões genômicas: quitina sintetase (CHS-1), B-tubulina2 (TUB-2), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GPDH), calmodulina (CAL), Actina (ACT) e rDNA ITS (ITS) e as sequências obtidas foram comparadas com sequências de outras espécies de *Colletotrichum* depositadas no GeneBank. Foram evidenciados clados de *Colletotrichum* associados à soja através da análise filogenética gerada a partir da análise de parcimônia. A análise filogenética agrupou o isolado de Tocantins com isolados de *C. cliviae*, com formação de subgrupos, indicando a existência de linhagens. A patogenicidade deste isolado, juntamente com cinco outros isolados de *C. truncatum* foi comparada em 16 genótipos de soja e diferenças de agressividade foram detectadas. Este é o primeiro relato de *C. cliviae* como agente etiológico da antracnose em soja e o primeiro relato da espécie no Brasil. Foi obtida a formação *in vitro* da fase ascógena de *C. cliviae*, pertencente a uma espécie do gênero *Glomerella*. Esta descoberta reforça o conceito que a antracnose em soja é causada por um complexo de espécies de *Colletotrichum*, tanto de conídios falcados quanto cilíndricos. As perdas devidas à doença no Brasil permanecem inderteminadas. Ainda, são frequentes os relatos de campo sobre a baixa eficiência de fungicidas para o controle da antracnose. Desta forma, testou-se a eficácia de fungicidas atualmente registrados para a cultura, bem como foram estimadas as perdas nas condições avaliadas. Foram conduzidos ensaios em lavouras comerciais em Alvorada, TO em duas safras consecutivas, com a cv. M-Soy 9144 RR. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições e parcelas de 18 m² (seis linhas de seis m). Foram realizadas duas aplicações de fungicidas, nos estádios R1/R2 e R5.2, e avaliados 10 produtos comerciais registrados para a cultura. A incidência de vagens sintomáticas foi determinada em R6. Na safra 2010/2011, apenas

Azoxistrobin + Ciproconazol apresentou índices de incidência da doença significativamente menores do que a testemunha, a qual não diferiu dos demais tratamentos. Na safra 2011/2012 não houve diferenças significativas entre os tratamentos e a testemunha. As incidências em vagens nas duas safras variaram entre 10.7-15.6% e 9.5-16.3% respectivamente. As produtividades variaram entre 3.288 e 3.708 Kg ha⁻¹ nas testemunhas e máximos de 3.966 e 4.110 Kg ha⁻¹ nas parcelas tratadas, respectivamente em 2010/2011 e 2011/2012. Foram detectadas fortes e significativas correlações negativas entre a produtividade e a incidência da antracnose (r entre 0,81 e 0,85 nas duas safras). Análise de regressão indicou que a cada 1% de incremento da doença, cerca de 90 Kg/ha de grãos foram perdidos. Conclui-se que é alta a diversidade de *C. truncatum*, principal agente causal da antracnose da soja na América do Sul e que populações desta espécie estão possivelmente estruturadas geograficamente; que a espécie *C. clivae* é patogênica à soja e ocorre em condições naturais no norte Brasil; que a doença é responsável por perdas significativas de produção e que o controle químico com fungicidas sintéticos é insuficiente como único método de manejo da doença.

THESIS ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) can be arguably considered the most important Brazilian field crop. If the contiguous Argentinian crops are included, more than 50% of the world's production comes from South America. Among several diseases, the prevalence and intensity of anthracnose, caused mainly by *Colletotrichum truncatum*, is increasing. Reports of severe epidemics, with expressive yield loss are frequent, especially from North-Central Brazil, but the reasons for these are not known. Knowledge about the morphological, cultural and molecular variability of *C. truncatum* and other anthracnose-related species associated to soybean in South America is scarce. Therefore, the morpho-molecular characteristics of 54 South American isolates of *C. truncatum* were studied in Chapter I. RAPD was used for estimating the genetic variability of the isolates. Results demonstrated morphological, cultural and genetic diversity of *C. truncatum*. Some isolates presented three types of conidiogenesis, including conidial formation from conidiogenous cells on hyphal extremities, in conidiomas in acervuli and in a yet-unreported manner for *C. truncatum*, directly from fertile setae. RAPD was efficient in detecting the genetic diversity present in the collection of *C. truncatum* isolates from South America, and was capable of establishing the degree of intra-group similarity, which is greater in the group of Argentinian isolates as compared to the group of Brazilian isolates. Furthermore, the results evidenced the correlation of geographical origin with molecular grouping, with the exclusive or semi-exclusive assembling of Brazilian and Argentinian isolates in distinct clades. Chapter 2 aimed at the description and pathogenic characterization of *Colletotrichum cliviae* (a cylindrical conidia species), as a yet unreported soybean pathogen, in contrast with *C. truncatum*. One isolate of *C. clivae*, from the state of Tocantins was characterized morphologically and its phylogenetic relation to *C. truncatum* and other *Colletotrichum* species was established, by means of comparison of fragments of the genomic region of the following genes: chitin synthetase (CHS-1), B-tubulin 2 (TUB-2), glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GPDH), calmodulin (CAL), Actin (ACT) and rDNA ITS (ITS), which were compared to the deposited sequences of several species of *Colletotrichum* at the GeneBank. Several clades of *Colletotrichum* associated to soybean were detected through parsimony analysis. The phylogenetic analysis clustered the TO isolate with other *C. clivae* isolates, albeit with the formation of subgroups, indicating the presence of fungal lines. Pathogenicity and aggressiveness of the *C. clivae* isolate was compared with other five *C. truncatum* isolates, on 10 soybean genotypes, and differences in aggressiveness were detected. This is the first report of *C. clivae* as an etiological agent of soybean anthracnose, and the first report of the species in Brazil. The teleomorph of *C. clivae* was obtained *in vitro* and corresponds to the genus *Glomerella*. This finding reinforces the concept that the etiology of soybean anthracnose is complex, involves several *Colletotrichum* species, including species with falcate and cylindrical conidia. A systematic study of soybean losses due to anthracnose has not been attempted in Brazil. However, field reports of low fungicide efficiency against the disease are frequent. Therefore, the objective of Chapter 3 was to elucidate the level of efficiency of present-day fungicides to control the disease and estimate grain yield lost due to anthracnose. Field studies were carried out for two consecutive years in commercial crops in Alvorada County, TO, on cv. M-Soy 9144 RR. A complete randomized experimental design was used, with four replicates and 18 sq-m plots (six 6-m lines). Fungicides were applied twice, at phenological stages R1/R2 and R5.2. Ten commercial formulas, approved for use in soybean were evaluated. The incidence of symptomatic pods was determined at R6. In the 2010/2011 season, only Azoxistrobin + Cyproconazole resulted in disease levels significantly lower than in the non-sprayed control plots, but it did not

differed significantly from the other treatments. In the 2011/2012 season, there were no differences among synthetic fungicide treatments and the non-sprayed control plots. The incidences of symptomatic pods varied between 10.7-15.6% and 9.5-16.3% in each respective planting season. Grain yields varied between 3,288 and 3,708 Kg ha⁻¹ in the non-sprayed plots and maxima between 3,966 and 4,110 Kg ha⁻¹ in treated plots, in 2010/2011 and 2011/2012, respectively. There were strong and statistically significant negative relations between grain yield and anthracnose incidence (r between 0.81 and 0.85 in the two seasons). Regression analysis indicated that for each 1% increment in disease incidence, c. 90 Kg of grain is lost per hectare. The following conclusions are offered: Populations of *C. truncatum*, the main etiological agent of soybean anthracnose in South America, are diverse and possibly geographically structured; *C. clivae* is pathogenic to soybean, and occurs naturally in field crops of Northern Brazil; Anthracnose is responsible to significant yield losses and chemical control by synthetic fungicides is insufficient for disease manage as the sole method of control.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa cultivada nos territórios que hoje constituem a China há mais de 5.000 mil anos e apresenta grande importância como oleaginosa no mercado mundial. A expansão da cultura no Brasil aconteceu a partir dos anos 70, em razão do interesse crescente da indústria de óleo e da demanda do mercado internacional (Zockun, 1978). Atualmente, é uma das mais importantes culturas agrícolas do agronegócio brasileiro.

O Brasil deverá se tornar o maior produtor mundial de soja na safra 2013/2014, de acordo com projeções divulgadas pelo Ministério da Agricultura. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) a próxima safra deverá render entre 87,6 milhões e 89,7 milhões de toneladas em uma área plantada de 29,3 milhões de ha. No mesmo período, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos prevê que a produção da commodity naquele país será de 85,7 milhões de toneladas (<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636>).

A Argentina, terceiro produtor mundial (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>), também tem previsão de safra recorde em 2013/2014, estimada em 54 milhões de toneladas em uma área de 20,3 milhões de ha. Desta forma, atualmente mais de 50% da produção mundial de soja é procedente da América do Sul.

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e, também em consequência da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%,

entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% em lavouras específicas (EMBRAPA, 2008).

A grande dimensão da área cultivada com soja, a monocultura e a semeadura direta favorecem a ocorrência das doenças, algumas das quais têm aumentado em prevalência e intensidade, como a antracnose. Esta doença, cujo agente causal é atualmente descrito no táxon *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore (Hyde *et al.*, 2009), tem causado perdas significativas quando as condições climáticas são favoráveis, temperatura acima de 25°C e período de molhamento superior a 24 h (Embrapa, 2008).

Identidade do agente causal da antracnose da soja

A antracnose da soja foi relatada pela primeira vez em 1917, na Coreia, por S. Takimoto e seu agente etiológico foi identificado por Hemmi como *Colletotrichum glycines* Hori e *Glomerella glycines* como fase teleomórfica (Lehman & Wolf, 1926). Em 1951, Tiffany concluiu que *G. glycines* é teleomorfo de *C. destructivum*. Contudo, Holderman (1950) e Tiffany & Gilman (1954) concluíram que *C. glycines* é indistinguível de *Colletotrichum truncatum*, agente etiológico da antracnose de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), devendo este nome ter prioridade por ter sido estabelecido primeiro. Portanto, atualmente, o agente causal da antracnose da soja é denominado *Colletotrichum truncatum* (Schw) Andrus & Moore (Hyde *et al.*, 2009).

Apesar de *C. truncatum* ser o taxon mais comumente associado com a antracnose da soja, outras espécies de *Colletotrichum* também estão envolvidas, tais como *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines* (Hori) (Lehman & Wolf), *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (teleomorfo *G. cingulata* (Ston.) Spauld; Schrenk) e *C. graminicola* (Ces.) Wilson (teleomorfo desconhecido) (Sinclair & Backman, 1989).

No Brasil, a antracnose foi observada pela primeira vez em 1961, no Rio Grande do Sul é considerada de ocorrência generalizada nas lavouras, afetando vagens em sua fase inicial de formação e, considerada por alguns autores, como um dos principais problemas da soja na região do cerrado (Nunes Junior *et al.*, 2003).

Colletotrichum é um gênero anamórfico pertencente à *Sordariomycetes* com fase ascógena em *Glomerella*. Recentemente foi eleito o oitavo mais importante grupo de fungos fitopatogênicos (Dean *et al.*, 2012). O foco do sistema de classificação é o estado anamórfico do gênero, uma vez que o estado teleomórfico é comum apenas em poucas espécies do gênero. (Vaillancourt *et al.*, 2000).

Colletotrichum truncatum pertence ao grupo de *Colletotrichum* com conídios curvos (Damm *et al.*, 2007) que inclui outras importantes espécies, tais como *C. graminicola* e *C. dematium*, que já foram associadas com a antracnose da soja (Hartman *et al.*, 1999). Recentemente duas espécies com conídios truncados, *C. chlorophyti* e *C. incanum*, foram descritas como causadoras da antracnose em soja nos EUA (Yang *et al.*, 2012, 2014), mas não foram encontradas em nenhuma outra região produtora. Além disso, segundo Hartmann *et al.* (1999), espécies de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos também estão associadas à antracnose da soja, tal como *C. gloeosporioides*.

Colletotrichum truncatum forma acérvulos típicos, com setas pigmentadas e septadas, conidióforos eventualmente ramificados próximo à base, células conidiogênicas cilíndricas, hialinas e fialídicas, conídios unicelulares, hialinos, falcados, produzindo apressório pigmentado e de formato variável, após a germinação. Em cultura pura, o conidioma é frequentemente reduzido, o tecido basal e as setas podem estar ausentes ou a célula conidiogênica pode ser formada diretamente no micélio.

Os conídios medem $19,5$ a 24×2 a $2,5$ μm , são fortemente curvados, fusiformes com as extremidades afiladas. Os apressórios são abundantes, com variação de $8,0$ a $11,5 \times 6,5$ a 8

um, clavados ou circulares. O táxon parece ter elevada diversidade intraespecífica (Alexopoulos *et al.*, 1996; Hyde *et al.*, 2009; Sutton, 1980). Outra importante espécie fitopatogênica de conídios curvos, *C. capsici* foi considerado semelhante a *C. truncatum*, podendo ser distinguido por seus hospedeiros e regiões de ocorrência. Estas duas espécies foram recentemente sinonimizadas, sendo *C. capsici* homônimo junior de *C. truncatum* (Hyde *et al.*, 2009).

O conjunto de informações disponíveis indica que a etiologia da antracnose da soja não está plenamente esclarecida necessitando de estudos aprofundados, especialmente na América do Sul. Até o momento na América do Sul, dentre as espécies com conídios curvos, apenas *C. truncatum* foi associada a soja e nenhum estudo de estrutura da população foi concluído e está disponível na literatura.

Sintomatologia

As plantas de soja podem ser infectadas em todos os seus estágios de desenvolvimento, atingindo folhas, pecíolos, hastes, vagens e pedicelos. Quando o fungo é transmitido pela semente, os primeiros sintomas são observados durante a germinação, causando damping-off em pré ou pós-emergência. Nas plântulas que emergem aparecem nos cotilédones lesões necróticas deprimidas de cor cinza a negra podendo ocasionar a morte da plântula (Bailey & Jeger, 1992; Campos *et al.*, 2006).

Os sintomas mais comuns são lesões escuras, de forma irregular, formando depressões nas hastes, pecíolos e, em vagens as quais nos estádios iniciais as mesmas adquirem coloração castanho-escura a negra e ficam retorcidas. Nas vagens em granação, as lesões iniciam-se por estrias de anasarca e evoluem para manchas negras, podendo atingir toda a vagem. As lesões nas vagens são de forma indefinida e de coloração castanho-escura, recobertas por acérvulos, cujas numerosas setas de cor negra facilitam a identificação da doença. Vagens infectadas no

início de sua formação podem não produzir sementes e, em casos de infecção tardia, a qualidade das sementes é afetada (Hartman *et al.*,1999). Nas folhas, resultam em lesões na parte abaxial das folhas, onde podem ser encontradas nervuras necrosadas de coloração negra.

Epidemiologia, manejo e perdas causadas pela antracnose da soja

O fungo pode infectar as sementes, tornando-as o principal veículo de disseminação e introdução da doença em novas áreas de cultivo, além de causar uma redução considerável da sua germinação (Henning, 1994). O patógeno sobrevive em restos de cultura e em outros hospedeiros, o que dificulta o manejo. A infecção pelo patógeno nos ramos e vagens, em anos com as condições climáticas favoráveis à doença, afeta o rendimento da cultura. A doença pode causar perda total na produção em função da alta redução do número de vagens, além de induzir a retenção foliar e a haste verde na planta (Embrapa, 2008).

As condições climáticas que favorecem o aparecimento da doença são chuvas prolongadas, dias nublados, temperatura entre 24 e 30°C, alta população de plantas, deficiência de potássio no solo e infestação e danos de percevejos (Embrapa, 2008). Também responsáveis pelo aumento da incidência da doença o cultivo contínuo da soja, o estreitamento nas entrelinhas e o uso de sementes infectadas (Embrapa, 2008). Outro fator que pode influenciar no desenvolvimento da doença é a quantidade de inóculo presente na área.

Em estudo realizado com antracnose da lentilha (*Lens culinaris*), também causada por *C. truncatum*, Chongo & Benier (2000), concluíram que quanto maior a concentração de inóculo, menor será o período de incubação, menor será o período latente, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da doença. Além disso, os mesmos autores definiram que entre 16 a 28°C, quanto maior a temperatura, menor o período de incubação, menor o período latente, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da

doença. Para o período de molhamento foliar, esses autores determinaram que quanto maior a sua duração (passando de 12 para 48 h), menor foi o período de incubação, menor o período latente do fungo, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da doença.

As duas principais fontes de inóculo da antracnose são as sementes e os restos culturais de soja, embora o fungo também possa estar presente em outras plantas hospedeiras. Os patógenos podem estar associados às sementes de diferentes maneiras, simplesmente acompanhando-as, aderidos à sua superfície e carregados de forma passiva ou, transportados nos tecidos internos, infectando as sementes. No caso de *Colletotrichum* spp., o fungo é transportado principalmente nos tecidos internos das sementes (Machado, 1988).

Colletotrichum truncatum possui uma ampla gama de hospedeiros. Alguns deles são: *Acácia longifólia*, *Alycarpus* sp., *A. zeyheri*, *Arachis hypogaea*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Cássia* sp., *Centrosema pubescens*, *Calopogonium mucunoides*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria* sp., *Lablab purpureus*, *Lotus corniculatus*, *Lotus uliginosus*, *P. quadrangulatus*, *Phaseolus* sp., *Pisum sativum*, *Sesbania exalta*, *S. seban*, *Trifolium alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. pratense*, *T. subterraneum*, *Vicia villosa*, *Vigna aconitifolia*, *V. mungo*, *V. radiatus*, *V. unguiculata*, *Vigna* sp. e *Glycine Max*, *Medicago sativa*, *Capsicum* spp. (Hyde et al., 2009).

De acordo com os autores acima mencionados, existem relatos da doença na Malásia, Índia, Zâmbia, Austrália, Gâmbia, Guinéa, Tanzânia, Nigéria, Hong Kong, Filipinas, Zâmbia, EUA, Paquistão, Arábia Saudita, New Britain, Cuba, Quênia, Trinidad, Honduras, Malawi, Uganda, África do Sul, Bangladesh, Mauritius e Guiana. Na América do Sul, a antracnose já foi relatada na Argentina, Venezuela, Chile e Brasil (Bailey & Jeger, 1992).

Emprego de técnicas moleculares para identificação de *Colletotrichum* spp.

A alta variabilidade inter e intra-específica de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características já está bastante documentada (Sutton, 1980), e por isso a diferenciação de espécies de *Colletotrichum* vêm sendo feita com apoio de métodos moleculares. Cai *et al.*, (2009), definem metodologias para estudo de *Colletotrichum*, dentre elas os autores indicam controle das condições ambientais e metodológicas para reduzir a variabilidade na expressão dos caracteres morfológicos uma vez que os caracteres morfológicos apresentam alta plasticidade fenotípica em cultura e enfatizam a importância dos métodos moleculares especialmente das análises multigênicas. A padronização dos estudos do complexo *Colletotrichum* tende a gerar informações mais consistentes, permitindo padrões de comparações com maior confiabilidade nas informações.

A amplificação de fragmentos polimórficos pela PCR usando primers de sequência arbitrária (RAPD, AP-PCR) é hoje uma tecnologia estabelecida e amplamente utilizada para gerar informação sobre variabilidade ao nível de DNA para as mais diversas aplicações na análise genética de procariotos e eucariotos. As aplicações mais comuns incluem mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, fingerprinting de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas e animais domésticos. A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia têm sido os principais fatores que levaram a sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa no mundo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As primeiras aplicações do sequenciamento de DNA para distinguir espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Mills *et al.*, (1992) e Sreenivasaprasad *et al.* (1992). Esses autores identificaram variação nas sequências da região ITS1 de rDNAm entre seis

espécies de *Colletotrichum*, bem como a detecção de polimorfismo na mesma região entre as linhagens de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros. As primeiras análises filogenéticas multilocus de espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Talhinhos *et al.* (2002), estudando um complexo de *C. acutatum*, e usando regiões codificantes dos genes *tub2*, *HIS4* e *mtSSu*, encontraram nos três locos níveis semelhantes de resolução filogenética. As análises multilocus se tornaram comuns graças á progressiva redução do custo de sequenciamento. Atualmente são utilizadas sequências geradas a partir dos seguintes locos: actina, (*ACT*), calmodulina (*CAL*), quitina sintetase I (*CHS1*), DNA liase (*APN2*), manganês superóxido dismutase (*SOD2*), a grande subunidade de RNA polimerase II (*RPB1*) e o fator de alongamento da tradução 1- α (*EF1 α*) (Cannon *et al.*, 2012).

Controle da antracnose da através da resistência genética do hospedeiro

É relevante o conhecimento das características, morfológicas, culturais, moleculares e patogênicas das diferentes espécies de *Colletotrichum*, principalmente no que se refere a variabilidade inter e intraespecífica do patógeno de maneira global, uma vez que a partir do conhecimento aprofundado das características gerais e comportamentais do patógeno estratégias de manejo mais adequadas podem ser adotadas. Um dos métodos de controle de fitopatógenos com melhores resultados é a resistência genética. Há dois tipos de resistência, uma denominada “raça-específica”, a qual obedece ao fundamento expresso pela lei do gene-a-gene, com pareamento específico entre genes do patógeno e do hospedeiro, sendo qualitativamente expressa com efeito evidente, mas que pode ser contornada pela própria diversidade genética da população do patógeno (Liu *et al.*, 2001). Outro tipo é a chamada “resistência parcial”, que atua retardando a infecção, crescimento e reprodução do patógeno em plantas adultas, mas não em plântulas (Shaner, 1973). A grande durabilidade da

resistência parcial é relacionada à expressão de um conjunto de genes menores e cuja herança quantitativa é considerada complexa.

O manejo integrado até o momento é a melhor alternativa na tentativa de minimizar os danos causados pela antracnose da soja em regiões favoráveis a doença. Práticas como aquisição de sementes de alta qualidade fisiológica e sanitária, tratamento de sementes com fungicidas, adubação equilibrada principalmente a potássica, espaçamento adequado, evitando adensamento o que ocasiona um micro-clima favorável para a ocorrência de doenças. Outros pontos importantes a considerar são o grau de competição entre plantas e dificuldade de se atingir o alvo no momento das aplicações de fungicidas, a rotação de cultura e o plantio de variedades resistentes. Além desses, a escolha de cultivares de soja com resistência parcial pode ter um papel importante na redução dos níveis finais de antracnose da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4.ed. New York: John Wiley & Sons. 868p.
- ARMSTRONG-CHO, C.L.; BANNIZA, S. 2006. *Glomerella truncata* sp. nov., teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. *Mycological Research* 110:951-956.
- ARAÚJO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; CUPERTINO, F.P. 1988. Antracnose da soja na região geoeconômica do Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 13:130. (Resumo).
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CAB International.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA M.E.N.; SIMON P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32–36.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG,.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R.A. 2009. Polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*. Online advance. 183-204.
- CAMPOS, H.D.O.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C. 2006. Soja: Antracnose. *Cultivar Grandes Culturas* ano 7, no 83:26-28.
- CÂMARA, M.P.S.; FERREIRA, M.A.S.; DIANESE, J.C. 1995. Efeito da aplicação de fungicidas sistêmicos em duas épocas de plantio sobre a sanidade de sementes de três cultivares de soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasil, 20:233-240.
- CANNON, P.F.; DAMM, P.R.; WEIR, B.S. 2012. *Colletotrichum: Current status and future directions*. *Studies in Mycology*, Berlin. 73:181-213.
- CASTELANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. 1967. Differentiation of *Tripanossoma cruzi* in culture. *The Journal of Protozoology*. 14:3,447-451p.
- COSTA, I.F.D. 2005. *Controle de Doenças de Final de Ciclo na Cultura da Soja*. (Tese doutorado, UFSM). Santa Maria, 100p.
- CHONGO, G.; BERNIER, C.C. 2000. Effect of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease* 84:544-548.
- DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KSAK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KALMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, London. 13:414-430.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39: 45-87

DIAS, M.D.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2012. Antracnose: Mais desafiadora. Cultivar Grandes Culturas 155. (abril de 2012):22-23.

DIAS, M.D.; MIRANDA-FILHO, R.J.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2011a. Controle químico da antracnose na cultura da soja. Tropical Plant Pathology 36: 429. (Resumo).

DIAS, M.D.; MIRANDA FILHO, R.J.; CAFÉ FILHO, A.C.; PINHEIRO,V.F. 2011b. Avaliação da incidência da antracnose em soja (*Colletotrichum truncatum*), na região Centro Oeste do Brasil. Tropical Plant Pathology 36: 673. (Resumo).

EMBRAPA (2008). Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina, PR, 261p.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores em Análise Genética. 2ed. Brasília (EMBRAPA-CENARGEM, documento 20).

GHERBAWY, Y.A.M.H. 1999. ProAEle analysis of isolates belonging to different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Cytologia,64:269-276.

GONZÁLES, M.; RODRÍGUES,R.; ZAVALA, M.E.; JACOBO, J.L.; HERNÁNDEZ, J.A. MARTINEZ, O.; SIMPSON, J. 1998 Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular marker. Phytopathology, 88:2292-299.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. 1999. Compendium of Soybean Diseases, 4ed, St. Paul, Minnesota: APS Press.

HENNING, A.A. (1994). Patologia de Sementes. Londrina: Embrapa – CNPSo, 43p. (Documentos, 90)

HOLDERMAN, Q.L. (1950). Some falcated-spore *Colletotrichum* on legumes. Phytopathology, 40:11.

<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636> O Brasil será o maior produtor mundial de soja. Acesso 15/10/2013.

<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/produção> Produção de soja da argentina crescerá em 13/14. Acesso 15/04/2014

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.I, PENNYCOOK, S.R., PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H., SATO, T; SHIVAS, R.G., TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. 2009. *Colletotrichum* – Names in current use. Fungal Diversity 39:147-182.

- KELLY, A.; ALCALÁ-JIMÉNEZ, R.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology*, 84:1293-1298.
- KHAN, M.; SINCLAIR, J.B. 1992. Pathogenicity of sclerotia and non sclerotia-forming isolates of *Colletotrichum truncatum* on soybean plants and roots. *Phytopathology*. 82(3):314-319.
- LEHMAN, P.S.; MACHADO, C.C.; TARRAGO, M.T. 1976. Frequency and severity of soybean diseases in the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira* 1:183-193.
- LENNÉ, J.M. 1978. Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia.
- LIMA, N.B.; BATISTA, M.V.A.; MORAIS JR, M.A.; BARBOSA, M.A.G.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal diversity*.61:75-88.
- LIU, S.X.; GRIFFEY, C.A.; MOROOF, M.A. 2001. Identification of molecular markers associated with adult plant resistance to powdery mildew in common wheat cv. Massey. *Crop Science*.41:1268-1275.
- MACHADO, J.C. (1988). *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações* Lavras: UFLA/FAEPE. 106p.
- MCGEE, D.C. 1992. *Soybean Diseases. A Reference Source for Seed Technologists*. St. Paul, MN: APS Press: 151 p.
- MENEZES, M.; HANLIN, R.T. 1996. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose diseases. *Revista de Microbiologia* 27:247-251.
- MENEZES, M. 2006. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas* 3:170-179.
- MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: Bayley, J.A.; Jeguer, M.J. (ed). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Wallingford: CABI, p.269-288.
- MORRAL, R.A.A. 1997. Evolution lentil disease over 25 years in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19:197-207.
- ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; MENDES-COSTA, M.C.; WHEALS A. 2003. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology* 40: 138–145.

- ROY, K.W. 1982. Seedling diseases caused in soybean by species of *Colletotrichum* and *Glomerella*. *Phytopathology* 72:1093-1096.
- SANT'ANNA, C.T.M.; ROSADA, L.J.; FRANCO, C.C.S.; KANESHIMA, E.N.; CASTRO-PRADO, M.A. 2010. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. *Bio Res*,43:51-62.
- SANTOS, G.R.; FERREIRA, M.A.S.V.; PESSOA-FILHO, M.; FERREIRA, M.E.; CAFÉ-FILHO, A.C. 2009. Host specificity and genetic diversity of *Didymella bryoniae* from Cucurbitaceae in Brazil. *J. Phytopathology* 157: 265-273
- SHANER,G. 1973. Evaluation of slow-mildewing resistance of Knox wheat in the field. *Phytopathology*. 63:609-615
- SUTTON, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. 1992. Sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. London. 41(4):265-281.
- TALHINHAS, S.P. 2002 Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnoses of lupis. *Phytopathology*, Saint Paul.92:986-996.
- TIFFANY, L.H. 1951. The anthracnose complex on soybean. *Review Applied Mycology*. Oxford, 30:598-599.
- TIFFANY, L.H.; GILMAN, J.C. 1954. Species *Colletotrichum* from legumes. *Mycology*, 46: 52-75.
- YANG, H-C; HAUNDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. 2014. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a novel curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. *Mycologia* 106: 32-42.
- YANG H-C, CAI, L.; YU., Z.; LIU, Z.; HYDE K.D. 2011. *Colletotrichum* species on Orquidaceae in southwest China. *Cryptogamie Mycology*. 32:1-26.
- YANG,H-C.; STEWART, J.M.; HARTMAN, G.L. 2013. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in arkansas, United States. *Plant Disease*. 97:1,510.2
- ZOCKUN, M.H.G.P. 1978. A expansão da soja no Brasil: Alguns aspectos de produção.. (Dissertação de mestrado) USP/SP, 227p.

OBJETIVOS

- 1- Avaliar a variabilidade morfológica e molecular via RAPD das populações de *Colletotrichum truncatum* associados à cultura da soja de diversas regiões do Brasil e da Argentina.
- 2- Estudar as diferenças de patogenicidade e agressividade de isolados de *Colletotrichum* associados à soja, bem como avançar no esclarecimento da identidade dos agentes etiológicos associados à cultura no Brasil, com base em ferramentas clássicas e moleculares, incluindo sequenciamento multigênico.
- 3- Detecção de resistência de genótipos de soja a antracnose.
- 4- Avaliar a eficácia de grupos químicos de fungicidas e perdas na produtividade devido à ocorrência da antracnose na soja.

CAPÍTULO 1

VARIABILIDADE MORFO-MOLECULAR DE *Colletotrichum truncatum* ASSOCIADO À ANTRACNOSE DA SOJA NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO

A soja (*Glycine max*) é uma das mais importantes culturas do agronegócio do Brasil e da Argentina, com uma área combinada de 49,3 milhões de ha e somam mais de 50% da produção mundial do grão. Essa grande extensão da área cultivada na América do Sul, praticamente contígua, da latitude 8-10°S (estados do MA, MT e TO) à latitude 30-32°S (províncias de Córdoba, Santa Fé e Entre Rios), em monocultura e semeadura direta, é favorável a ocorrência de diversas doenças bióticas. Dentre elas têm aumentado a prevalência e a intensidade da antracnose, cujo principal agente causal é o fungo *Colletotrichum truncatum*. Diversos relatos de campo de ocorrências de antracnose, com perdas de produção, ineficiência de controle químico e ampliação da ocorrência geográfica vêm sendo registrados na região Central e Norte do Brasil, sem que as razões para isso estejam esclarecidas. Pouca informação disponível sobre a diversidade do agente etiológico na América do Sul. Desta forma, o presente capítulo apresenta um estudo da variabilidade morfo-molecular de uma coleção de 54 isolados de *C. truncatum*, provenientes de diversas regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina. Utilizando-se a microscopia de luz e a técnica RAPD foram encontradas variações quanto às características morfológicas e morfométricas, crescimento micelial, coloração, aspecto e zona de crescimento de colônias. Alguns isolados apresentaram três tipos de conidiogênese, incluindo formação de conídios em células conidiogênicas nas extremidades das hifas, em conidiomas no interior de acérvulos e uma forma inédita para *C. truncatum*, através de setas férteis. A técnica RAPD foi eficaz em detectar diversidade genética de isolados de *C. truncatum* provenientes da América do Sul. Foi eficiente em estabelecer o grau de similaridade dentro dos grupos de isolados provenientes da Argentina e do Brasil, sendo maior a similaridade dentro do grupo de isolados da Argentina e maior a diversidade dentro do grupo de isolados brasileiros. Além disso, os resultados evidenciam alguma estruturação geográfica das populações, com agrupamentos exclusivos ou quase exclusivos de isolados das províncias argentinas e brasileiras em grupos distintos.

Palavras-chave: RAPD, Morfologia, Variabilidade genética.

ABSTRACT

Morpho-molecular variability of *Colletotrichum truncatum* associated to soybean anthracnose in South America

Soybean (*Glycine max*) is one of the most important field crops in Brazil and Argentina, which have a combined area of 49.3 million ha and together account for more than 50% of world production. The South American soybean crop extends from latitude 8-10°S (Brazilian states of MA, MT and TO) to latitude 30-32°S (Argentinian provinces of Córdoba, Santa Fé and Entre Rios). This massive contiguous area constitutes an important sanitary risk to the crop. Among several diseases, the prevalence and intensity of anthracnose, caused mainly by *Colletotrichum truncatum*, is increasing. Reports of severe epidemics, with expressive yield loss are frequent, especially from North-Central Brazil, but the reasons for these are not known. Knowledge about the morphological, cultural and molecular variability of *C. truncatum* and other anthracnose-related species associated to soybean in South America is scarce. Therefore, the morpho-molecular characteristics of 54 South American isolates of *C. truncatum* were studied in Chapter I. Traditional light microscopy and RAPD analysis were used for estimating the genetic variability of the isolates. Results demonstrated morphological, cultural (mycelial growth, color, etc) and genetic diversity of *C. truncatum*. Some isolates presented three types of conidiogenesis, including conidial formation from conidiogenous cells on hyphal extremities, in conidiomas in acervuli and in a yet-unreported manner for *C. truncatum*, directly from fertile setae. RAPD was efficient in detecting the genetic diversity present in the collection of *C. truncatum* isolates from South America, and was capable of establishing the degree of intra-group similarity, which is greater in the group of Argentinian isolates as compared to the group of Brazilian isolates. Furthermore, the results evidenced the correlation of geographical origin with molecular grouping, with the exclusive or semi-exclusive assembling of Brazilian and Argentinian isolates in distinct clades.

Key words: morphology, RAPD , genetic variability

1-INTRODUÇÃO

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas do agronegócio brasileiro e Argentino (<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636>). Atualmente mais de 50% da produção mundial de soja é procedente da América do Sul. As lavouras sul-americanas estendem-se, de maneira quase ininterrupta, desde as latitudes 8-10°S, ao norte do Brasil (Estados do Maranhão, Piauí, Mato Grosso e Tocantins), até os paralelos 30-32°S, nas províncias de Córdoba, Santa Fé e Entre Rios na Argentina.

A grande extensão da área cultivada com soja na América do Sul, a maior parte em monocultura e em semeadura direta, é favorável a ocorrência de diversas doenças, algumas das quais têm aumentado prevalência e intensidade, entre elas a antracnose. Esta doença, cujo principal agente causal é o fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore (Hyde *et al.*, 2009), causa danos de 15% a 20% ao rendimento de grãos, especialmente no centro e norte do Brasil. Nessas regiões condições climáticas (temperatura superior a 25 °C e incidência de molhamento foliar superior a 24 h) são favoráveis à doença (Embrapa, 2008).

A alta variabilidade inter e intra-específica de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características tem sido insuficiente para a correta identificação das espécies (Sutton, 1980), e por isso a diferenciação de espécies de *Colletotrichum* vem sendo feita por métodos moleculares.

Cai *et al.* (2009) definiu metodologias para estudo de *Colletotrichum* o qual os autores consideram importante o controle das condições ambientais e metodológicas as quais favorecem a variabilidade nas expressões dos caracteres morfológicos e a importância dos métodos moleculares especialmente das análises multigênicas. A padronização dos estudos do complexo *Colletotrichum* tende a gerar informações mais consistentes, permitindo padrões de

comparações com maior confiabilidade nas informações. Esses métodos ainda provem estimativas da diversidade genética e são utilizados para estudar a estrutura de populações do gênero, notadamente a nível subespecífico (Menezes, 2006).

C. truncatum pertence ao grupo, dentro do gênero, que forma conídios curvos (Damm *et al.*, 2007) em companhia de outras importantes espécies, tais como *C. graminicola* e *C. dematium*, que já foram associadas com a antracnose da soja (Hartman *et al.*, 1999). Ainda segundo Hartmann *et al.*, (1999), outras espécies de *Colletotrichum*, com conídios cilíndricos também estão associadas à antracnose da soja, tal como *C. gloeosporioides*. Recentemente duas outras espécies com conídios truncados, *C. chlorophyti* e *C. incanum*, foram descritas como causadoras da antracnose em soja nos EUA (Yang *et al.*, 2012, 2014), mas não foram encontradas em nenhuma outra região produtora. O conjunto de informações disponíveis indica que a etiologia da antracnose da soja não está esclarecida e necessita de estudos aprofundados, especialmente na América do Sul.

Até o momento na América do Sul, dentre as espécies com conídios curvos, apenas *C. truncatum* foi associada com a antracnose da soja e nenhum estudo de estrutura da população foi concluído. Embora a doença é considerada uma das principais da região do cerrado brasileiro podendo causar até perda total da lavoura (Embrapa, 2008), são raros os estudos sobre a diversidade genética dos isolados de *C. truncatum* associados à cultura.

As perdas podem estar relacionadas à variabilidade intrínseca do patógeno e ao aumento da prevalência de isolados mais agressivos e adaptados ao hospedeiro e ambiente. Pode-se especular que relatos de ampliação da ocorrência geográfica e de aumento na agressividade de fitopatógenos podem ser debitados tanto a fatores climáticos, quanto genéticos, i.e., de adaptação às novas variedades de hospedeiros.

Colletotrichum é reconhecido como um gênero muito variável. Segundo Roca *et al.*, (2003) e Sant'anna *et al.*, (2010), os mecanismos capazes de gerar variabilidade em

Colletotrichum estão o ciclo parasexual, a reprodução sexuada, a troca de material genético por conidial anastomosis tubes (CATs) anastomose entre conídios durante a germinação, anastomose de hifas e mutação. Esses eventos provavelmente são atuantes nas populações de *C. truncatum* associados à soja na América do Sul gerando diversidade genética do patógeno nas regiões produtoras de soja do Brasil e da Argentina.

A amplificação de fragmentos polimórficos pela PCR usando primers de sequência arbitrária (RAPD, AP-PCR) é amplamente utilizada para gerar informação sobre variabilidade de DNA para diversas aplicações na análise genética de procariotos e eucariotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Aplicações comuns incluem mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, *fingerprinting* de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas e animais domésticos. A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia têm sido os principais fatores que levaram a sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade morfo-molecular de uma coleção de isolados de *C. truncatum* associados a sintomas de antracnose da soja, provenientes das diversas regiões produtoras de soja do Brasil e da Argentina entre as latitudes 8-10° S e 30-32° S.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos estudos de variabilidade morfológica e molecular de uma coleção sulamericana de isolados de *Colletotrichum truncatum* associados a cultura da soja. A caracterização morfológica dos isolados foi conduzida no Laboratório de Epidemiologia Botânica da Universidade de Brasília. Para os estudos de variabilidade populacional foi utilizado o método RAPD, no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, Brasília, DF, entre maio e julho de 2012. Para confirmação da identidade das amostras a nível específico, um segmento do gene que codifica a quitina sintetase (CHS-1) de um subgrupo representativo dos isolados estudados foi sequenciado e comparado com isolados-tipo da espécie *C. truncatum* depositado no GeneBank. Esta caracterização foi realizada no laboratório da Embrapa Hortaliças – CNPH, Brasília, DF.

2.1- Origem dos isolados

Amostras de plantas com sintomas, provenientes das diversas regiões produtoras de soja no Brasil, foram coletadas e enviados pelo Dr. Mauricio Meyer da Embrapa-Soja e pelo Dr. Edson Borges da Fundação Chapadão-MT. Essas amostras deram origem a uma coleção de 200 isolados monosporicos de *Colletotrichum*. Os isolados provenientes das principais regiões produtoras de soja da Argentina foram cedidos pela Dra. Norma Formento do Instituto de Tecnologia Agropecuaria da Argentina (INTA). No presente trabalho foram avaliados quanto a variabilidade molecular 54 isolados monospóricos de *Colletotrichum truncatum*, dos quais 24 isolados foram obtidos de regiões geográficas distribuídas nos Estados do Mato

Grosso, Mato Grosso Sul, Goiás, Maranhão e Rio Grande do Sul. Outros 30 isolados foram obtidos de regiões produtoras da Argentina.

2.2- Obtenção dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum truncatum* foram obtidos a partir de folhas, hastes, pecíolos e vagens de plantas de soja que apresentavam sintomas da doença, oriundas de lavouras de diversas regiões produtoras de soja no Brasil.

Para obtenção de culturas, empregou-se o método de isolamento indireto, no qual fragmentos de tecidos doentes, após desinfestação superficial com álcool 70% durante um minuto, hipoclorito de sódio a 2% por 30 segundos e posteriormente, em água destilada e esterilizada, foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Icumedia®) acrescido de 180 mg/L de clorofenicol. As placas foram mantidas em incubadoras biológicas (Eletrolab®) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo 12 h por sete dias. Após esse período as colônias foram repicadas de acordo com as características morfológicas, considerando o aspecto e a coloração das colônias para novas placas de Petri com meio BDA e incubadas por igual período para posterior obtenção das culturas puras.

2.3- Obtenção das culturas puras e manutenção

Para a obtenção das culturas monospóricas foi preparada uma suspensão de esporos distribuída com alça de Drigalsky sobre placas de Ágar-Água as quais foram incubadas por 24 h a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Esporos germinados foram transferidos isoladamente para placas de Petri contendo BDA. As placas foram incubadas conforme já descrito. Os isolados monospóricos foram mantidos em água estéril e armazenados em condição ambiente segundo a metodologia de Castellani *et al.* (1967).

2.4- Caracterização morfológica, morfométrica e cultural

Foram caracterizados morfológicamente 54 isolados segundo Sutton (1980) e Hyde *et al.*, (2009), os caracteres avaliados foram: coloração e aspecto micelial das colônias, aspecto da colônia na frente e verso das placas em meio BDA, crescimento em meio BDA com 7 dias de cultivo a 25°C e presença de zona de crescimento.

O crescimento micelial foi determinado aos sete dias de cultivo a 25°C ± 2°C, em BDA pela média de duas medidas no sentido perpendicular entre si passando pelo centro da colônia com emprego de paquímetro manual. Apenas os isolados sequenciados tiveram as medições conidiais e de apressórios realizadas.

A formação dos apressórios foram induzidos empregando-se a metodologia de Cai *et al.*,(2009) modificado. Com o auxílio de alça de platina esporos provenientes de esporodóquios setosos foram depositadas em placas de Petri contendo Ágar-água, posteriormente adicionou-se em média 3mL de água destilada e esterilizada para formação das suspensões de esporos os quais foram espalhados com auxílio de alça de drigalky. Posteriormente colocou-se cinco lamínulas sobre o meio. As placas foram incubadas em BOD por um período de 24 a 48 horas a uma temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas luz. Para medição dos apressórios e conídios foram montadas lâminas semi-permanentes em lacto-glicerol. Estas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Leica® DM 2500 provido de câmara Leica® DFC 490, acoplada a um sistema eletrônico de captura de imagem. As mensurações das estruturas fúngicas foram realizadas com 30 repetições, através do programa Leica® Qwin.

2.5- Produção de micélio para extração de DNA

Para produção do micélio, empregou-se o meio de cultura BD (200gr batata, 20gr dextrose por litro), adicionado de 0,02g/L do antibiótico Clorofenicol. Após o preparo, 100 mL do meio foi distribuído em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Posteriormente foram transferidos 4 discos miceliais das colônias previamente cultivadas em meio BDA por 7 dias e mantidos em agitação rotatória a 25°C, a 150rpm, por 10 dias. Após esse período efetuou-se a filtragem do micélio em bomba de vácuo tipo Kitosato, com adição de TE gelado (4°C). O micélio foi armazenado a -20°C para posterior extração do DNA(Ferreira & Grattapaglia,1998; Barros, 2008).

2.6- Extração e quantificação do DNA

O micélio foi macerado em nitrogênio líquido até atingir a granulometria extremamente fina e transferido para tubos tipo Eppendorf. Em seguida o DNA foi extraído usando-se CTAB 2X conforme Ferreira & Grattapaglia (1998). A quantificação do DNA total extraído foi feita em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) a 230nm e a pureza foi admitida pela relação 230/280nm acima de 1,8. A avaliação da integridade do DNA total extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (tampão de corrida TBE (Tris-HCL EDTA-ácido bórico) e voltagem de 80V por 20 minutos, utilizando o DNA λ (Invitrogen) como padrão para quantificação. Após a quantificação, o DNA foi diluído em água ultra pura para uma concentração final de 3ng/ μ l para a realização da reação da polimerase em cadeia (PCR).

2.7- Reação de amplificação e visualização dos fragmentos de DNA

A técnica utilizada para a caracterização molecular dos isolados foi a Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Foram realizadas triagens com 64 Primers de 10 pares de base Operon Technologies, Alameda, CA, EUA, e seis isolados, em duplicata. Esses Primers foram selecionados com base na repetibilidade da amplificação e na qualidade do polimorfismo. Para as reações de amplificação para todos os 54 isolados, foram utilizados 12 Primers que resultaram nos melhores padrões polimórficos. Os Primers empregados no presente estudo e suas respectivas sequências foram: OPA-3 (AGTCAGCCAC), OPB-15 (GGAGGGTGTT), OPD-3 (GTCGCCGTCA), OPD-08 (GTGTGCCCCA), OPE-8 (TCACCACGGT), OPE-17 (CTACTGCCGT), OPG-4 (AGCGTGTCTG), OPG-11 (TGCCCGTCGT), OPG-17 (ACGACCGACA), OPK-17 (CCCAGCTGTG), OPP-2 (TCGGCACGCA), OPP-9 (GTGGTCCGCA).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 13µl. contendo: 3,42 µl de água milli-Q, 1,3µl de Tampão 10X, 1,04 µl de BSA, 1,04 µl de dNTP, 0,20 µl Taq polimerase (Invitrogen), 3 µl Primer (10ng/ µl) e 3 µl do DNA (3ng/ µl).

As reações da polimerase em cadeia (PCR), foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, EUA) programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 92°C, seguido de 40 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (1 minuto a 92°C), uma etapa de anelamento (1 minuto a 35°C) e uma etapa de alongamento (2,5 minutos a 72°C) e por fim uma extensão final a 72°C por 5 minutos. À reação de amplificação foi adicionado 2,0 µl de solução de carregamento (Blue Juice) por reação.

Após a amplificação os produtos das reações foram analisados em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio. O gel foi imerso em solução tampão 1X TBE e procedeu-se a eletroforese a 160 V por um período de 1:30 hs. Posteriormente, os geis foi visualizado em transiluminador de UV e fotodocumentado. A determinação do tamanho dos fragmentos foi definido através da comparação das bandas com o marcador High DNA Mass Ladder 1KB (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As imagens referentes ao polimorfismo apresentado pelos isolados encontram-se na Figura 5.

2.8- Análise dos dados

Os dados resultantes por amplificação ao acaso do DNA (RAPD) foram analisados pelo programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, versão 2.02). O perfil de DNA obtido a partir desta técnica permitiu a construção de uma planilha, usando a relação dos marcadores RAPD e os acessos para gerar uma matriz binária. Para o marcador presente, foi atribuído o número 1 na planilha, para o ausente foi atribuído o número 0, e para dado duvidoso ou faltante foi computado o número 9.

A construção da matriz binária permitiu a análise da relação genética entre as amostras estudadas pelo polimorfismo de DNA. A similaridade genética foi calculada empregando o coeficiente de Jaccard. Similaridade = $(a/a+b+c)$.

Sendo que **a** significa o número de marcas positivas concordantes e **b** e **c** significa o número de marcas discordantes. A partir dos dados da matriz de similaridade foi possível construir um dendograma (figura 6) gerado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*) estabelecendo as relações genéticas entre os diferentes isolados.

2.9- Análise de Componentes Principais

Os dados gerados pela técnica RAPD foram o dendograma baseado na dissimilaridade genética, o PCA e a projeção gráfica das distancias genéticas dos 54 isolados estudados.

2.10- Caracterização de isolados por sequenciamento do gene CHS-1

A caracterização molecular dos isolados foi realizada por sequenciamento de um segmento do gene que codifica a quitina sintetase (CHS-1), uma vez que a literatura cita mais de 20 clados distintos de *Colletotrichum* com conídios falcados (Hyde *et al*, 2009). Esse fato demonstra a dificuldade na identificação de *C. truncatum* exclusivamente por métodos morfológicos, sendo necessário informações moleculares adicionais. A caracterização molecular se fez necessária devido o objetivo do trabalho ser o estudo da variabilidade exclusiva de *C. truncatum*.

Para uma maior confiabilidade dos resultados, trinta e um isolados, provenientes de várias regiões geográficas do Brasil e da Argentina foram sequenciados, com a finalidade de comprovação da espécie dentro do gênero *colletotrichum*. Os 21 isolados submetidos ao sequenciamento que tiveram sua identidade confirmada como *Colletotrichum truncatum* foram: 1.2EB, 2.15.1MM, 2.15.2MM, 2.15.3MM, 4.3AR, 4.3AR3, 5.1AR, 6.3AR3, 8.1AR3, 8.3MM, 10.3MM, 10C3MM, 11A2MM, 11B2MM, 11BMM, 12.3AR3, 13.1AR3, 13.1AR, 17.1MM, 17.3MM, 15.1MM.

As reações de amplificações do DNA foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 3,0 µl de DNA genômico a 10 ng/µl; 7,3µl de água milli-Q autoclavada; 2 µl de Tampão 10X para *Taq* DNA Polimerase; 2 µl de dNTPs (2,5 mM); 0,5 µl de MgCl₂ (50mM); 2,5 µl de cada *primer* (10 µM) e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante

Invitrogen® (5u/μl). A amplificação foi executada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Instruments, USA). A reação foi submetida a um ciclo de desnaturação inicial do DNA (94°C, 5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação das fitas (94°C, 0,30 min), anelamento dos *primers* (52°C, 45 min) e extensão das fitas (72°C, 2 min). Subsequentemente, foi procedida uma extensão final (72°C, 7 min). Os fragmentos de DNA tiveram suas bandas purificadas utilizando o *Kit Invitrogen PureLink™*, seguindo as recomendações do fabricante. As sequencias obtidas foram comparadas com as sequencias do GenBank para confirmação das espécies analisadas no presente trabalho.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Caracterização morfológica

Em relação a coloração micelial houve variação do aspecto da colônia de *C. truncatum*. As variações foram de branca com cinza a cinza-escuro na parte superior da colônia e de cores negra a rosa-alaranjado no reverso da placa principalmente as de origem argentinas (Figura 1). A textura variou de não cotonosa, levemente cotonosa, pouco cotonosa a cotonosa. Alguns isolados apresentaram bordas irregulares, presença de pontuações negras e massa de esporos variando de bege a alaranjada, zonas de crescimento variáveis, podendo ser radial, circular ou ausente e algumas colônias apresentam aspecto de enrugamento (Tabela 1). Considerando o diâmetro médio das colônias, essas variaram de 3,7 × 3,8 cm a 9 × 9cm, o que determinou a velocidade de crescimento, sendo considerado lento os isolados com diâmetro de colônia até 4,9cm, intermediário; de 5,0 cm a 6,9 cm e rápido de 7,0 a 9,0 cm.

Todos os isolados apresentaram conídios unicelulares, não septados, hialinos, falcados, variando de 19-29 × 3-4 μm (Figura 2). Foi constatada variação no tamanho dos

conídios em comparação com as descrições de Sutton (1980) que relatou conídios medindo $26,5-19 \times 4,5-3,5 \mu\text{m}$.

Os apressórios são abundantes, clavados, circulares ou irregulares, variando de $13-14 \times 7-8,5 \mu\text{m}$, pigmentados, com medidas aproximadas às relatadas por Sutton (1980), que foram de $11-16 \times 8-9,5 \mu\text{m}$, discretamente inferiores quanto à largura. Em alguns isolados, foi observada a produção de clamidósporos e microesclerócios em meio BDA. Morrall (1977) observou a formação e disseminação de microesclerócios por *C. truncatum* e registrou disseminação a centenas de metros junto com a poeira resultante das operações de colheita. Khan & Sinclair (1992) observaram isolados de *C. truncatum* associados a sementes infectadas e produzindo microesclerócios em meio de cultura e em tecidos de soja, fato também observado no presente trabalho.

Foram observadas três tipos de conidiogênese em *C. truncatum*, a saber: (I) conídios produzidos em células conidiogênicas fialídicas localizadas nas extremidades das hifas; (II) conídios produzidos em células conidiogênicas fialídicas, em conidiomas (acérvulos) e em esporodóquios setosos em meio BDA; e (III) conídios produzidos em setas que sofreram diferenciação na sua extremidade originando células conidiogênicas tornando-se férteis. Os tipos de conidiogênese descritos podem ser visualizados nas figuras 3 e 4

A produção de conídios a partir de setas férteis foi especificamente dependente do isolado, e os conídios formados foram típicos de *Colletotrichum truncatum*. Esse fato é relevante por não haver registro na literatura científica quanto à capacidade de *C. truncatum* em produzir conídios a partir de setas férteis. Em uma revisão do gênero *Colletotrichum* realizada por Menezes (2006) sobre aspectos biológicos e taxonômicos, a autora ressalta que isolados de *Colletotrichum*, particularmente, *C. gloeosporioides* e *C. gossypii*, em determinadas condições ambientais, podem produzir conídios na extremidade das setas e que

as setas férteis têm portanto função semelhante a de um conidióforo fialídico. O mesmo já foi relatado por Lenné *et al.* (1984) e Menezes & Hanlin (1996) para as espécies acima mencionadas.

3.2- Sequenciamento

Dos 31 isolados sequenciados com a finalidade de comprovar a identidade com espécies de *Colleotrichum*, 21 isolados apresentaram similaridade com *C. truncatum* variando de 97% a 100% com o isolado CTM33 ID:gb/KC109571.1, obtido no GenBank, para a região gênica CHS-1. Os demais isolados foram similares a *C. orbiculare*, *C. graminícola* e *C. cliviae*.

3.3- Análise da estrutura das populações de *C. truncatum* da América do Sul pela técnica RAPD

O conjunto de primers utilizados resultou na obtenção de 104 bandas utilizadas na caracterização da variabilidade dos isolados de *C. truncatum*. Os valores obtidos pelo coeficiente de Jaccard pelo agrupamento UPGMA, mostraram similaridade mínima de 16% e máxima de 100% (Tabela 2) o número de bandas por primer e tamanho de fragmentos em pb gerados por cada primer encontram-se na Tabela 3. O padrão de bandas dos isolados de *Colletotrichum* associados a soja encontra-se na Figura 5.

Os isolados analisados neste estudo reuniram-se em três grupos principais, com formação de subgrupos de acordo com o dendograma apresentado na Figura 6. **O grupo I** (sete isolados) incluiu dois isolados (11.2AR, 11.1AR) provenientes da Província de Entre Rios, Argentina e por cinco isolados (10.1MM, 11BMM, 11B2MM, 2172MM, 2171MM) oriundos dos estados do MA, GO e RS. **O grupo II**, foi formado por cinco isolados brasileiros e argentinos (17.4MM, 17.3MM, 17.1MM, 5.1AR, 5.3AR). Os três isolados

brasileiros são provenientes de GO e os dois isolados argentinos da província de Entre Rios. **O grupo III**, constituído de 42 isolados, encontra-se estruturado em cinco subgrupos, separados de acordo com a origem geográfica: **subgrupo IIIa** com 13 isolados brasileiros do centro-norte do país (1.2EB, 8.5MM, 10.2MM, 10C2MM, 10C3MM, 11A2MM, 15.1MM, 15.3MM, 10.3MM, 5.3MM, 5.4MM, 8.2MM e 8.3MM) Este subgrupo foi constituído por isolados das regiões de MT (três isolados), MA (nove isolados) e um isolado do estado do Rio Grande do Sul. Os **subgrupos IIIb, IIIc e IIId**, foram formados exclusivamente com isolados de origem argentina: o **subgrupo IIIb**, formado por cinco isolados (4.1AR, 4.3AR, 11.2AR, 11.3AR, 11.1AR) da província de Entre Rios, e o **subgrupo IIIc**, formado por isolados das províncias de Santa Fé e Entre Rios (15.2AR, 15.1AR, 15.3AR, 2.3AR3, 4.3AR3, 4.2AR3, 5.1AR3, 6.2AR3, 6.1AR3, 6.3AR3, 11.1AR3, 12.3AR3) estes isolados são. Finalmente, o **subgrupo IIId** é constituído por isolados argentinos provenientes das províncias de Entre Rios, Santa Fé e Córdoba (8.2AR3, 8.1AR3, 8.3AR3, 13.1AR3, 15.1AR3, 11.2AR3, 14.2AR3, 14.3AR3, 10.3AR3). Apenas no **subgrupo IIId** estão representados isolados provenientes da província de Córdoba. **O subgrupo IIIe** é constituído por três isolados brasileiros do Estado do Mato Grosso (2162MM, 2153MM, 2152MM).

Um fato a ser considerado é que os isolados de origem argentina apresentaram índices de similaridades de aproximadamente 80%, bastante superior ao índice de similaridade dos isolados do Brasil. Desta forma, a variabilidade dos isolados brasileiros é bastante superior, com variação de 20 a 90% de similaridade, e de maneira geral os isolados brasileiros segundo o coeficiente de Jaccard visualizados no dendograma e na matriz diagonal apresentam maiores índices de dissimilaridade. A maior variabilidade dos isolados brasileiros poderia ser atribuída à maior amplitude climática e de latitude do país, a maior utilização de fungicidas no

manejo de doenças da cultura da soja e a uma maior disponibilidade de materiais genéticos e variedades de soja cultivadas nas diversas regiões. Note-se que os genótipos de soja distribuem-se de acordo com a latitude, devido ao fato de que a floração e o ciclo desta cultura dependem fundamentalmente do fotoperíodo. Os isolados brasileiros se distribuem por uma extensa região geográfica. Por outro lado, presume-se que os genótipos de soja provenientes das províncias vizinhas de Entre Rios, Santa Fé e Córdoba (de latitudes semelhantes) possuam maior identidade genética, o que pode se refletir em uma menor variabilidade das populações de *C. truncatum* das lavouras dessas regiões.

Os resultados deste estudo indicam uma estratificação dos isolados quanto às suas origens geográficas em nível de países. No entanto, o agrupamento dos isolados brasileiros de maneira que cada subgrupo representasse uma única região geográfica específica, levando em consideração a diferenciação por Estados, não se confirma. Em apenas um caso se observou a predominância dos isolados do Estado do Maranhão em relação aos demais. Dos 11 isolados deste Estado, nove foram agrupados no **subgrupo IIIa**. Além disso, dos 13 isolados deste subgrupo, nove foram provenientes dos municípios de Santa Rosa das Mangabeiras-MA, Tasso Fragosso-MA e Balsas-MA enquanto três isolados foram provenientes de três municípios: Cruz Alta-RS, Chapadão do Sul-MT e Nova Xavantina-MT. Este padrão não foi encontrado para isolados nacionais de outros estados, que se distribuíram em diversos grupos e subgrupos.

Gonzalez *et al.*, (1998), em estudo de caracterização de isolados mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum* usando cultivares diferenciais e marcadores moleculares por RAPD detectaram tendência de agrupamento dos isolados em relação a origem geográfica e não observaram correlação com genótipos e identificação de raças por inoculação em cultivares diferenciais. Gherbawy (1999) também utilizou marcadores RAPD para analisar a

diversidade genética de 20 isolados de 14 *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*. Os isolados foram agrupados em três grupos, que não apresentaram nenhuma correlação com a origem geográfica.

Santos *et al.* (2005), em estudo de diversidade de isolados de *Didymela brioniae* e *Phoma* obtidos de cucurbitáceas, não encontrou correlação de padrões de RAPD com origem geográfica, agressividade dos isolados, planta hospedeira ou círculo de hospedeiras. Barros (2008) analisou 33 isolados de *C. truncatum* associados a soja de diferentes regiões brasileiras quanto à diversidade genética pela técnica por RAPD, concluiu que os isolados de *colletotrichum truncatum* foram separados em três grupos distintos, predominando uma distribuição conforme a localidade. No entanto observaram a ocorrência de isolados semelhantes em locais com grande distância geográfica, ou seja, isolados de Montividiu- GO e de Cascavel-PR foram reunidos no mesmo grupo de similaridade, assim como isolados de Acreúna-GO e Porto Nacional-TO.

A distribuição dos isolados pode ser melhor visualizada na projeção gráfica das distâncias genéticas dos isolados de origem argentina e brasileira (figura 7), e no gráfico tridimensional, PCA (Figura 8), comprovando em ambos os casos, o agrupamento dos isolados de maneira consistente no diz respeito à origem geográfica, principalmente entre regiões com maiores amplitudes geográficas os quais demonstraram maiores distâncias genéticas entre os países e menores dentro deles, o que está de acordo com a discussão baseada nos resultados apresentados pelo dendograma.

Em síntese, verificou-se que o sistema RAPD foi eficaz detectar aspectos da diversidade genética de isolados de *C. truncatum* provenientes da América do Sul. Especificamente a técnica foi eficiente em estabelecer o grau de similaridade dentro do grupo de isolados provenientes da Argentina e do Brasil, sendo maior no primeiro. Adicionalmente,

os resultados evidenciam uma maior similaridade entre isolados provenientes de uma área geográfica restrita, com mais uniformidade climática, como o Norte da Argentina, quando comparados á população presente em ampla área com maior variação dos componentes físicos do ambiente, como ocorre no Brasil. A menor estruturação das populações brasileiras de *C. truncatum* também pode ser atribuída, em parte, ao trânsito de sementes de uma região para outra, já que *C. truncatum* tem como característica a capacidade de transmissão por sementes. Esse fato justificaria a presença de isolados similares em regiões geográficas distintas.

4- CONCLUSÕES

- 1- Houve variação quanto às características morfológicas e culturais dos isolados de *C. truncatum*.
- 2- Alguns isolados apresentaram três tipos de conidiogênese, através de células conidiogênicas nas extremidades das hifas, em conidiomas no interior de acérvulos em material vegetal e esporodóquios setosos em meio BDA e através de setas férteis, uma forma pécie *C. truncatum*.
- 3- Há uma maior variabilidade de isolados provenientes do Brasil, em relação aos isolados de origem Argentina.
- 4- A técnica RAPD foi eficiente em estabelecer o grau de similaridade dentro do grupo de isolados provenientes da Argentina e do Brasil, sendo maior no primeiro.
- 5- Os resultados evidenciam a correlação dos isolados com a origem geográfica em uma escala maior, com agrupamentos exclusivos ou quase exclusivos de isolados das províncias Argentinas e do Brasil, principalmente do Estado do Maranhão em grupos distintos.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS,C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. 4.ed. New York: John Wiley & Sons. 868p.

ARMSTRONG-CHO, C.L., BANNIZA, S. 2006. *Glomerella truncata* sp. nov., teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. Mycological Research 110:951-956.

ARAÚJO, A.G., CAFÉ-FILHO, A.C., CUPERTINO, F.P. 1988. Antracnose da soja na região geoeconômica do Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira 13:130. (Resumo).

BAILEY, J.A., JEGER, M. J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International.

BARROS, G.E.G. 2008. Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD. 64p. (dissertação de mestrado).

BOITEUX, LS, FONSECA MEN, SIMON PW. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. Journal of the American Society for Horticultural Science 124: 32–36.

CAI, L., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W.J., WEIR, B.S, WALLER, J.M., ABANG, M.M, ZHANG, J.Z., YANG, Y.L., PHOULIVONG, , LIU, Z.Y, PRIHASTUTI, H., SHIVAS, R.G., MCKENZIE, E.H.C5 AND JOHNSTON, P.R. A 2009. Polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity. Online advance. 183-204.

CASTELANI, O, RIBEIRO,L.V., FERNANDES, J.F. 1967. Differentiation of *Tripanossoma cruzi* in culture. The Journal of Protozoology.14:3,447-451p.

CAMPOS, H.D.O, SILVA, L.H.C.P, SILVA, J.R.C. 2006. Soja: Antracnose. Cultivar Grandes Culturas ano 7, no 83:26-28.

COSTA, I.F.D. 2005. Controle de Doenças de Final de Ciclo na Cultura da Soja. (Tese doutorado, UFSM). Santa Maria, 100p.

CHONGO, G., BERNIER, C.C. 2000. Effect of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease* 84:544-548.

DAMM, U., WOUDEBERG, J.H.C., CANNON, P.F. AND CROUS, P.W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45-87

DIAS, M.D.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2012. Antracnose: Mais desafiadora. *Cultivar Grandes Culturas* 155. (abril de 2012):22-23.

DIAS, M.D; MIRANDA-FILHO, R.J.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2011a. Controle químico da antracnose na cultura da soja. *Tropical Plant Pathology* 36: 429. (Resumo).

DIAS, M.D.; MIRANDA FILHO, R.J.; CAFÉ FILHO, A.C.; PINHEIRO,V.F. 2011b. Avaliação da incidência da antracnose em soja (*Colletotrichum truncatum*), na região Centro Oeste do Brasil. *Tropical Plant Pathology* 36: 673. (Resumo).

EMBRAPA (2008). Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina, PR, 261p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores em Análise Genética. 2ed. Brasília (EMBRAPA-CENARGEM, documento 20).

GHERBAWY, Y.A.M.H. 1999. ProAEle analysis of isolates belonging to different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Cytologia*,64:269-276.

GONZÁLES, M.;RODRÍGUES,R.;ZAVALA, M.E.; JACOBO, J.L.; HERNÁNDEZ, J.A. MARTINEZ, O.; SIMPSON, J. 1998 Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular marker. *Phytopathology*, 88:2292-299.

HARTMAN,G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. 1999. Compendium of Soybean Diseases, 4ed, St. Paul, Minnesota: APS Press.

HENNING, A.A. 1994. Patologia de Sementes. Londrina: Embrapa – CNPSo, 43p. (Documentos, 90)

<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636> O Brasil será o maior produtor mundial de soja. Acesso 15/10/2013.

<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/produção> Produção de soja da argentina crescerá em 13/14. Acesso 15/04/2014

HYDE, K.D., CAI, L., CANNON, P.F., CROUCH, J.A., CROUS, P.W., DAMM, U., GOODWIN, P.H., CHEN, H., JOHNSTON, P.R; JONES, E.B.G., LIU, Z.Y., MCKENZIE, E.H.C.8, MORIWAKI, J., NOIREUNG, P.1, PENNYCOOK, S.R., PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H., SATO, T; SHIVAS, R.G., TAN, Y.P., TAYLOR, P.W.J., WEIR, B.S., YANG, Y.L., AND ZHANG, J.Z.1. 2009. *Colletotrichum* – Names in current use. Fungal Diversity 39:147-182.

KELLY,A.; ALCALÁ-JIMÉNEZ, R. BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M. 1994 Use of genetic fringerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. Phytopathology, 84:1293-1298.

KHAN, M.; SINCLAIR, J.B. 1992 Pathogenicity of sclerotia and non sclerotia-forming isolates of *Colletotrichum truncatum* on soybean plants and roots. Phytopathology. 82(3):314-319.

LEHMAN, P.S.; MACHADO, C.C.; TARRAGO, M.T. 1976. Frequency and severity of soybean diseases in the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Fitopatologia Brasileira 1:183-193.

LEHMAN, S.G.; WOLF, A.F. 1926. Soybean anthracnoses. Journal of Agricultural Research. Washington, 33:381-390.

LENNÉ, J.M. 1978. Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia.

LENNÉ, J.M.; THOMAS, D.; ANDRADE, R.P.; VARGAS, A. 1984. Anthracnoses of *Stylosanthes capitata*: Implications for future disease evaluations of indigenous tropical pasture legumes. *Phytopathology*, 74:1070-1073.

MCGEE, D.C. 1992. Soybean Diseases. A Reference Source for Seed Technologists. St. Paul, MN: APS Press: 151 p.

MENEZES, M.; HANLIN, R.T. 1996. Apressoria of brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. *Revista de Microbiologia* 27:247-251.

MENEZES, M. 2006. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas* 3:170-179.

MORRAL, R.A.A. 1997. Evolution lentil disease over 25 years in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19:197-207.

NUNES JUNIOR, et al. Levantamento da Ocorrência de Doenças em Soja no Estado de Goiás e Distrito Federal Durante a Safra 2003/2004. In: Reuniao de Pesquisa de Soja da Regiao Central do Brasil, 26. Londrina: Embrapa Soja, p. 137-138, 2003. (Documento, 234).

ROCA, M.G., DAVIDE, L.C, MENDES-COSTA, M.C., WHEALS A. 2003. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology* 40: 138–145.

ROY, K.W. 1982. Seedling diseases caused in soybean by species of *Colletotrichum* and *Glomerella*. *Phytopathology* 72:1093-1096.

SANT'ANNA, C.T.M.; ROSADA, L.J.; FRANCO, C.C.S.; KANESHIMA, E.N.; CASTRO-PRADO, M.A. 2010. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum* isolates assessed by vegetative compability groups and RAPD analysis. *Bio Res*,43:51-62.

- SANTOS, G.R.; FERREIRA, M.A.S.V.; PESSOA-FILHO, M., FERREIRA, M.E.; CAFÉ-FILHO, A.C. 2005. Host specificity and genetic diversity of *Didymella bryoniae* from Cucurbitaceae in Brazil. *J. Phytopathology* 157: 265-273
- SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. 1989. Compendium of soybean disease. 3ed. Amer. Phytopathology, Soc. St. Paul.MN. 106.
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- TALHINHAS, S.P. 2002 Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnoses of lupis. *Phytopathology*, Saint Paul.92:986-996.
- TIFFANY, L.H.; GILMAN, J.C. 1954. Species *Colletotrichum* from legumes. *Mycology*, 46: 52-75.
- VAILLANCOURT, L. WANG, J.; HANAU, R. 2000. *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interection: genetic regulation of sexual compatibility. In: Freeman, S.; Dickman, M.B. (Ed). *Glomerella graminicola*. Saint Paul: APS, p.29-44.,
- YANG, H-C; HAUNDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. 2014. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a novel curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. *Mycologia* 106: 32-42.
- YANG H-C, CAI, L.; YU., Z.; LIU, Z.; HYDE K.D. 2011. *Colletotrichum* species on Orquidaceae in southwest China. *Cryptogamie Mycology*. 32:1-26.
- YANG,H-C.; STEWART, J.M.; HARTMAN, G.L. 2012. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in Arkansas, United States. *Plant Disease*. 97:1,510.2

Tabela 1: Características culturais das colônias de isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de regiões produtoras de soja do Brasil e da Argentina, aos 7 dias de cultivo em meio BDA, 12 horas luz a 25°C±2. UnB: 2014. (D = Diâmetro; VC = Velocidade de crescimento, MC = Margem da colônia, ZC = Zona de Crescimento).

	Isolado	Origem	Coloração	Textura	MC	ZC	D (cm)	VC
1	1.2EB	Chapadão do sul/MT	Cinza/Branco	Levemente	Irregular	Radial	4,8×5,0	Lento
2	8.2MM	Tasso Fragoso/MA	Bege/rosado	Pouco Cotonosa	Irregular	Ausente enrugado	3,5×3,5	Lento
3	8.3MM	Tasso Fragoso/MA	Bege/rosado	Pouco Cotonosa	Irregular	Ausente enrugado	3,0×3,0	Lento
4	8.5MM	Tasso Fragoso/MA	Branco/cinza	Levemente	Regular	Circular	9,0×9,0	Rápido
5	11 A2MM	Cruz Alta/RS	Cinza escuro	Levemente	Irregular	Circular	4,0×3,8	Lento
6	15.1MM	Nova Xavantina/ MT	Branca/cinza	Levemente	Regular	Circular e radial	9,0×9,0	Rápidos
7	15.3MM	Nova Xavantina/ MT	Branca/cinza	Levemente	Regular	Circular e radial	9,0×9,0	Rápidos
8	10C2MM	S.R das Mangabeiras/MA	Cinza/branco	Levemente	Irregular	Circular	3,6×3,3	Lento
9	10C3MM	S.R das Mangabeiras/MA	Branca/Cinza	Levemente	Irregular	Circular	2,9×3,0	Lento
10	10.2MM	S.R das Mangabeiras/MA	Branca rosada	Levemente	Irregular	Circular	5,4×5,0	Intermediário
11	10.3MM	S.R das Mangabeiras/MA	Branca rosada	Levemente	Irregular	Circular	5,5×5,5	Intermediário
12	5.3MM	Balas/MA	Branco/cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	9,0×9,0	Rápido
13	5.4MM	Balsas/MA	Branco/cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	9,0×9,0	Rápido
14	4.1AR	Parana/AR	Cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	5,8×5,5	Intermediário
15	4.3AR	Paraná/AR	Cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	5,2×5,4	Intermediário
16	11.2AR	Paraná/AR	Cinza /Branco	Cotonosa	Regular	Ausente	5,5×5,4	Intermediário
17	11.3AR	Paraná/AR	Cinza /Branco	Cotonosa	Regular	Ausente	4,9×5,3	Intermediário
18	11.1AR	Paraná/AR	Cinza /Branco	Cotonosa	Regular	Ausente	5,5×5,2	Intermediário

	Isolado	Origem	Coloração	Textura	MC	ZC	D (cm)	VC
19	15.1AR	La Capital/Santa Fé/AR	Branca/Rosa	Cotonosa	Irregular	Ausente	4,9×5,0	Lento
20	15.2AR	La Capital/Santa Fé/AR	Branca/Rosa	Cotonosa	Irregular	Ausente	5,0×5,2	Intermediário
21	15.3AR	La Capital/Santa Fé/AR	Branca/Rosa	Cotonosa	Irregular	Ausente	4,8×4,7	Lento
22	2.3AR3	Nogoyá/Entre Rios/AR	Verde	Pouco Cotonosa	Regular	Ausente	6,5×6,5	Intermediário
23	4.3AR3	Gualeduay/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	4,5×4,5	Lento
24	4.2AR3	/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,5×5,5	Intermediário
25	5.1AR3	Entre Rios	Cinza escura	Cotonosa	Regular	Circular	5,0×5,2	Intermediario
26	6.2AR3	Victoria/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,5×5,5	Intermediário
27	6.1AR3	Victoria/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	6,0×6,0	Intermediário
28	6.3AR3	Victoria/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,5×5,5	Intermediário
29	11.1AR3	Villaguay/Entre Rios/AR	bege com rosa	Não .Cotonosa	Regular	Circular	6,0×5,5	Intermediário
30	12.3AR3	Gualeduay/Entre Rios/AR	Amarela	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,5×5,5	Intermediário
31	8.2AR3	Federal/Entre Rios/AR	Amarelo	Não Cotonosa	Regular	Circular	6,5×6,4	Intermediário
32	8.1AR3	Federal/Entre Rios/AR	Amarelo	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,0×5,0	Intermediário
33	8.3AR3	Federal/Entre Rios/AR	Amarelo	Não Cotonosa	Regular	Circular	5,5×5,5	Intemediário
34	13.1AR3	Castellanos/Santa Fé/AR	Rosa/cinza	Levemente	Regular	Circular	6,5×6,5	Intermediário
35	15.AR3	La Capital/Santa Fé/AR	Cinza	Levemente	Irregular	Radial	5,0×4,5	Lento
36	11.2AR3	Villaguay/Entre Rios/AR	Amarelo	Não Cotonosa	Regular	Circular	6,0×5,5	Intemediário
37	14.2AR3	Castellanos/Córdoba/AR	Verde	Levemente	Regular	Circular	6,4×6,5	Intermediário
38	14.3AR3	Castellanos/Córdoba/AR	Verde	Levemente	Regular	Circular	6,5×6,5	Intermediário
39	10.3AR3	Villaguay/Entre Rios/AR	Rosa/cinza	Levemente	Regular	Circular	9,0×9,0	Rápido

	Isolado	Origem	Coloração	Textura	MC	ZC	D (cm)	VC
40	2.16.2MM	Querência/MT	Cinza/branco	Levemente	Irregular	Ausente	4,8×4,5	Lento
41	2.15.3MM	Nova Xavantina/MT	Cinza/Branco	Levemente	Irregular	Ausente	3,7×4,0	Lento
42	2.15.2MM	Nova Xavantina/MT	Cinza/Branco	Levemente	Irregular	Ausente	3,8×4,2	Lento
43	17.1MM	Goiânia/GO	Branca/cinza	Cotonosa	Irregular	Radial/enrugada	5,0×4,9	Lento
44	17.3MM	Goiânia/GO	Branca/cinza	Cotonosa	Irregular	Enrugada	5,0×5,0	Intermediário
45	17.4MM	Goiânia/GO	Branca/cinza	Levemente	Regular	Circular	3,7×3,8	Lento
46	5.1AR	Paraná/AR	Cinza/Branco	Cotonosa	Regular	Ausente	4,2×4,3	Lento
47	5.3AR	Paraná/AR	Cinza/branco	Cotonosa	Regular	Ausente	4,0 ×4,1	Lento
48	11BMM	Cruz Alta/RS	Alaranjada	Pouco Cotonosa	Irregular	Ausente	4,0×4,0	Lento
49	11B2MM	Cruz Alta/RS	Alaranjada	Pouco Cotonosa	Irregular	Ausente	4,0×3,9	Lento
50	10.1MM	S.R das Mangabeiras/MA	Branca rosada	Levemente	Irregular	Circular	5,4×5,0	Intermediário
51	(2)17.2MM	Goiânia/GO	Rosa/alaranjada	Cotonosa	Regular	Ausente	5,0×5,0	Intermediário
52	(2)17.1MM	Goiânia/GO	Rosa/alaranjada	Cotonosa	Regular	Ausente	5,0×5,0	Intermediário
53	11.2AAR	Paraná/AR	Cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	5,0×5,2	Intermediário
54	11.1AAR	Paraná/AR	Cinza	Cotonosa	Regular	Ausente	5 5×5 7	Intermediário

A sequencia dos isolados apresentados na tabela, estão em conformidade a sequencia dos isolados agrupados por RAPD.

Tabela 3- Primers e suas respectivas sequências utilizados no estudo de variabilidade de *C. truncatum*, via RAPD, número de bandas por primer e tamanho dos fragmentos gerados em pb por cada primer.

N.	Primer	Sequência	N. Bandas	Fragmentos pb.
1	OPA-3	AGTCAGCCAC	09	2500-200
2	OPB-15	GGAGGGTGTT	08	1900-200
3	OPD-3	GTCGCCGTCA	12	2000-300
4	OPD-8	GTGTGCCCCA	06	2000-500
5	OPE-17	CTACTGCCGT	06	1400-200
6	OPE-8	TCACCACGGT	09	2100-200
7	OPG-11	TGCCCCGTCGT	09	2500-200
8	OPG-17	ACGACCGACA	12	2500-300
9	OPG-4	AGCGTGTCTG	10	1400-150
10	OPK-17	CCCAGCTGTG	09	2500-300
11	OPP-2	TCGGCACGCA	06	1750-200
12	OPP-9	GTGGTCCGCA	8	2300-700

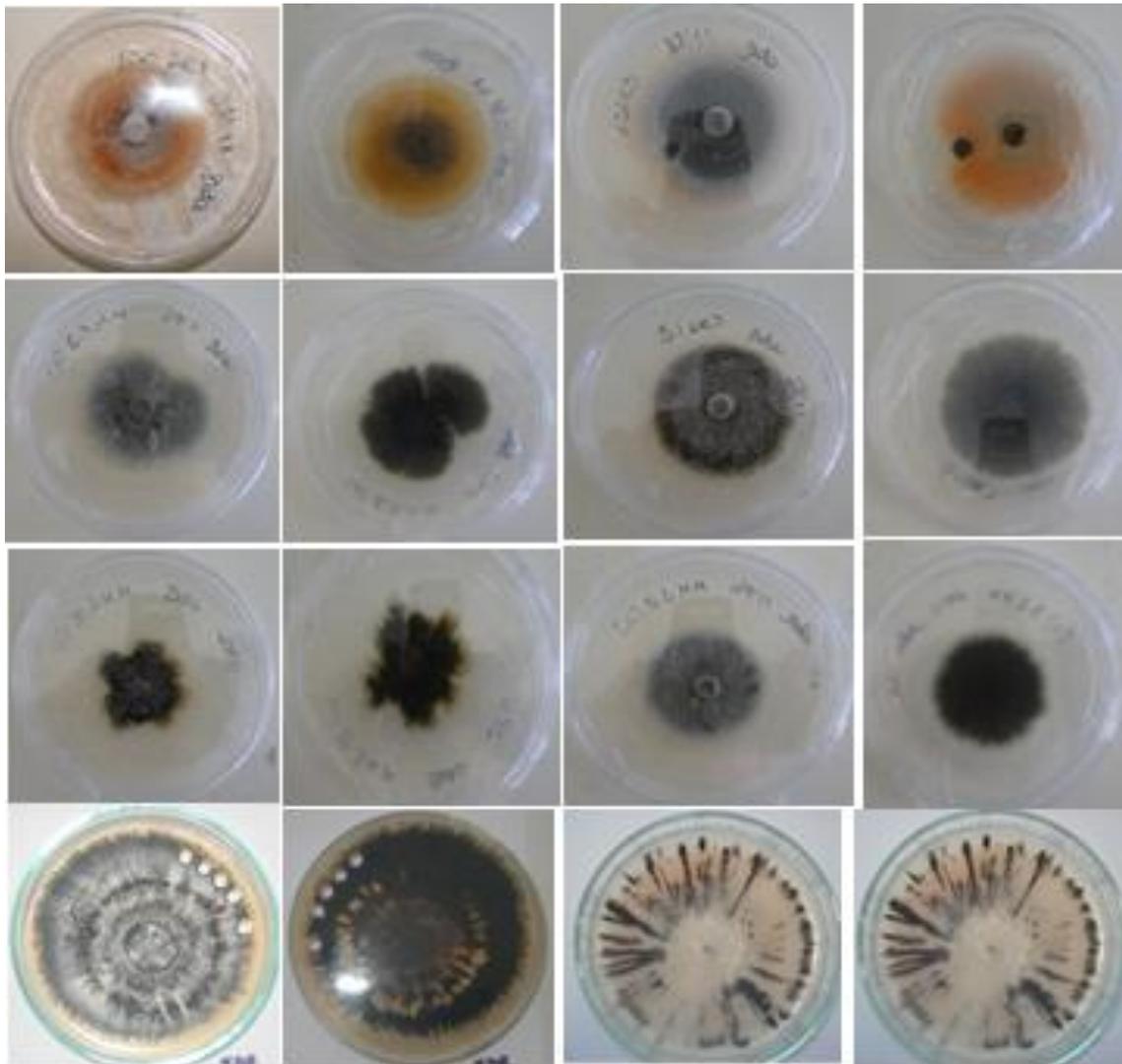


Figura 1- Morfotipos de colônias de *Colletotrichum truncatum* provenientes de diversas regiões do Brasil e da Argentina, cultivadas em meio BDA por um período de 7 dias.

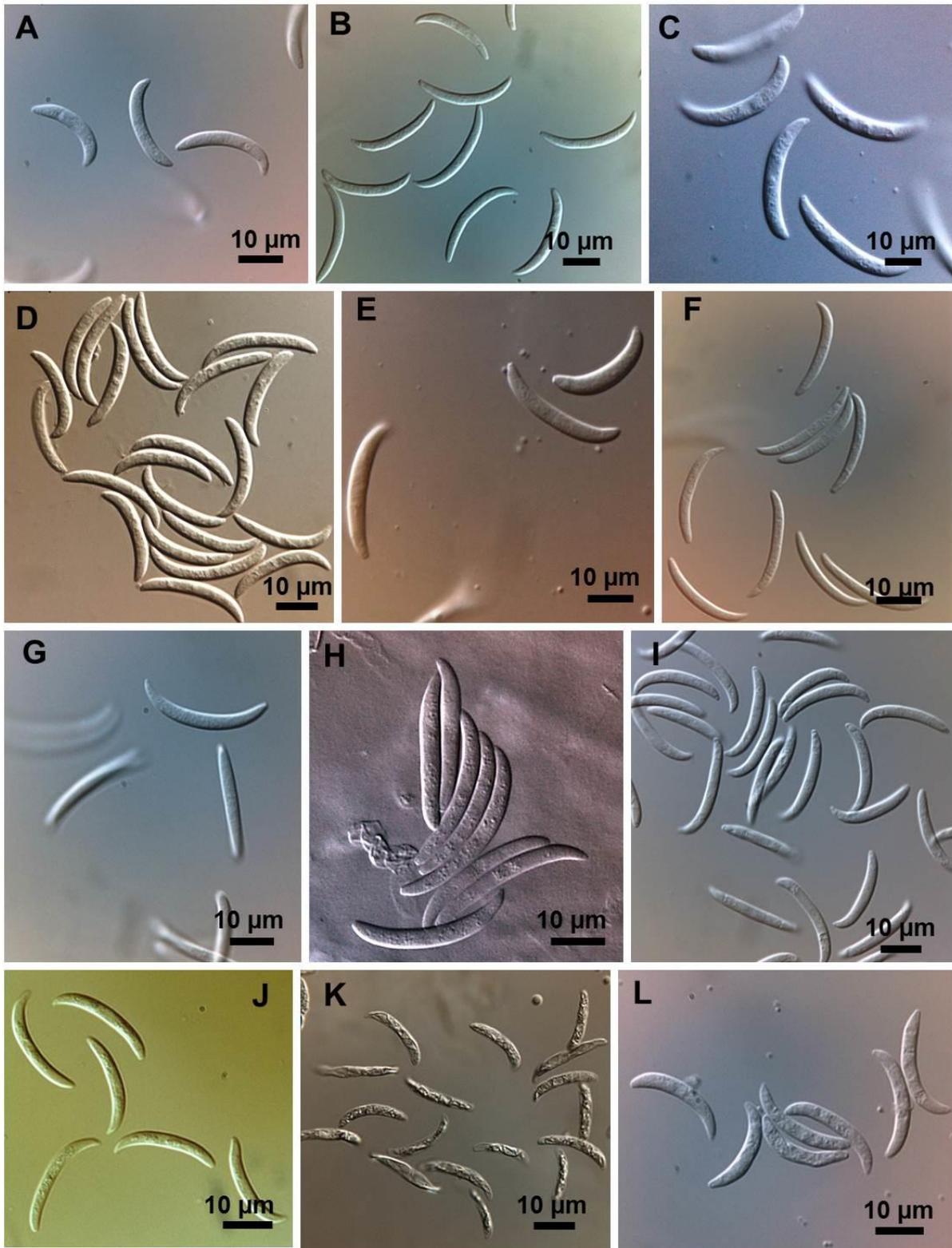


Figura 2- Variabilidade dos conídios de *Colletotrichum truncatum*, dos diversos isolados provenientes do Brasil e da Argentina, sequenciados, tendo a região gênica CHS como referência. Segue os isolados: **A-** 1.2EB, **B-** 4.3AR3, **C-** 10.3MM, **D-** 10C3MM, **E-** 11A2MM, **F-** 3.3AR3, **G-** 12.3AR3, **H-**13.1AR, **I-** 15.3MM, **J-** 5.1MM, **K** 6.1MM e **L-**14.3AR3.

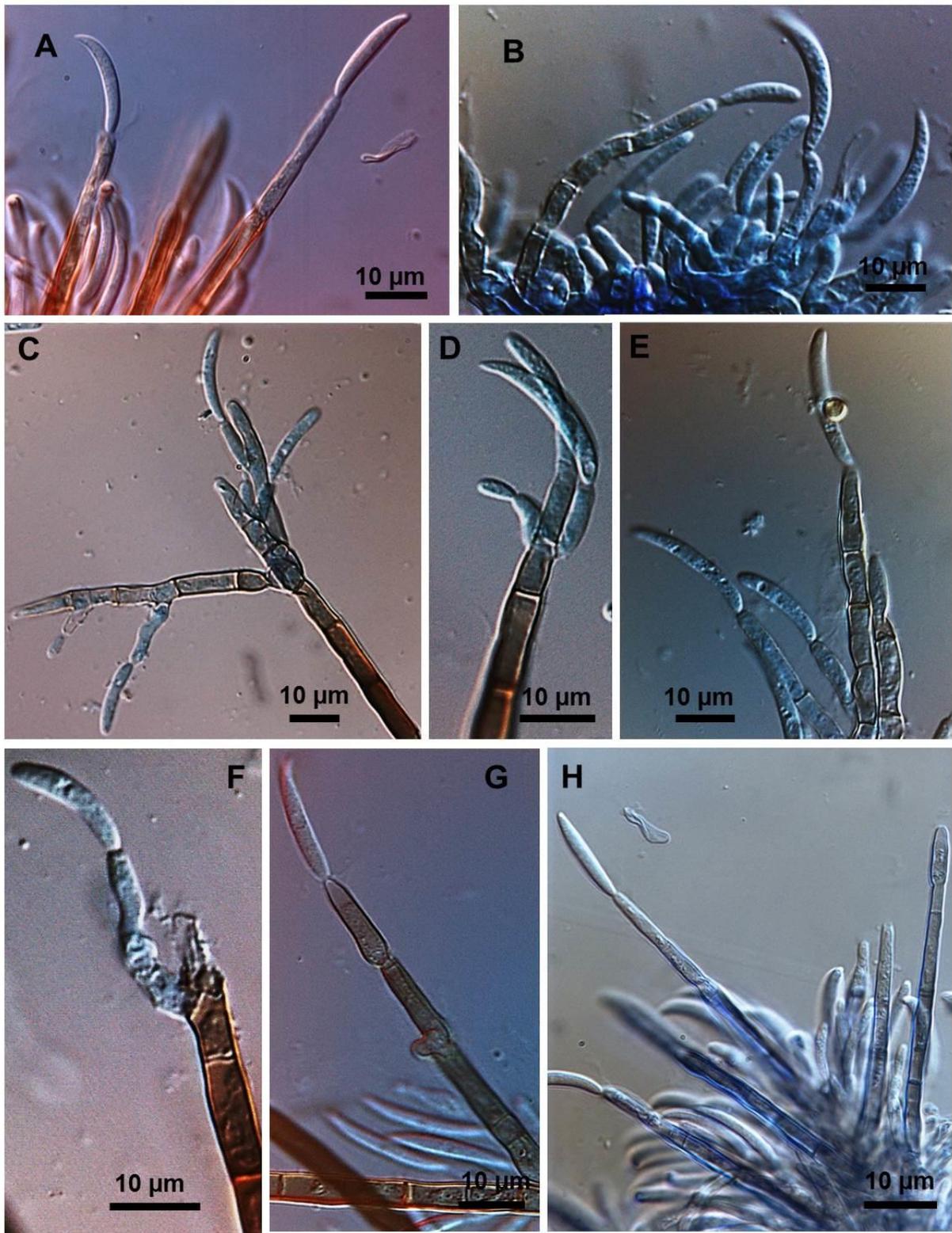


Figura 3 – A-H - Produção de conídios de *C. truncatum* em setas férteis, mostrando detalhes da conidiogênese.

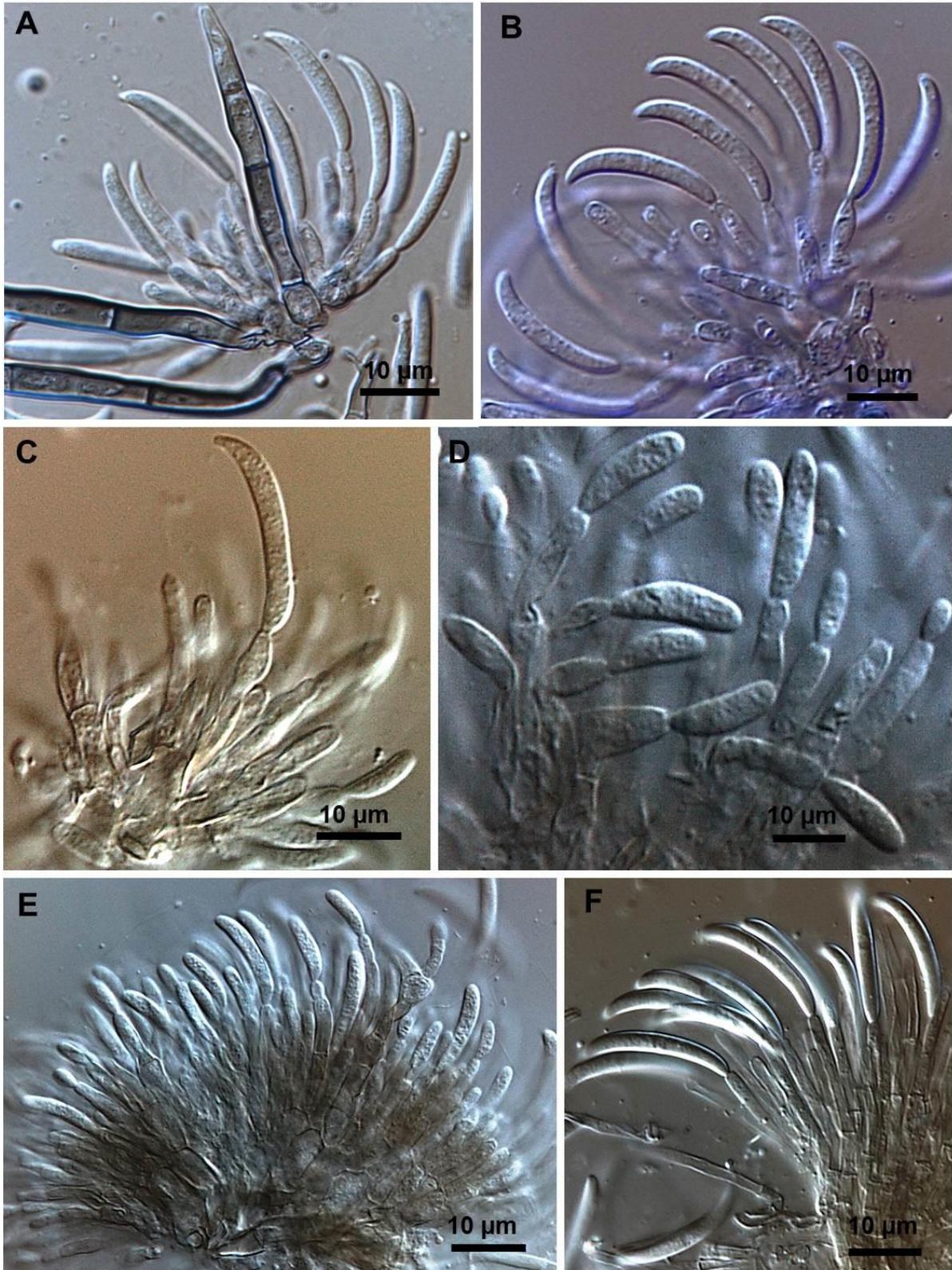


Figura 4- Produção de conídios de *C. truncatum* em conidiomas no interior dos acérvulos. **A, B, C, D, E, F-** detalhes da conidiogênese e das células conidiogênicas com formato cilíndrico-falcado e hialinas.

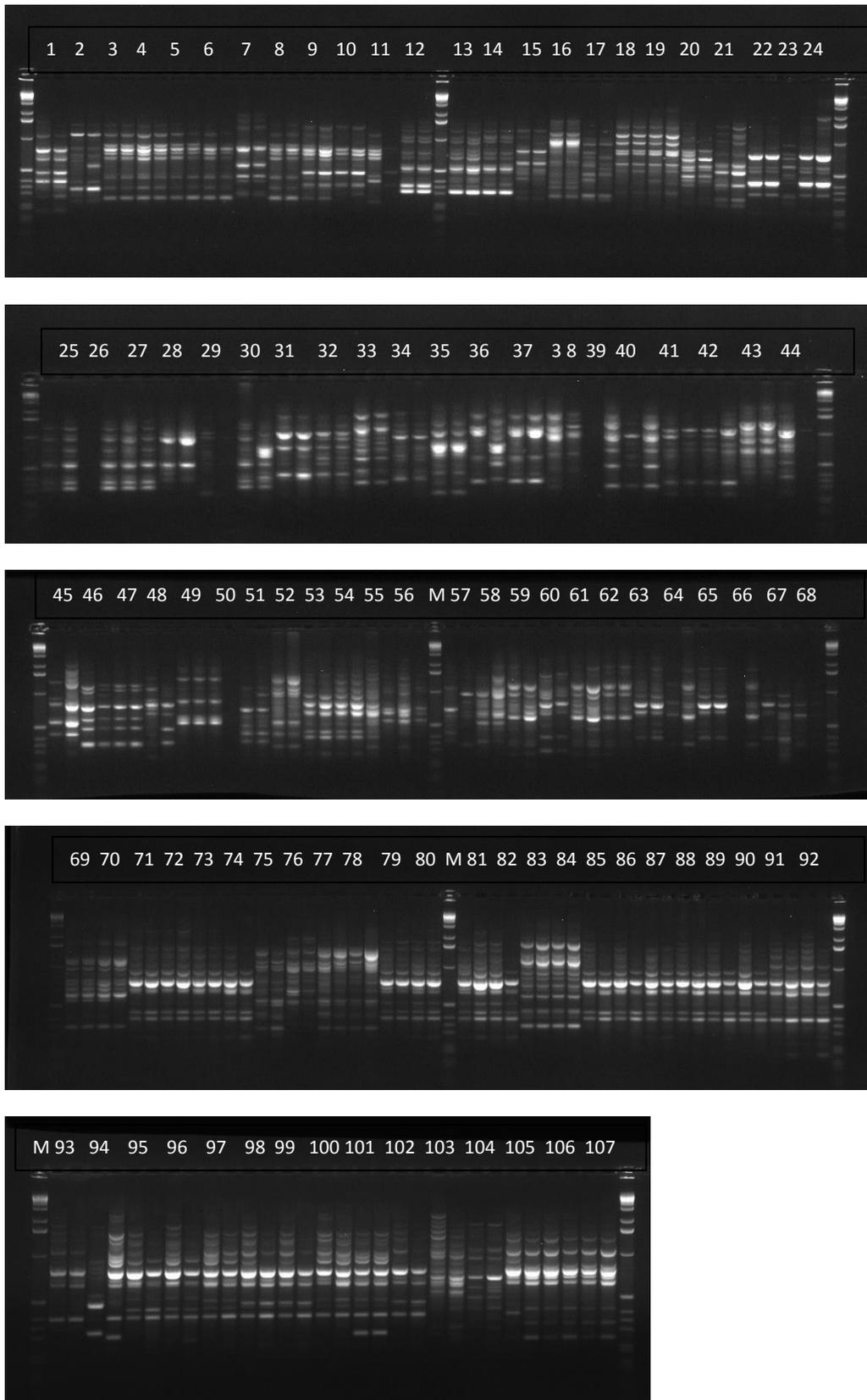


Figura 5 –Diversidade genética da coleção de isolados de *Colletotrichum* associados a soja com uso do primer OPD-3. UnB:2014

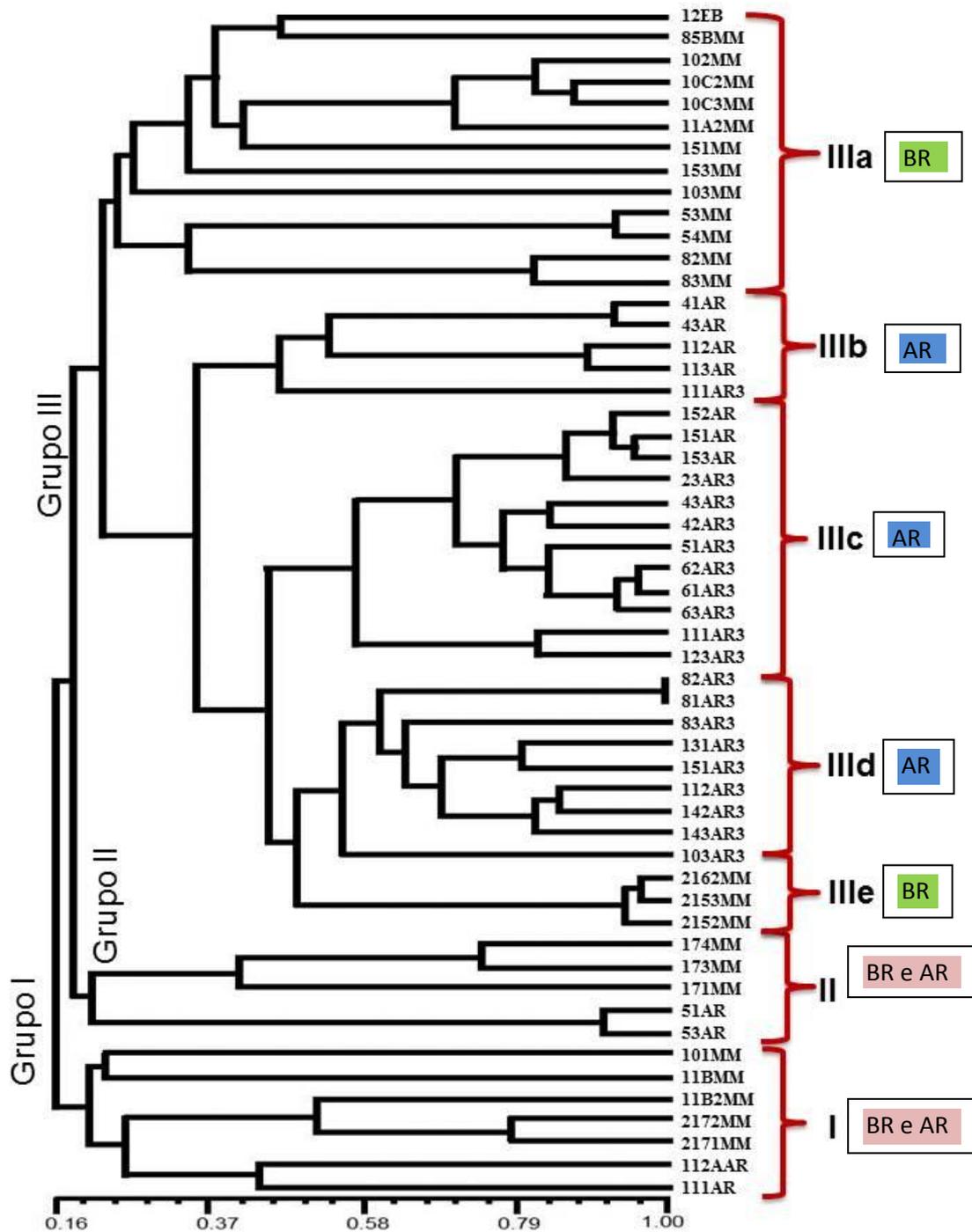


Figura 6- Dendrograma de dissimilaridade genética de 54 isolados de *Colletotrichum truncatum* originários de diversas regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, agrupados pelo método UPGMA com o coeficiente de Jaccard, através da técnica RAPD.

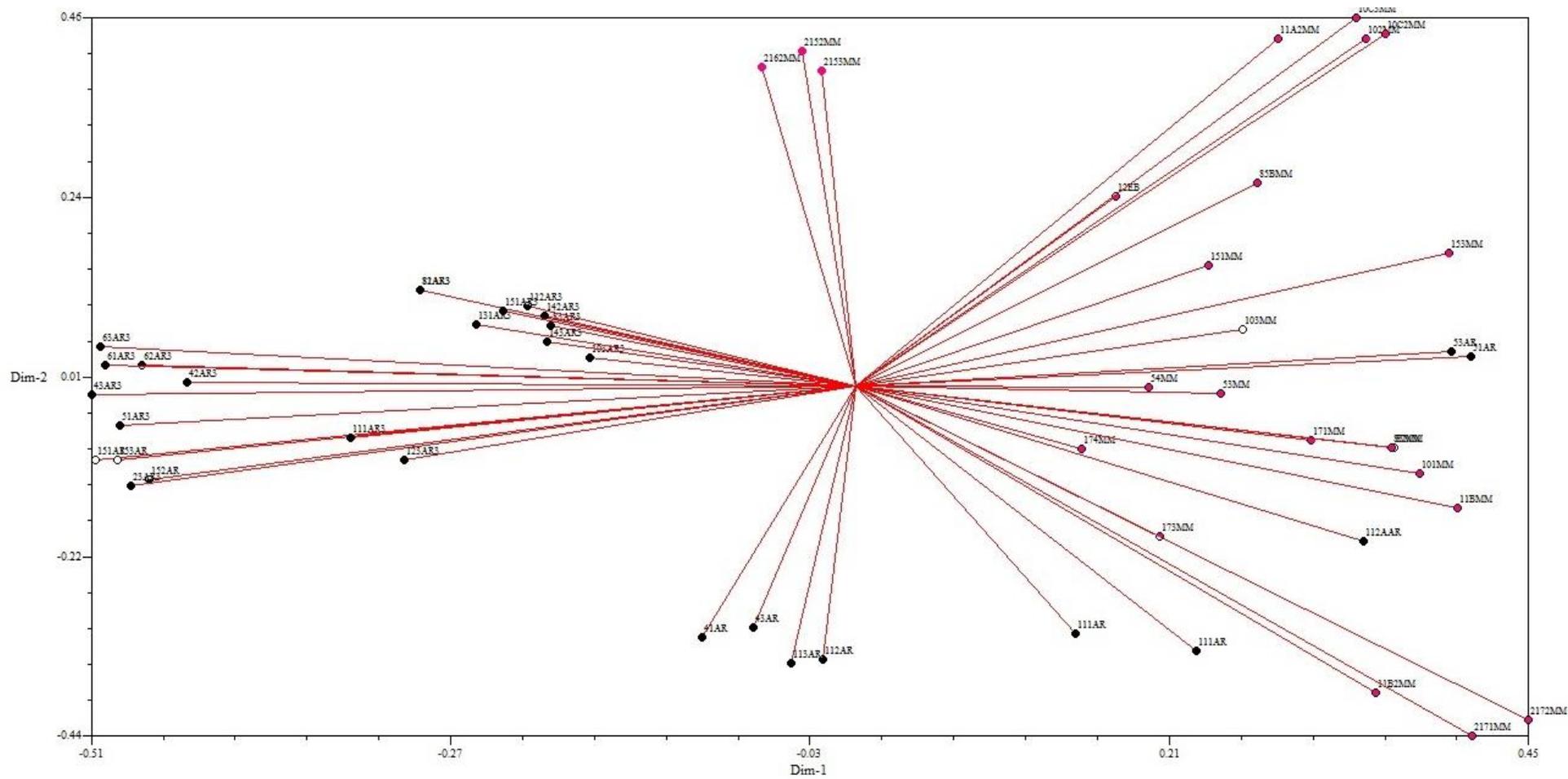


Figura 7- Projeção gráfica das distâncias genéticas de 54 isolados de *C. truncatum*, provenientes das principais regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, com base no coeficiente de Jaccard. UnB: 2014.

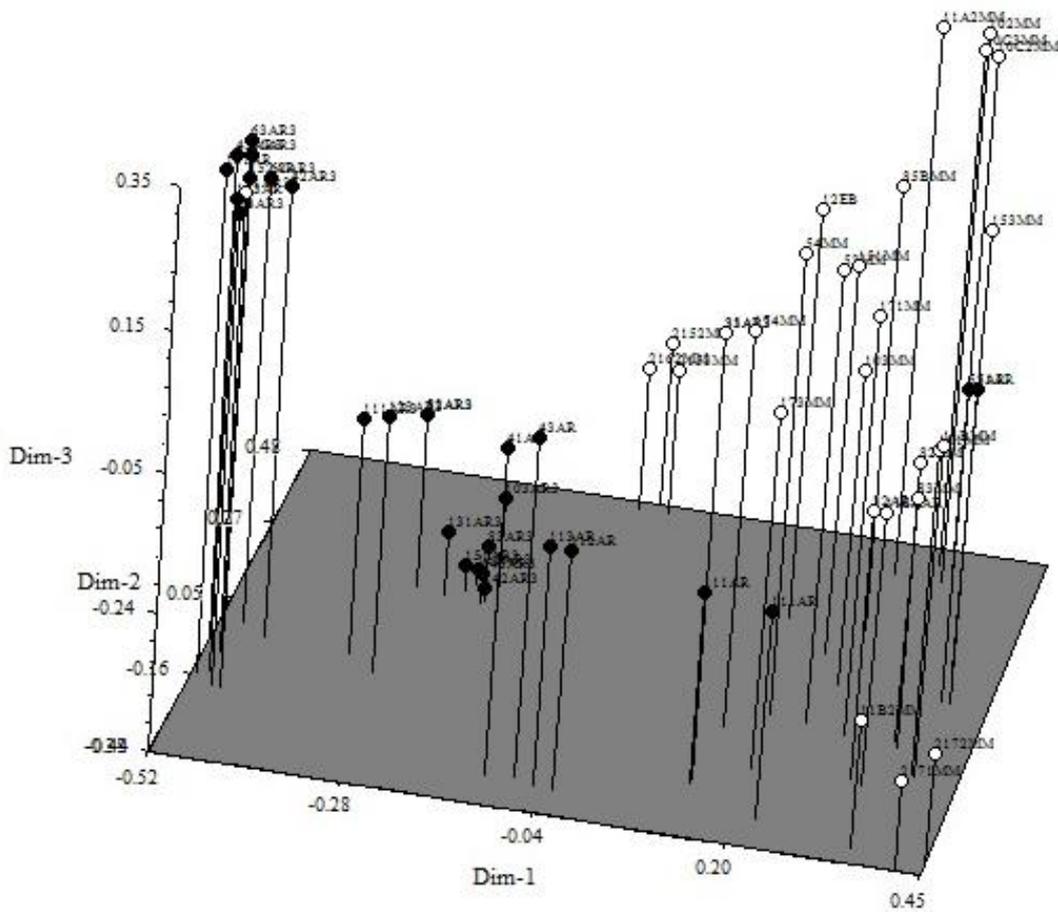


Figura 8- Projeção gráfica tridimensional das distâncias genéticas de 54 isolados de *C. truncatum*, provenientes das principais regiões produtoras de soja no Brasil e na Argentina, com base no coeficiente de Jaccard. UnB: 2014.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE *Colletotrichum cliviae* e *C. truncatum* COMO AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE DA SOJA.

RESUMO

A antracnose da soja pode ser causada por diferentes espécies de *Colletotrichum*, mas é mais frequentemente associada a *C. truncatum*. Outras espécies conhecidas incluem *C. coccodes*, *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines*), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) e *C. graminicola* (teleomorfo desconhecido). Recentemente (novembro de 2012 e janeiro de 2014), duas outras espécies com conídios truncados foram descritas como causadoras da antracnose: *C. chlorophyti* e *C. incanum*. Entretanto, no Brasil pouco se sabe sobre a diversidade dos agentes causais da antracnose da soja. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar isolados representativos de uma coleção de *Colletotrichum* associados à soja no Brasil, avaliar sua agressividade e descrever a distribuição de resistência varietal a este grupo de isolados com base em 16 genótipos de soja. Foram caracterizados seis isolados de *Colletotrichum* dos estados do RS, TO e MA, representantes de uma coleção de mais de 100 isolados coletados em diferentes Estados brasileiros. Foram estudadas a morfologia das colônias, dos conídios, apressórios e verificada a produção da forma perfeita em meio BDA. A caracterização molecular foi feita inicialmente por sequenciamento da região genômica do gene quitina sintetase (CHS-1), e posteriormente complementada pelo sequenciamento das seguintes regiões genômicas: B-tubulina2 (TUB-2), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GPDH), calmodulina (CAL), Actina (ACT) e rDNA ITS (ITS) e as sequências comparadas com sequências depositadas de diversas espécies de *Colletotrichum* depositadas no GeneBank. Foram evidenciados clados de *Colletotrichum* associados a soja através da análise filogenética gerada a partir da análise de parcimônia. Considerando o conjunto as características morfológicas, morfométricas e moleculares, cinco dos isolados avaliados apresentaram padrão característico de *C. truncatum*, incluindo conídios falcados, e um isolado (I5H) foi identificado como *Colletotrichum cliviae*, com conídios cilíndricos. A análise filogenética agrupou o isolado I5H com outros isolados de *C. cliviae*, com formação de subgrupos, caracterizando possíveis linhagens. Os seis isolados estudados foram patogênicos à soja e apresentam diferenças quanto a agressividade aos genótipos de soja utilizados neste estudo. O isolado I5H foi patogênico causando lesões cotiledonares caulinares nas plantas inoculadas, confirmando esta espécie como agente causal da antracnose da soja. Este é o primeiro relato de *C. cliviae* como patógeno da antracnose em soja e o primeiro relato da ocorrência desta espécie no Brasil. Foi obtida a formação do teleomorfo de *C. cliviae*, que se encontra dentro do gênero *Glomerella*. Os dados deste e de outros trabalhos recentes sobre a etiologia da doença indicam que a antracnose em soja é causada por um complexo de espécies de *Colletotrichum*, tanto de conídios falcados quanto cilíndricos.

Palavras-chave: *Colletotrichum* sp.; Sequenciamento; Doença da soja.

ABSTRACT

Characterization, Pathogenicity and aggressiveness of *Colletotrichum clivae* and *C. truncatum* as causal agents of soybean anthracnose

Soybean (*Glycine max*) anthracnose may be caused by different species of *Colletotrichum*, but is most frequently associated to *C. truncatum*. Other known species include *C. coccoodes*, *C. destructivum* (teleomorph *G. glycines*), *C. gloeosporioides* (teleomorph *G. cingulata*) and *C. graminicola* (teleomorph unknown). Recently, (November 2012 and January 2014), two new species with falcate conidia have been described as additional causal agents: *C. chlorophyti* and *C. incanum*. In Brazil, knowledge about the diversity of the soybean anthracnose agents is scarce. This study aimed to characterize representative isolates of a collection of *Colletotrichum* associated to soybean in Brazil, estimate their aggressiveness to the host and describe the host varietal resistance based on a group of sixteen soybean genotypes. Six *Colletotrichum* isolates from the States of RS, TO and MA, representing a group of more than 100 isolates collected in different Brazilian states were studied in detail. Colony characteristics in artificial medium, conidium and appressorium morphology and the production of the perfect stage in BDA were examined. Molecular characterization was done initially by sequencing of the genome of the coding region for chitin synthetase (CHS-1), and complemented later by sequencing of the following coding regions: B-tubulin 2 (TUB-2), glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GPDH), calmodulin (CAL), Actin (ACT) and rDNA ITS (ITS), which were compared to the deposited sequences of several species of *Colletotrichum* at the GeneBank. Several clades of *Colletotrichum* associated to soybean were detected by phylogenetic analysis through parsimony analysis. Considering the aggregate of the morphological, morphometric and molecular analyses, five of the isolates agreed with characteristic patterns for *C. truncatum*, including falcate conidia, and one isolate (I5H) agreed with *Colletotrichum clivae*, which has cylindrical conidia. Phylogenetic analysis grouped isolate I5H with other *C. clivae* isolates, with formation of subgroups, characterizing possible lineages. All six isolates studied were pathogenic to soybean and differences in aggressiveness were detected among them. Isolate I5H was highly aggressive, causing cotyledon and stem lesions by artificial inoculation. This is the first report of *C. clivae* occurring naturally as a soybean pathogen and the first report of this species in Brazil. The teleomorph of *C. clivae* was obtained in culture, and it agrees with the genus *Glomerella*. The results of this and other recent work on the etiology of soybean anthracnose indicate that the disease is caused by a complex of species, with both falcate and cylindrical conidia.

Key words: *Colletotrichum* sp., sequencing, Soybean disease

1- INTRODUÇÃO

A antracnose da soja (*Glycine max* (L.) Merr) é geralmente associada a *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, espécie de conídios falcados (Hyde *et al.*, 2009), embora, pelo menos quatro outras espécies também estejam associadas à doença: *C. coccodes*, *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines*), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) e *C. graminicola* (teleomorfo desconhecido) (Hartman *et al.*, 1999). Recentemente, Yang *et al.* (2012, 2014) descreveram mais duas outras espécies de conídios falcados, *C. chlorohyti* e *C. incanum* causando antracnose da soja nos EUA.

Segundo Chen *et al.* (2006), a antracnose é considerada a doença mais destrutiva da soja-hortaliça em Taiwan e relatam *C. truncatum* e *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*), mas não *G. glycines*, como os principais patógenos causadores de antracnose nas vagens e caules. A literatura recente (Cai *et al.*, 2009; Damn *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012, 2014) indica que o patossistema antracnose da soja é complexo e a etiologia da doença ainda é insuficientemente compreendida. Pode afirmar que a etiologia da doença no momento é confusa e há escassez de informações sobre o patógeno em muitas partes do mundo, especialmente no Brasil. Em outras culturas, a ocorrência de múltiplas espécies de *Colletotrichum* causando antracnose é conhecida, como por exemplo, em amêndoa (*Prunus dulcis*), abacate (*Persea americana*) e morango (*Fragaria sp.*) (Freeman *et al.*, 2000).

Os sintomas mais comumente anotados na antracnose da soja podem ser observados na Figura 1. Notam-se lesões escuras, irregulares, formando depressões nas hastes e pecíolos. Nas folhas, manifestam-se lesões na parte abaxial, com nervuras necrosadas de coloração escura. Em vagens, quando infectadas no estágio inicial de formação, adquirem coloração castanho-escuro a negra e ficam retorcidas. Nas vagens em granação as lesões iniciam-se por estrias de anasarca que evoluem para manchas negras, podendo atingir toda a vagem. As lesões nas vagens têm forma indefinida e coloração castanho-escuro, recobertas por acérvulos, cujas numerosas setas de cor negra tem valor diagnóstico. Vagens infectadas no início de formação podem não produzir semente. Observa-se também abortamento de vagens Quando a

infecção é tardia há formação de sementes, mas com baixa qualidade, e estas podem servir como fontes de inóculo para disseminação à longas distâncias.

A doença pode causar perda total na produção em função da redução do número de vagens, além de induzir a retenção foliar e a haste verde no hospedeiro (Embrapa, 2008; Recomendações, 2007; Balardin, 2002; Dias *et al.*, 2012). Alguns autores (Balardin, 2002; Hartman *et al.*, 1999) mencionam perdas de até 100% da produção em condições climáticas ótimas para a doença.

Apesar da crescente importância da doença no Brasil (Dias *et al.*, 2012; Barros, 2008), pouca informação existe sobre a variabilidade do patógeno e da agressividade dos *Colletotrichum* associados à cultura. Do lado do hospedeiro, à exceção dos trabalhos de Costa *et al.* (2006, 2009), pouca informação sistemática está disponível sobre a disponibilidade de resistência genética em soja. Nem mesmo a recomendação oficial de controle da doença trata do uso de cultivares resistentes, enfatizando apenas métodos culturais de controle como rotação de culturas, manejo do solo, adubação potássica, maior espaçamento e menor densidade de plantio (Embrapa, 2008). Entretanto, Dias *et al.* (2012) e outros autores enfatizam o emprego variedades resistentes como ponto chave no manejo integrado da antracnose na cultura da soja.

Costa *et al.* (2009) mencionam as vantagens do emprego de cultivares resistentes como componente do manejo integrado, citando o reduzido impacto ambiental, baixo custo e redução da necessidade de insumos. A antracnose pode se manifestar em plântulas de soja durante os estádios V1 e V2, causando lesões cotiledonares e tombamento (Hartman *et al.*, 1999). Sintomas mais severos são normalmente encontrados posteriormente, a partir da pré-floração e início da floração. Embora a relação entre os dois tipos de sintomas não esteja esclarecida, a determinação da resistência juvenil no hospedeiro é um dado importante para a seleção de genótipos em programas de melhoramento genético. Klingelfuss & Yorinori (2001) observaram que *C. truncatum* e *Cercospora kikuchii* estavam presentes nos folíolos de soja, mesmo na ausência de sintomas no campo. Segundo estes autores, a antracnose se caracteriza por apresentar um longo período latente, i.e., o patógeno infecta a plantas precocemente, mas os sintomas da doença são observados em estádios mais avançados do seu desenvolvimento.

Costa *et al.*, (2006) relataram que a resistência aumenta com a maturação das plantas entre dois estádios vegetativos (V1/V2 e V5/V6) e indicaram a existência de diferenças genéticas quanto a resistência à antracnose em genótipos de *G. max*. Observações em lavouras comerciais nos estados do Tocantins, Goiás e Distrito Federal revelaram comportamento diferencial quanto à sintomatologia da antracnose em diferentes cultivares de soja. Alguns genótipos do hospedeiro são mais suscetíveis em folhas e hastes, enquanto outros são mais suscetíveis em vagens.

Outro aspecto importante a considerar é a possibilidade de variação na agressividade dos isolados de *C. truncatum*, e possivelmente outras espécies de *Colletotrichum*, provenientes de diferentes regiões geográficas. A especificidade patogênica e a agressividade dos isolados do complexo antracnose da soja não foram estudadas em detalhe no Brasil, ou mesmo em outros países. O conhecimento da diversidade do patógeno, não apenas do ponto de vista taxonômico, mas também quanto à agressividade, tem implicações diretas no controle da doença, seja ele químico, genético ou cultural.

Trabalhos em outros patossistemas complexos, como o complexo de espécies de *Xanthomonas* causadoras de mancha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) mostraram que a sensibilidade à cobre e à estreptomicina varia de acordo com a espécie do agente causal (Araújo *et al.*, 2012). Estudos recentes em antracnose da mangueira (*Mangifera indica*) (Lima *et al.*, 2013), revelaram grande diversidade entre os agentes causais, muito maior do que até a então conhecida, tendo sido detectadas cinco espécies de *Colletotrichum* capazes de causar sintomas de antracnose na mangueira.

Em levantamento em lavouras comerciais em todas as regiões produtoras de soja do país, foram reunidos mais de uma centena de isolados com diversas características distintas, incluindo uma maioria tipicamente semelhante à *C. truncatum* e *C. gloeosporioides*, além de outros que não se assemelham às espécies até o momento descritas em soja. Desta forma, um grupo de seis isolados, representantes desta coleção, incluindo um isolado de conídios cilíndricos, representativo daqueles atípicos, foram estudados com ferramentas de taxonomia clássica, tais como forma e tamanho dos conídios, apressórios, acérvulos e setas, além de características biológicas e culturais em meio de cultura e ferramentas moleculares.

A identificação precisa em nível específico é fundamental para compreender a epidemiologia e desenvolver o controle efetivo das doenças. A identificação baseada em

morfologia sempre foi problemática em *Colletotrichum*, porque há poucos caracteres confiáveis e muitos desses caracteres são plásticos, dependentes de métodos e condições experimentais. O progresso nos métodos filogenéticos moleculares permite reconhecer clados estáveis e geneticamente definidos dentro de *Colletotrichum* que permitem uma taxonomia mais estável para o gênero. Desta forma, Cai *et al.* (2009) recomendam uma abordagem polifásica para a identificação de espécies de *Colletotrichum*, combinando distinção genética com caracteres morfológicos e biológicos. A análise filogenética com sequenciamento de multi-gênico é uma ferramenta útil para uma identificação preliminar de espécies de *Colletotrichum*. No entanto, dados filogenéticos proporcionam melhor compreensão das relações dentro *Colletotrichum* e devem ser utilizados quando possível.

Este trabalho teve como objetivos: 1- caracterizar morfometricamente e molecularmente isolados de *Colletotrichum*. 2- Estudar as diferenças de patogenicidade e agressividade de isolados de *Colletotrichum* associados a soja, bem como avançar no esclarecimento da identidade dos agentes etiológicos associados à cultura no Brasil. 3- identificar possíveis fontes de resistência de cultivares de soja à antracnose.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a caracterização morfológica dos isolados no Laboratório de Epidemiologia Botânica da Universidade de Brasília, o sequenciamento foi realizado na Embrapa CNPH –DF, e os testes de patogenicidade na empresa Wherman Agrícola Ltda em Cristalina-GO. Foram caracterizados seis isolados de *Colletotrichum* associados a soja, de acordo com a morfologia das colônias, forma e tamanho dos conídios e apressórios e produção da forma perfeita em meio BDA. A caracterização molecular dos isolados foi feita por sequenciamento de um segmento do gene que codifica a quitina sintetase (CHS-1), o qual apresentou um padrão de bandas de alta qualidade e informações suficientes para confirmação das espécies de *Colletotrichum* das amostras analisadas. Para confirmação da associação inédita de uma nova espécie de *Colletotrichum* como agente da antracnose em soja outras regiões genômicas e intragênicas foram sequenciadas: β -tubulina2 (TUB-2), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GPDH), Calmodulina (CAL), Actina (ACT) e rDNA ITS (ITS) sendo as sequências comparadas com sequências depositadas de diversas espécies de *Colletotrichum* depositadas no GeneBank

2.1 - Obtenção dos isolados

Com base na morfologia das colônias de uma coleção de mais de 100 isolados das principais regiões produtoras de soja do Brasil, foram selecionados seis isolados, sendo dois do Estado do Rio Grande do Sul, três do Estado do Maranhão e um do Estado do Tocantins. Para obtenção das culturas, discos miceliais devidamente armazenados segundo o método Castellani *et al.*, (1967), foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Icumedia®) acrescido de 180 mg/L de cloranfenicol. As placas foram mantidas em incubadoras biológicas (Eletrolab®) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo 12 h por sete dias. Após esse período as colônias foram repicadas para novas placas de Petri e incubadas por igual período.

2.2. Caracterização morfológica, morfológica e cultural

Os isolados foram caracterizados de acordo com características morfológicas e morfológicas segundo Sutton (1980) e Hyde *et al.* (2009), através da determinação da coloração das colônias, crescimento vegetativo em meio BDA e dimensões dos conídios e apressórios. O crescimento micelial foi determinado aos sete dias de cultivo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pela média de duas medidas perpendiculares entre si passando pelo centro da colônia com emprego de paquímetro manual. Para medição dos conídios e apressórios foram montadas lâminas semi-permanentes em lacto-glicerol. Posteriormente, estas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Leica[®] DM 2500 provido de câmara Leica[®] DFC 490, acoplada a um sistema eletrônico de captura de imagem. A mensuração das estruturas fúngicas, foram realizadas com 30 repetições através do programa Leica[®] Qwin.

2.3- Caracterização molecular

2.3.1- Extração do DNA

As amostras para extração do DNA foram obtidas de culturas monospóricas através da raspagem de micélio fúngico cultivado em meio BDA por um período de 7 dias em incubadora biológica a 25°C . O DNA total foi extraído individualmente de amostra de acordo com a metodologia de CTAB 2X sem correção de pH (Boiteux *et al.*, 1999). Em cada tubo foram colocadas seis esferas metálicas, juntamente com pequena quantidade homogênea do micélio do fungo. Acrescentou-se aos tubos 250 μL de CTAB e as amostras foram trituradas no equipamento Precellys[®]24. Após 30 segundos a 5000 rpm, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos; em seguida, acrescentou-se 750 μL de clorofil em cada tubo, sendo as amostras agitadas em vortex por aproximadamente 30 segundos, seguido de um ciclo de centrifugação à 9000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrífuga e 600 μL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Em seguida foram acrescentados 300 μL de isopropanol gelado e com a finalidade de homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e posteriormente centrifugados a 13000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o 'pellet' lavado com álcool 70%, de forma cuidadosa, para evitar a sua ressuspensão. Os tubos foram então colocados em estufa a 37°C

por 20 minutos e ressuspensos em 100 µL de TE+RNase, armazenando os tubos na geladeira. No dia seguinte, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs extraídos foram guardados em freezer (-20°C). As quantificações de DNA foram feitas visualmente através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (1,5 µL/100 mL de gel), comparando com amostras de concentração conhecida de DNA I (20 a 400 ng).

2.3.2- Amplificação e sequenciamento de regiões gênicas

Foi realizado o sequenciamento das seguintes seis regiões do genoma fúngico: B-tubulina2 (TUB-2), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GPDH), calmodulina (CAL), Actina (ACT) e rDNA ITS (ITS), tendo como referência a recomendação de Yang *et al.*, (2009) (Cannon *et al.*, 2012). Os primers empregados no sequenciamento se encontram na Tabela 1. As reações de amplificações do DNA foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 3,0 µl de DNA genômico a 10 ng/µl; 7,3µl de água milli-Q autoclavada; 2 µl de Tampão 10X para *Taq* DNA Polimerase; 2 µl de dNTPs (2,5 mM); 0,5 µl de MgCl₂ (50mM); 2,5 µl de cada *primer* (10 µM) e 0,2 µl de enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante Invitrogen® (5u/µl). A amplificação foi executada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Instruments, USA). A reação foi submetida a um ciclo de desnaturação inicial do DNA (94°C, 5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação das fitas (94°C, 0,30 min), anelamento dos *primers* (52°C, 0,45 min) e extensão das fitas (72°C, 2 min). Subsequentemente, foi procedida uma extensão final (72°C, 7 min). Os fragmentos de DNA tiveram suas bandas purificadas utilizando o *Kit Invitrogen PureLinkTM*, seguindo as recomendações do fabricante. Os primers empregados no sequenciamento estão listados na tabela 1.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100, utilizando o Kit ABI Prism BigDye version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil) e os mesmos iniciadores de síntese utilizados na PCR, separadamente. As sequencias finais correspondentes aos fragmentos das seis regiões genômicas dos diferentes acessos fúngicos foram obtidas a partir da remoção de segmentos com baixa qualidade de acordo com os critérios estabelecidos por (Allex, 1999). A construção dos consensos dos fragmentos sequenciados com os *primers* senso e anti-senso foi conduzida utilizando o programa *SeqMan*

(Lasergene®, Madison, WI). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para *Colletotrichum* com o programa Blast-n disponível na página do ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3.3 - Alinhamento das sequências

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado por meio do software *Megalign* (Lasergene®, Madison, WI), com auxílio de programa *Clustal W* com as seguintes condições: “*gap penalty*” e “*gap length penalty*” =10. Os arquivos de cada alinhamento foram salvos no formato PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) para as análises filogenéticas. As sequências finais obtidas para as diferentes regiões genômicas caracterizadas no presente trabalho serão depositadas no GenBank.

2.3.4- Análises filogenéticas

Sequências de espécies do gênero *Colletotrichum* disponíveis no GenBank para as seis regiões genômicas estudadas foram selecionadas como grupo externo (*outgroup*) para enraizamento dos dendrogramas. A partir do alinhamento das sequências foi possível realizar a inferência filogenética do grupo estudado de acessos através da análise de Máxima Parcimônia (MP). Os dados das seis regiões estudadas (CHS-1, β -TUB2, GPDH, CAL, ACT e ITS1–5,8S–ITS2) foram analisados separadamente para o isolado I5H. Apenas a região quitina sintetase foi obtida para os demais acessos estudados.

A análise de Máxima Parcimônia foi conduzida usando o programa PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* version 3.1), através da busca heurística (Swofford, 2003). O programa PAUP foi utilizado para computar a árvore de consenso estrito e para calcular o grau de consistência de cada ramo da árvore através da análise de *bootstrap* com 1000 repetições. Associações que tiveram valores de *bootstrap* menores que 50% não foram consideradas. Todos os espaços (“*gaps*”) gerados no alinhamento foram considerados na construção das árvores. Além disso, foi calculado o número de caracteres informativos para parcimônia, o índice de consistência (IC), o índice de retenção (IR) e o índice de homoplasia (IH). Os isolados e suas respectivas sequências obtidas no GeneBank encontram-se Tabela 2.

2.4 - Patogenicidade e agressividade dos isolados e reação de cultivares

Foram instalados dois experimentos para avaliação de patogenicidade e agressividade (sensu Andrivon, 1993) dos isolados de *Colletotrichum* e o estudo de reação dos cultivares a esses isolados em casa de vegetação, na Empresa Agrícola Whermann Ltda, Cristalina, GO. O primeiro com plantio em novembro de 2012 e o segundo em fevereiro de 2013. Em cada experimento utilizou-se 16 variedades que foram inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum* na fase de plântula, aos 10 dias após a emergência. Os ensaios foram conduzidos em bandejas de isopor de 128 células, divididas em 16 fileiras e oito células por fileira. Foi plantada uma planta por célula, totalizando oito plantas de uma mesma cultivar por fileira e cada bandeja conteve 16 cultivares. A unidade experimental foi constituída pelas oito plantas de cada cultivar, correspondente a uma fileira. O delineamento experimental foi blocos ao acaso com quatro repetições. Cada bandeja foi inoculada com um isolado e mantida em casa de vegetação com suplementação de umidade na forma de nebulização. Um tratamento controle foi inoculado com água destilada nas mesmas condições dos demais. Cada bloco foi constituído por sete bandejas referentes aos seis isolados e a testemunha. O programa estatístico empregado para a análise dos dados foi o Assistat versão 7.7 beta (2013) e o teste de média empregado foi o Scott-Knott ($P \leq 0,01$ ou $0,05$), em análise fatorial (2 ensaios x 16 cultivares x 7 isolados). As condições acima descritas em que os ensaios foram conduzidos encontram-se na figura 2.

2.4.1 -Produção do inóculo e inoculação

As plântulas foram inoculadas com suspensão de conídios, obtidos a partir de colônias cultivadas por 10 dias a 25°C, fotoperíodo de 12 h em meio BDA. Foram transferidos quatro discos de BDA de 0,5 cm de diâmetro em tubos de rosca de 100 mL contendo fragmentos de 1 cm de folhas de taboa (*Typha domingensis*) previamente autoclavadas e incubadas por 15 dias, conforme recomendado por Costa *et al.* (2009) modificado. Nestas condições, foi observada abundante esporulação de todos os isolados do patógeno. Para coleta dos esporos, a cada tubo foi adicionado solução de 0,5% de Tween 80, para facilitar a liberação de esporos. A suspensão produzida foi agitada vigorosamente e, em seguida, filtrada em camada dupla de gaze para retirada de fragmentos da taboa, de micélio, meio de cultura. Na suspensão de esporos resultante foi realizado o ajuste da concentração para 10^5 esporos/mL, com emprego

de câmara de Neubauer. Nas condições descritas o isolado I5H produziu forma perfeita na taboa inoculada, apresentando colonização subepidérmica, com formação de peritécio subgloboso.

As plântulas foram inoculadas 10 dias após a emergência, no estágio V1/V2 segundo a escala de Fher (1977), por pulverização de suspensão aquosa de esporos, na concentração de 10^5 conídios/mL, seguido de incubação por 24 h em câmara úmida instalada na própria casa de vegetação, por meio de molhamento via irrigação por nebulização.

2.4.2- Inoculação e avaliação da incidência e severidade da doença

As avaliações foram realizadas 10 dias após a inoculação. Foram computados o número de plântulas com lesões cotiledonares e caulinares, de maneira independente. Para determinação da incidência da doença foi considerado o número total de plantas inoculadas e o número de plantas com sintomas, obtendo-se a incidência média para lesões cotiledonares e a incidência média para lesões no caule. No segundo ensaio, em adição à contagem do número de plantas com sintomas, foi também avaliada a severidade da doença, pela medição visual do tamanho das lesões externas do caule com emprego de paquímetro graduado manual. Os dados de severidade foram comparados para estimar as diferenças de agressividade entre os isolados.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Caracterização morfológica, morfométrica e cultural

Todos os isolados produziram esporódios setosos típicos de *Colletotrichum*, com presença de setas abundantes e massa de esporos que variaram de bege pálido a alaranjado em meio BDA. Hifas melanizadas e produção de clamidósporos. As estruturas descritas de cada isolado constam das Figuras 3, 4, 5, 6,7 e 8.

Com base nas características morfológicas e na descrição contida em Sutton (1980), cinco isolados, com conídios falcados e provenientes dos estados do RS e do MA foram identificados como pertencentes a espécie *C. truncatum*. Quanto à coloração das colônias, os isolados apresentaram micélio com tonalidades variáveis de cinza com branco e reverso cinza escuro esverdeado a negro. Todos esses cinco isolados apresentaram crescimento lento, inferior a 5 cm de diâmetro aos sete dias de cultivo a 25°C em BDA. Resultado semelhante foi obtido por Jagtap & Sontakke (2009). O isolado 15H, proveniente do estado do TO, apresentou conídios cilíndricos e crescimento micelial mais rápido que os demais, atingindo 9 cm aos 7 dias de cultivo. Quanto ao formato da colônia, os isolados 11A2MM (RS), 11.7MM (RS) e 10C3MM (MA) apresentaram formato estrelar, enquanto os isolados 5.1MM (MA) e 6.1MM (MA) apresentaram colônias circulares com margens irregulares e enrugadas. O formato estrelar das colônias também foi relatado por Carvalho (2009). A textura é pouco Cotonosa, caracterizada pela presença discreta de micélio aéreo. Os dados morfológicos e culturais de todos os isolados estão apresentados na Tabela 3.

O isolado 6.1MM apresentou a menor média de tamanho de conídios, medindo $19,5 \times 3,6 \mu\text{m}$, e o isolado 11.7MM apresentou a maior média com $25,8 \times 3,5 \mu\text{m}$. Estes resultados também coincidem com os relatados por Jagtap & Sontakke (2009). Estes autores estudaram a morfologia de *C. truncatum* patogênicos a soja na Índia e observaram conídios variando de $18,8 \times 3,5 \mu\text{m}$ a $26,4 \times 3,6 \mu\text{m}$ em seis isolados. Quanto à descrição de Sutton (1980) este relata variação de $15,5\text{-}24 \mu\text{m} \times 3,5\text{-}4,0 \mu\text{m}$. Carvalho (2009) caracterizou *C. truncatum* causadores da antracnose do feijão fava e encontrou as mesmas variações descritas pelos demais autores, avaliando três isolados, encontrou as seguintes dimensões de conídios: $18,3\text{-}26,6 \mu\text{m} \times 2,0\text{-}4,0 \mu\text{m}$. Quanto à forma e dimensão dos apressórios dos isolados estudados no

presente trabalho foram encontrados os tipos circulares, clavados e irregulares, medindo entre $13,2 \times 8,3 \mu\text{m}$ a $9,0 \times 6,0 \mu\text{m}$. Estas medidas estão compatíveis com as descrições de Sutton (1980) com variação de $11-16 \times 8-9.5 \mu\text{m}$. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

O isolado 15H, proveniente do Estado do Tocantins, de conídios cilíndricos, destacou-se dos demais isolados com apresentando as seguintes características: Colônias com coloração cinza escura a negra com reverso negro, crescimento rápido, conídios cilíndricos hialinos, não septados medindo $14-18 \mu\text{m} \times 4-6 \mu\text{m}$, apressórios variando de $10-19 \times 4-9 \mu\text{m}$ com formato variável, lobados e crenados. As características morfológicas são similares a descritas por Hyde *et al.* (2009) para *Colletotrichum cliviae* em espécies pertencentes a família *Amaryllidaceae*. No entanto não detectaram a fase ascógena do fungo, a qual foi observado posteriormente por Hyde *et al.*, (2013), em isolado proveniente de hospedeira da família *Orquidaceae*. No presente em BDA e folhas de Taboa autoclavadas, o isolado I5H formou ascomas com características de espécies de *Glomerella*. Os ascos variaram de $46-62 \mu\text{m} \times 9-14 \mu\text{m}$ e os ascósporos de $15-21 \mu\text{m} \times 4,5-6 \mu\text{m}$, hialinos unicelulares, curvados com extremidades obtusas. No entanto, no caso registrado por Hyde *et al.* (2013), os ascos apresentaram dimensões maiores comparadas com as encontradas no presente estudo, no entanto os ascósporos mostram dimensões semelhantes. Desta forma, este é o segundo relato da forma perfeita de *C.cliviae*, o primeiro relato da ocorrência desta espécie no Brasil, e principalmente, o primeiro relato de *C. cliviae* como patógeno causador da antracnose em soja.

O sequenciamento de um fragmento do gene quitina sintetase, a partir dos primers CHS179F/CHS35AR e da comparação com outros isolados no Genbank, confirmou que os isolados 11A2MM, 11.7MM, 5.1MM, 6.1MM e 10C3MM pertencem à espécie *C. truncatum*. Cinco dos isolados apresentaram 99 e 98% de identidade com *C. truncatum* (GenBank KC109571.1). Quanto ao isolado I5H este apresentou 98% de similaridade com *Colletotrichum cliviae* (GenBank JX519232.1). Para a confirmação da identidade deste isolado, foram sequenciadas as regiões genômicas CHS-1, B-tubulina2, GPDH, Calmodulina, Actina e ITS1–5,8S–ITS2. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas com geração de uma árvore filogenética que permitiu agrupar os isolados de diferentes espécies associadas a antracnose da soja, em clados distintos, permitindo a confirmação da espécie *C. cliviae* obtida da cultura da soja com outros isolados de *C. cliviae* com origem na China com sequências obtidas no GenBank.

3.3- Análise filogenética

O conjunto de dados da região gênica que codifica actina compreendeu 243 caracteres após o alinhamento, e o número de caracteres parcimônicos informativos foi 68, o que correspondeu a 27,98% dos dados. A árvore gerada à partir da análise de parcimônia apresentou os seguintes índices (CI= 0.8472, %PIC=27,98%, RI=0.9083, RC=0.7696 e o HI=0.1528) (Tabela 5), o que possibilitou separar os isolados em 5 clados distintos. O clado 1 corresponde ao isolado CPOS1 *C. coccodes*, o clado 2 é composto pelos isolados I5H, CSSS1, CSSS2, CSSK4 E CORCG4 pertencente a *C. cliviae* com formação de 2 sub grupos com bootstrap 100%. Clado 3 os isolados CSST5, CSSX2, CSST3 pertencentes ao táxon *C. truncatum* com formação de dois subgrupos bootstrap 100%. O Clado 4 corresponde ao isolado CGMCC3.15129 de *C. destructivum* bootstrap 98% e o clado 5 corresponde ao grupo externo *C. graminicola* (Figura 9)

Considerando a região gênica que codifica β -tubulina esta foi constituída por 513 caracteres após o alinhamento, e o número de caracteres parcimônicos informativos foi 173 o que correspondeu a 33,72% dos dados. A árvore gerada a partir da análise de Parcimônia apresentou os seguintes índices (CI= 0.8006, %PIC=33,72%, RI=0.8620, RC=0.6901 e o HI=0.1994) (Tabela 5), o que possibilitou separar os isolados em 6 clados distintos com separação de espécies de *Colletotrichum* e agrupando os isolados de maneira semelhante ao agrupamento da região gênica actina e ITS (Figura 9).

O alinhamento das sequências correspondentes a um segmento do gene calmodulina foi constituído por 684 caracteres e o número de caracteres parcimônicos informativos foi 248 correspondendo a 36,25% dos dados. A árvore gerada à partir da análise de parcimônia apresentaram os seguintes índices (CI= 0.9222, %PIC=33,25%, RI=0.9597, RC=0.8851 e o HI=0.07789) (Tabela 5), o que possibilitou separar os isolados em 5 clados distintos com separação de espécies de *Colletotrichum* e agrupando os isolados de maneira semelhante ao agrupamento da região gênica Actinas e β -tubulina. (Figura 9).

O gene CHS foi constituído por 229 caracteres após alinhamento e o número de caracteres parcimônicos informativos foi 38 correspondendo a 16,59% dos dados. A árvore gerada à partir da análise de parcimônia apresentaram os seguintes índices (CI= 0.8167, %PIC=

16,59%, RI=0.9083, RC=0.7696 e o HI=0.1833) (Tabela 5), o que possibilitou agrupar em 5 clados semelhante ao agrupamento da região gênica Actina, β -tubulina e Calmodulina (Figura 9).

Os dados da região gênica GPDH foram constituídos por 250 caracteres após alinhamento e o número de caracteres parcimônicos informativos foi 133 correspondendo a 53,2% dos dados. A árvore gerada à partir da análise de parcimônia apresentou os seguintes índices (CI= 0.9188, %PIC=53,25%, RI=0.9600, RC=0.8820 e o HI=0.0812) (Tabela 5), o que possibilitou separar os isolados em 5 clados distintos com separação de espécies de *Colletotrichum* e agrupando os isolados de maneira semelhante ao agrupamento da região gênica Actinas, β -tubulina, ITS e Calmodulina (Figura 9).

A Região ITS1–5,8S–ITS2 foi constituída por 523 caracteres após o alinhamento e o numero de caracteres parcimônicos informativos foi 84 correspondendo a 16,06% dos dados. A árvore gerada a partir da análise de Parcimonia apresentou os seguintes dados (CI= 0.8023, %PIC=16,06%, RI=0.8776, RC=0.7041 e o HI=0.1977) (Tabela 5), o que possibilitou separar os isolados em 5 clados distintos de maneira semelhante ao agrupamento da região gênica Actina, no entanto, foi adicionados dois isolados de *C. gloeosporioides* e a exclusão do *C. destructivum* devido o mesmo não possuir sequência depositada no GeneBank para essa região. (Figura 9).

As análises das seis regiões genômicas, independentes, através da análise de parcimônia, gerou filogramas semelhantes. No entanto, a região que apresentou o maior número de caracteres informativos foi a região gênica que codifica a Calmodulina com 684 caracteres totais sendo 248 informativos totalizando 36,5% dos dados. Contudo, a maior porcentagem de caracteres informativos são na região gênica GPDH esta apresentou 250 caracteres totais sendo 133 informativos totalizando 53,2% dos dados. A região ITS foi a menos informativa, com 523 caracteres totais e apenas 84 informativos totalizando 16% dos dados.

Os alinhamentos das sequencias encontram-se em anexos, representados pelas figuras, 10, 11,12 13,14 e 15.

3.4-Patogenicidade e agressividade de *Colletotrichum truncatum* e *C. clivae* em plântulas de soja

3.4.1-Incidência em cotilédones

Houve interação significativa ($p \leq 0,01$) entre isolados e experimentos (tabela 6), portanto os resultados de cada ensaio foram analisados separadamente. No primeiro ensaio a incidência da antracnose em cotilédones foi estatisticamente menor quando comparadas com as incidências no segundo ensaio, o qual apresentou um incremento na ordem de 60,8% pois a incidência média no primeiro ensaio foi de 15,6% e 25,1% no segundo. Cerca de 12-14% das plantas testemunhas apresentaram sintomas no cotilédones entre os ensaios. Os dados encontram-se nas tabelas 7 e 8.

Ensaio 1: No primeiro ensaio todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha quanto à incidência da antracnose nos cotilédones não diferindo entre si ($P \leq 0,01$). A maior média de incidência 18%, foi obtida com o isolado 11.7MM e a segunda maior média foi 16,6% pelo isolado I5H e a testemunha 12,1%.

Ensaio 2: No segundo ensaio, quanto à incidência da antracnose nos cotilédones, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha, no entanto apenas o isolado 5.1MM diferiu dos demais ($P \leq 0,01$), com incidência média de 32,8% em cotilédones. Em relação ao isolado I5H este apresentou uma incidência média de 27,3% em cotilédones, e a testemunha 13,8%.

3.4.2- Incidência em caule

Foi detectada interação significativa ($P \leq 0,01$), entre experimento e isolado para a variável incidência da antracnose em caule (tabela 9), desta forma os ensaios são apresentados separadamente. Os dados encontram-se nas tabelas 10 e 11.

Ensaio 1. Quanto à incidência no caule, houve formação de quatro grupos distintos, apenas o isolado 10C3MM não diferiu da testemunha ($P \leq 0,01$), e todos os isolados diferiram entre si.

O isolado 11.7MM apresentou a maior média de incidência da antracnose no caule na ordem de 25,5% e o isolado I5H a segunda maior média 21%.

Ensaio 2: Em relação a incidência da antracnose no caule, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha, no entanto apenas o isolado 5.1MM diferiu dos demais ($P \leq 0,01$), com incidência média 20,7% no caule. Quanto ao isolado I5H considerando lesões no caule este não diferiu dos demais tratamentos, diferindo apenas da testemunha.

Considerando o primeiro ensaio, este apresentou média de 12,7% e o segundo ensaio média de 5,1%, no entanto o primeiro ensaio conduzido no mês de novembro apresentou incremento de 164% na incidência em caule. No segundo ensaio apenas o isolado 5.1MM foi capaz de colonizar e expressar sintomas no caule em todas as cultivares consideradas no estudo. Os demais isolados apresentaram essa habilidade reduzida sendo capaz de colonizar e causar sintomas no caule em uma faixa de 5 a 10 cultivares dependente do isolado. No caso específico do isolado I5H, o mesmo causou lesões em apenas 4 cultivares, embora estatisticamente não foi possível comprovar a interação entre isolados e variedades.

3.4.3-Agressividade

A agressividade estimada pelo comprimento das lesões no caule foi determinada apenas no segundo ensaio. As variações nas dimensões das lesões ocasionadas por *C. truncatum* e seus respectivos isolados foram: isolado 5.1MM 0,3 a 1,8cm; o isolado 10C3MM 0,4 a 1,3; o isolado 11.7MM 0,3 a 2,3; o isolado 6.1MM 0,4-1,2 e o isolado 11A2MM 0,3 a 1,2. O isolado I5H correspondente a *C. cliviae* apresentou variação de 0,2 a 1,7.

Estatisticamente apenas os isolados 5.1MM e 11.7MM diferiram estatisticamente da testemunha, diferindo entre si a ($P \leq 0,05$), com formação de três grupos distintos (tabelas 12 e 13). É importante ressaltar que apesar do isolado I5H mostrar uma baixa capacidade de causar lesões em caule agrupando-se com a testemunha neste segundo ensaio, no primeiro ensaio o qual não foi devidamente quantificado, mas observado, causou lesões intensas e a segunda maior média de incidência.

3.4.4- Reação de cultivares de soja

Ensaio 1- Quanto ao comportamento das cultivares inoculadas em novembro de 2012, estas diferiram estatisticamente entre si com formação de quatro grupos estatisticamente distintos ($P \leq 0,01$), tornando evidente a variabilidade do germoplasma de soja quanto à resistência no cotilédone. as cultivares que apresentaram os menores índices de lesões cotiledonares foram: BRS Pintado, TMG 115, W811, W877 e as mais susceptíveis foram: W891, W731, W875, W712.

Considerando incidência da antracnose no caule houve formação de 3 grupos estatisticamente distinto entre si. Os materiais que apresentaram os menores índices de lesões no caule foram: W842, BRS Pintado, W787, W875 e W877 e os maiores índice foram:W891, W801,W828 e P98Y11.

Ensaio 2 - Considerando o comportamento das cultivares, no experimento de fevereiro de 2013, houve diferença estatística quanto a incidência de lesões cotiledonares com formação de 5 grupos distintos ($P \leq 0,01$). As cultivares que apresentaram as menores médias de incidência da antracnose nos cotilédones e pertencentes ao mesmo grupo estatístico foram: W811, BRS Pintado, W842, W877, W875 e W791. A cultivar W712 obteve a maior média com 58% de incidência cotiledonar, sendo portanto estatisticamente distinta das demais, sendo portanto, a mais suscetível nas condições avaliadas.

Em relação a incidência de lesões no caule no segundo ensaio, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, todas as cultivares apresentaram o mesmo comportamento. No entanto foram observadas variações, as cultivares que apresentaram as maiores média de incidência no caule foram a W801 e W787 com 8,4% de incidência e a cultivar que obteve a menor média foi a cultivar W811 com 1,7% de incidência.

Quanto ao tamanho das lesões no caule, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com formação de dois grupos estatisticamente distintos. O grupo que apresentou as maiores médias de lesões no caule incluiu as seguintes cultivares: W875, P98Y11, W828, W787, TMG127, W801, sendo considerada as mais suscetíveis para esta variável, nas condições avaliadas. As Cultivares mais resistentes pertencente ao segundo grupo estatístico a

5%pp foram: W731, W842, W810, W877, W791, W811, W891, TMG115, W712 E BRS Pintado.

A variável “Incidência de lesão cotiledonar” foi mais discriminatória entre as variáveis, esta afirmação tem como pressuposto que todos os isolados causaram lesões cotiledonares, mas nem todos causaram lesões no caule.

Embora a literatura considere como principal agente causal da antracnose da soja a espécie *C. truncatum*, a taxonomia dos agentes causais da antracnose está claramente em um estado de fluxo (e.g. Yang *et al.*, 2012, 2014) e várias outras espécies de *Colletotrichum* também podem estar envolvidas na doença em diferentes regiões geográficas. Até o momento, nenhum relato de *C. clivae* esteve associado à antracnose da soja. O isolado I5H, proveniente do Estado do TO, onde lesões em plântulas e plantas adultas são muito severas, classificou-se como um dos mais agressivos à soja, causando lesões tanto em cotilédones como em hastes (Figura 2). Além deste isolado, diversas amostras da coleção de isolados de soja do Brasil, provenientes dos estados do TO, MA e DF parecem pertencer à mesma espécie, de acordo com caracteres moleculares definidos por padrão de bandas por meio da técnica RAPD e caracteres morfológicos como coloração e aspectos das colônias.

Este é o primeiro relato sobre a etiologia da antracnose no Brasil e acrescenta informações relevantes para o controle da doença. *Colletotrichum clivae* não foi relatada no Brasil, nunca foi relatada como patogênica à soja, tem habilidade de colonizar tanto as folhas cotiledonares quanto a tecidos caulinares de plântulas em desenvolvimento e se apresenta como muito agressiva à cultura. A detecção de *C. clivae* em soja no Brasil reforça a ideia que a antracnose na cultura da soja não é devida a apenas um agente causal, mas a um complexo de espécies, talvez distribuídos em regiões geograficamente distintas. A confirmação da variabilidade do agente causal deverá ser considerada nas recomendações de controle genético, químico e cultural, pois as características dos agentes causais da antracnose, assim como sua agressividade são distintas.

Colletotrichum cliviae foi originalmente descrito na China, coincidentemente o mesmo centro de origem da soja. É possível que esse patógeno seja originário da Ásia e que tenha sido introduzido no Brasil via sementes de germoplasmas ou de variedades comerciais de soja. De fato, o trânsito de sementes de soja foi e ainda é extenso entre o Brasil e outros países. Não se exclui a possibilidade de que esse patógeno já esteja no Brasil há muito tempo.

No entanto, a similaridade morfológica com *C. gloeosporioides*, outro *Colletotrichum* de conídios cilíndricos e que já é conhecido em soja, pode ter evitado uma prévia e correta identificação da espécie. Diante da confirmação de *Colletotrichum cliviae* no Brasil e apresentando capacidade patogênica e alta agressividade na cultura da soja, surge a necessidade de busca de resistência para esse patógeno, uma vez que os genes de resistência também tendem a ser espécie-específicos. Além disso, os sintomas causados por esta espécie estão entre os mais severos. Um levantamento mais amplo para estimar a distribuição geográfica e a importância epidemiológica de *C. cliviae* também se faz necessário.

4-CONCLUSÕES

- Considerando as características morfológicas, morfométricas e moleculares todos os isolados avaliados apresentaram padrão característico de *C. truncatum* com exceção do isolado I5H que de acordo com as características mencionadas foi identificado como *C. cliviae*.
- Foram detectadas diferenças de agressividade entre os isolados de *C. truncatum*.
- As regiões gênicas, Actina, Calmodulina, β -tubulina, CHS, GPDH e ITS geraram por meio de análise de parcimônia o mesmo padrão de árvore filogenética (filograma).
- A região que apresentou o maior número de carácter informativo foi a região gênica que codifica a Calmodulina e a região com menor carácter informativo foi a região ITS.
- Foi possível diferenciar os clados de *Colletotrichum* associados a cultura da soja através das árvores filogenéticas gerada a partir da análise de parcimônia, as quais agruparam o isolado I5H com outros isolados de *C. cliviae* obtidos no GeneBank, com formação de sub grupos caracterizando possíveis linhagens.
- Confirmou-se que a antracnose da soja possui mais de um agente causal, incluindo *C. cliviae* no Brasil.
- Há variabilidade genética das cultivares para resistência a antracnose.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS ,C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. 4.ed. New York: John Wiley & Sons. 868p.

ALLEX, C.F. 1999. Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. University of Wisconsin-Madson. 222p.(tese)

ANDRIVON D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83: 889-890

Anônimo (<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636>) O Brasil será o maior produtor mundial de soja. Acesso 15/10/2013.

ARAÚJO, E.R.; PEREIRA, R.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; CAFÉ FILHO, A.C. 2012. Sensitivity of Xanthomonads causing bacterial spot to copper and spretomycin and in vivo infra-specific competitive ability in Xanthomonas perforans resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology* 94 (1): 79-87.

ARMSTRONG-CHO, C.L., BANNIZA, S. 2006. *Glomerella truncata* sp. nov., teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. *Mycological Research* 110:951-956.

ARAÚJO, A.G., CAFÉ-FILHO, A.C., CUPERTINO, F.P. 1988. Antracnose da soja na região geoeconômica do Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 13:130. (Resumo).

BAILEY, J. A., JEGER, M. J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CAB International..

BALARDIN, R.S. 2002. Doenças da Soja. UFSM, 107p

BARROS, G.E.G. 2008. Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD. 64p. (dissertação de mestrado).

BOITEUX, L.S.; FONSECA M.E.N.; SIMON P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32–36.

- CAI, L., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W.J., WEIR, B.S, WALLER, J.M., ABANG, M.M, ZHANG, J.Z., YANG, Y.L., PHOULIVONG, , LIU, Z.Y, PRIHASTUTI, H., SHIVAS, R.G., MCKENZIE, E.H.C5 AND JOHNSTON, P.R. A 2009. Polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity. Online advance. 183-204.
- CAMPOS, H.D.O.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C. 2006. Soja: Antracnose. Cultivar Grandes Culturas ano 7, no 83:26-28.
- CARBONE, I. AND KOHN, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553-55
- CARVALHO, E.M.S. 2009 antracnose em Feijão-fava: Caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum*. (Tese Doutorado). Jaboticabal, 53p.
- CASTELANI,O, RIBEIRO,L.V., FERNANDES,J.F.1967. Differentiation of *Tripanossoma cruzi* in culture. The Journal of Protozoology 14:3,447-451p.
- CHEN, L.S.; CHU, C.; LIU, R.S.; CHEN, R.S.;TSAY, J.G. 2006. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. Phytopathology 154: 654-662.
- COSTA, I.F.D. 2005. Controle de Doenças de Final de Ciclo na Cultura da Soja. (Tese doutorado, UFSM). Santa Maria, 100p.
- COSTA, I.F.D.; BALARDIN, R.S.; MEDEIROS, L.A.M; BAYER, T.M. 2006 Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. Ciência Rural 36: 1684-1688.
- COSTA, I.F.D.; BALARDIN, R.S.; MEDEIROS, L.A.M.; LENZ, G.; GOULART, C.A.; ZEMOLIN, C.R., SILVA, T.M.B. 2009. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. Tropical Plant Pathology. 34:047-050
- DAMN, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39: 45-87
- DELGADO, G.V.; COSTA, L.H.; FREITAS, M.; CAMPOS, A.L.T.; GOMES, P.F., CAFÉ-FILHO, A.C. 2008. Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum dematium* var. *truncatum* por meio de inoculação de sementes. Tropical Plant Pathology 33: S281. (Resumo).

DIAS, M.D., MIRANDA FILHO, R., CAFÉ-FILHO, A.C. 2011a. Avaliação da incidência de antracnose em soja na região Centro Oeste do Brasil. *Tropical Plant Pathology* 36:430 (Resumo).

DIAS, M.D.; MIRANDA FILHO, R.; PINHEIRO, V.F.; CAFÉ-FILHO, A.C. 2011b. Controle químico da antracnose na cultura da soja. *Tropical Plant Pathology* 36:429 (Resumo).

DIAS, M.D.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2012. Antracnose: Mais desafiadora. *Cultivar Grandes Culturas* 155. a.14:22-23.

EMBRAPA (2008). Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina, PR, 261p.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. Ames:Iowa State University.12p. (Special Report, 80).

FREEMAN,S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. 2000.Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and Other Fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.

GUERBER, J.C.; LIU B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON P.R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95: 872-895.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.

HARTMAN,G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. 1999. Compendium of Soybean Diseases, 4ed, St. Paul, Minnesota: APS Press.

HENNING, A.A. 1994. Patologia de Sementes. Londrina: Embrapa – CNPSo, 43p. (Documentos, 90)

HYDE, K.D.; CAI, L., CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.;, CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y., MCKENZIE, E.H.C.8, MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.;, PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; AND ZHANG, J.Z.1 2009. *Colletotrichum* – Names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.

- JAGTAP, G.P.; SONTAKKE, P.L. 2009. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum truncatum* isolates pathogenic to soybean. African Journal of Agricultural Research 4: 1483-1487.
- KLINGELFUSS, L.H., YORINORI, J.T. 2000. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* e efeito de fungicidas sobre doenças de final de ciclo em soja. Summa Phytopathologica 26: 356-361.
- LEHMAN, P.S.; MACHADO, C.C.; TARRAGO, M.T. 1976. Frequency and severity of soybean diseases in the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Fitopatologia Brasileira 1:183-193.
- LENNÉ, J.M. 1978. Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia.
- LIMA, N.B.; BATISTA, M.V.A.; MORAIS, M.A.; BARBOSA, M.A.G.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.P.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. Fungal Diversity 61: 75-88.
- MENEZES, M., HANLIN, R.T. 1996. Apressoria of brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose diseases. Revista de Microbiologia 27:247-251.
- MENEZES, M. 2006. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas 3:170-179.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7: 103-116.
- SINGH, D.P. 1993. Relative susceptibility of soybean cultivars to pod blight by *Colletotrichum truncatum* (Schw). Agricultural Science Digest. 13:90-92.
- SOUZA, R.T. 2009. Reação de cultivares e controle da antracnose da soja. Tese doutorado. Passo Fundo-RS. 106p
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- TEMPLETON, M.D., RIKKERINK, E.H., SOLON, S.L. AND CROWHURST, R.N. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122: 225-230.

TIFFANY, L.H.; GILMAN, J.C. 1954. Species *Colletotrichum* from legumes. Mycology, Lancaster, PA, 46: 52-75.

YANG, H-C; HAUNDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. 2012. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. Plant Disease 96: 1699 (Disease Notes).

YANG, H-C; HAUNDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. 2014. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a novel curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. Mycologia 106: 32-42.

YANG, Y.; CAI, L.; YU., Z.; LIU, Z.; HYDE K.D. 2011. *Colletotrichum* species on Orquidaceae in southwest China. Cryptogamie Mycology. 32:1-26.

YORINORI, JT; KLINGELFUSS, LH; CAMARGO,TV; HENNING, AA 2000. Levantamento das doenças fúngicas da soja, seus impactos sobre o rendimento e aferição das atuais medidas de controle. In: EMBRAPA SOJA. Resultados de pesquisa da Embrapa soja, 1999. Londrina, p.64-69.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. AND TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, San Diego: 315-322

Tabela 1 – Primers usados para amplificação PCR e sequenciamento do DNA de *Colletotrichum cliviae*.

Gene	Primer	Sequencia dos primers	Referência
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Actina	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Konh, 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
CAL	CL1	GARTACAAGGAGGCCTTCTC	Johnston, pers.comm.
	CL2	TTTTTGCATCATGAGTTGGAC	
CHS1	CHS1-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	Carbone et al, 1999
	CHS1-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	
GPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003.
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	Templeton et al., 1992
B-Tubulina	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell & Cigelnic, 1997
	βt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass & Donaldson, 1995

Tabela 2- Isolados de *Colletotrichum* usados neste estudo, com número do GenBank para seis genes.

Taxon	Espécie N°	Hospedeiro	Origem	GenBank					
				N° ITS	β -tubulina	N° CAL	N° CHS1	N° GPDH	N° Actina
<i>C. cliviae</i>	CSSK4	<i>Clivia miniata</i>	China	GQ485607	GQ849440	GQ849464	GQ856722	GQ856756	GQ856777
<i>C. cliviae</i>	CSSS1	<i>Clivia miniata</i>	China	GU109479	GU085869	GU085863	GU085865	GU085867	GU085861
<i>C. cliviae</i>	CSSS2	<i>Clivia miniata</i>	China	GU109480	GU085870	GU085864	GU085866	GU085868	GU085862
<i>C. cliviae</i>	CORCG2	<i>Cymbidium hookerianum</i>	Guiyang, Guizhou	HM585397	HM585422	HM582007	HM582024	HM585380	HM581985
<i>C. cliviae</i>	CORCX9	<i>Arudina raminifolia</i>	Jinghong, Yunnan	HM585398	HM585423	HM582008	HM582025	HM585381	HM581986
<i>C. coccodes</i>	CPOS1	<i>Solanum tuberosum</i>	Guizhou	GQ485588	GQ849444	GQ849468	GQ856723	GQ856744	GQ856787
<i>C. gloeosporioides</i>	CORCG4	Vanda sp.	Luodian, Guizhou	HM034808	HM034810	HM034802	HM034804	HM034806	HM034800
<i>C. gloeosporioides</i>	CORCG4	Vanda sp.	Luodian, Guizhou	HM034809	HM034811	HM034803	HM034805	HM034807	HM034801
<i>C. truncatum</i>	CSSX2	<i>Crinum asiaticum</i>	China	GQ485595	GQ849424	GQ849457	GQ856736	GQ856750	GQ856766
<i>C. truncatum</i>	CSST3	Hymenocallis sp.	Tailândia	GQ485592	GQ849442	GQ849471	GQ856740	GQ856754	GQ856779
<i>C. truncatum</i>	CSST5	Hymenocallis sp.	Tailândia	GQ485591	GQ849428	GQ849458	GQ856741	GQ856751	GQ856781
<i>C. truncatum</i>	CBS120709	<i>Capsicum frutescens</i>	Índia	GQ485593	GQ849429	GQ849453	GQ856739	GQ856753	GQ856783
<i>C. destructivum</i>	CGMCC	-	-	-	-	-	-	-	KC843546
<i>C. graminicola</i>	ATCCMYA4	-	-	KF278451	-	-	-	-	GQ005831
<i>C. graminicola</i>	-	-	-	-	-	-	AY052545	-	-

Tabela 3 – Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* cultivados em meio BDA por 7 dias e incubados a 25°C ± 2°C.

Caracteres	Isolados					
	11A2MM	I5H	11.7MM	5.1MM	6.1MM	10C3MM
	Colônias					
Origem geográfica	RS	TO	RS	MA	MA	MA
Crescimento	Lento	Rápido	Lento	Lento	Lento	Lento
Forma	estrelar	circular	Circular	Circular enrugado	Circular enrugado	Estrelar
Margem	Irregular	Regular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
Coloração	Cinza com branco reverso negra	Cinza escura a negra reverso negra	Cinza com branco reverso cinza escuro esverdeado	Cinza escura com reverso negra	Cinza escura com reverso negra	Cinza com branco reverso negra
Textura	Pouco Cotonosa	Pouco Cotonosa	Pouco Cotonosa	Pouco Cotonosa	Pouco Cotonosa	Pouco Cotonosa
Zona	Ausente	Circular	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Conídio					
Comprimento	23,0	16,0	26,0	24,0	20,0	24,0
Largura	4,0	5,0	3,5	3,5	3,5	3,0
Septação	Não septado	Não setado	Não septado	Não septado	Não septado	Não septado
Coloração	Hialino	Hialino	Hialino	Hialino	Hialino	Hialino
Formato	Falcado	Cilindrico	Falcado	Falcado	Falcado	Falcado
	Apressório					
Comprimento	13,0	14,0	13,5	10,0	13,5	9,0
Largura	8,5	6,5	7,0	7,0	7,5	6,0
Formato	Variadol	Variáado	Variado	Variado	Variado	Variado

Tabela 4- Dimensões de conídios e apressórios de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* cultivados em meio BDA durante 7 dias e incubados a $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. μm

Isolado	Dimensão dos conídios (μm)				Dimensão do apressório (μm)			
	Comprimento		Largura		Comprimento		Largura	
	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação
11A2MM	23,5	20,0 - 27,0	4,0	3,0 - 5,0	13,0	9,0 - 19,0	8,5	6,5 - 11,0
15H	16,0	14,0 - 18,0	5,0	4,0 - 6,0	14,0	10,0 - 19,0	6,56	4,0 - 9,0
11.7MM	26,0	24,0 - 28,0	3,5	3,0 - 4,0	13,5	9,0 - 19,0	7,0	5,0 - 9,0
5.1MM	24,5	22,0 - 27,0	3,5	3,0 - 4,0	10,0	6,5 - 15,0	7,5	6,0 - 9,0
6.1MM	20,0	15,0 - 25,0	3,5	2,0 - 5,0	13,5	11,5 - 18,0	7,0	5,5 - 8,5
10C3MM	24,5	21,0 - 28,0	3,0	2,0 - 4,0	9,0	7,0 - 12,0	6,0	4,5 - 7,0

Tabela 5- Descrição da análise estatística para Actina, β -tubulina, CAL, CHS1, GPDH e ITS, determinado pelo PAUP.

	Actina	β -tubulina	CAL	CHS 1	GPDH	ITS
Caracter	243	513	684	229	250	523
NPIC	68	173	248	38	133	84
%NPIC	27,98%	33,72%	36,25%	16,59%	53,2%	16,06%
CI	0.8472	0.8006	0.9222	0.8167	0.9188	0.8023
RI	0.9083	0.8620	0.9597	0.9083	0.9600	0.8776
RC	0.7696	0.6901	0.8851	0.7696	0.8820	0.7041
HI	0.1528	0.1994	0.0789	0.1833	0.0812	0.1977

Abreviação:

NPIC, Numero de caracteres porcimônicos informativos.

CI, Índice de consistência.

RI, índice de retenção.

RC, consistência da retenção

HI, índice de homoplasia.

Tabela 6: Experimento fatorial com sua respectiva análise de variância, com as fontes de variação: experimento, cultivar, isolado e interações entre os fatores para a variável, incidência em cotilédone. Programa, ASSISTAT versão 7.7 beta (2013). UnB:2014.

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivar	15	102311.99	6820.79	28.66**
Isolado	6	10088.47	1681.41	7.06**
Experimento	1	19923.04	19923.04	83.73**
Cultivar X isolado	90	17641.06	196.01	0.8238ns
Cultivar X Experimento	15	34701.16	2313.41	9.72**
Isolado X Experimento	6	3713.10	618.85	2.60*
CultivarX isolado X experimento	90	24984.64	277.60	1.16ns
Tratamento	223	213363.49	956.78	4.02**
Erro	672	159892.70	237.93	
Total	895	373256.20		

** Significativo a 1% de probabilidade ($P < .01$)

*Significativo a 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

Ns – Não significativo

Tabela 7- Incidência da antracnose em cotilédones de 16 cultivares inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae*.

Cultivares	Ensaio 1	Ensaio 2
w877	6,2aA	8,4aA
W811	6,2aA	8,9aA
BRS Pintado	5,3aA	9,3aA
W842	15,1bA	11,6aA
W828	15,6bA	12,0aA
W875	25,4cA	14,7aB
W791	8,0aA	16,0aA
W810	19,1cA	19,1bA
TMG 115	5,3aB	21,8bA
P98Y11	13,3bB	24,1bA
W801	16,5bB	25,4 bA
TMG127	15,2bB	38,8cA
W731	28,5dB	39,6cA
W891	32,8dB	45,0cA
W787	16,9bB	49,1dA
W712	21,4cB	58,0eA
Média	15,2	24,5

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5%.

Tabela 8- Incidência de seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* em cotilédones de 16 cultivares de soja. Brasília:2014.

Isolado	Ensaio 1	Ensaio2
11.7MM	18,0aB	26,5bA
I5H	16,6aB	27,3bA
5.1MM	16,2aB	32,8aA
11A2MM	16,2aB	25,7bA
10C3MM	15,6aB	23,8bA
6.1MM	15,2aB	25,9bA
TEST	12,1aA	13,8cA
Média	15,6	25,1

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%
Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5%.

Tabela 9: Experimento fatorial com sua respectiva análise de variância, com as fontes de variação: experimento, cultivar, isolado e interações entre os fatores para a variável incidência em caule. Programa, ASSISTAT versão 7.7 beta (2013).

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivar	15	9928.154	661.876	3.060**
Isolado	6	32675.105	5445.850	25.183**
Experimento	1	15604482	15604.482	72.160**
Cultivar X isolado	90	13596.464	151.071	0.6986ns
Cultivar X Experimento	15	5822.378	388.158	1.7950*
Isolado X Experimento	6	24780.647	4130.107	190990**
CultivarX isolado X experimento	90	12282.083	136.467	0.6311ns
Tratamento	223	114689.317	514.301	2.378**
Erro	672	145318.180	216.247	
Total	895	260007.497		

** Significativo a 1% de probabilidade ($P < .01$)

*Significativo a 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

Ns – Não significativo

Tabela 10- Incidência da antracnose em Caule de 16 cultivares inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* na cultura da soja.

Variedades	Ensaio 1	Ensaio 2
W842	5,3aA	2,2aA
PINTADO	6,2aA	4,4aA
W787	8,0aA	8,4aA
W731	8,4aA	0,8aA
W712	8,9aA	2,6aA
W875	9,8aA	5,3aA
W877	9,8aA	2,6aA
TMG 115	12,9bA	5,3aA
P98Y11	13,3bA	5,8aA
W791	13,3bA	2,6aB
TMG127	14,2bA	5,8aB
W810	14,7bA	4,0aB
W811	14,7bA	1,7aB
W828	17,0bA	7,5aB
W801	23,2cA	8,4aB
W891	25,8cA	4,4aB
Média	12,8	5,1

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5%.

Tabela 11- Incidência de seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* em caule inoculados em 16 cultivares de soja.

Isolado	Ensaio 1	Ensaio 2
TEST	0,0 aA	0,0 baA
10C3MM	1,6 aA	1,4 bB
11A2MM	9,3 bA	2,1bB
5.1MM	13,1 cB	20,7aA
6.1MM	18,9 dA	1,4bB
I5H	21,0 dA	1,7 bB
11.7MM	25,5eA	4,5 bB

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5%.

Tabela 12: Análise de variância referente ao segundo ensaio, conduzido em fevereiro de 2012. Fontes de variação, isolado e cultivar. Variável analisada: tamanho de lesão no caule. Programa estatístico SISVAR, teste de media Scot Knot 5% pp.UnB:2014.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivar	15	3.548	0.236575	2.274	0.0046
Isolado	6	19.570	3.261785	31.353	0.0000
Bloco	3	0.210	0.070031	0.673	0.5688
Cultivar X Isolado	90	10.476	0.116410	1.119	0.2398
erro	331	34.434	0.104033		
Total corrigido	445	68.241			
Cv(%)	196.4				
Média geral	0.16	N.observações:	446		

Tabela 13- Tamanho de lesão em caule, induzidas por 5 isolados de *Colletotrichum truncatum* e 1 isolado de *C. cliviae* em 16 cultivares de soja.

Isolado	Tamanho das lesões no caule
Testemunha	0.00 a
6.1MM	0.04 a
I5H	0.04 a
10C3MM	0.06 a
11A2MM	0.09 a
11.7MM	0.24 b
5.1MM	0.64 c

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%.

Tabela 14-Tamanho de lesão típica de antracnose em Caule de 16 cultivares inoculadas com seis isolados de *Colletotrichum truncatum* e *C. cliviae* na cultura da soja.

Variedades	Tamanho de lesão no caule
W731	0.03a
W842	0.05a
W810	0.06a
W877	0.08a
W791	0.10a
W811	0.11a
W891	0.12a
TMG135	0.13a
BRS Pintado	0.13a
W712	0.14a
W801	0.21b
W787	0.23b
TMG127	0.28b
W828	0.30b
P98Y11	0.30b
W875	0.30b
MÉDIA	0.15

Letras iguais na coluna não difere estatisticamente entre si a 5%

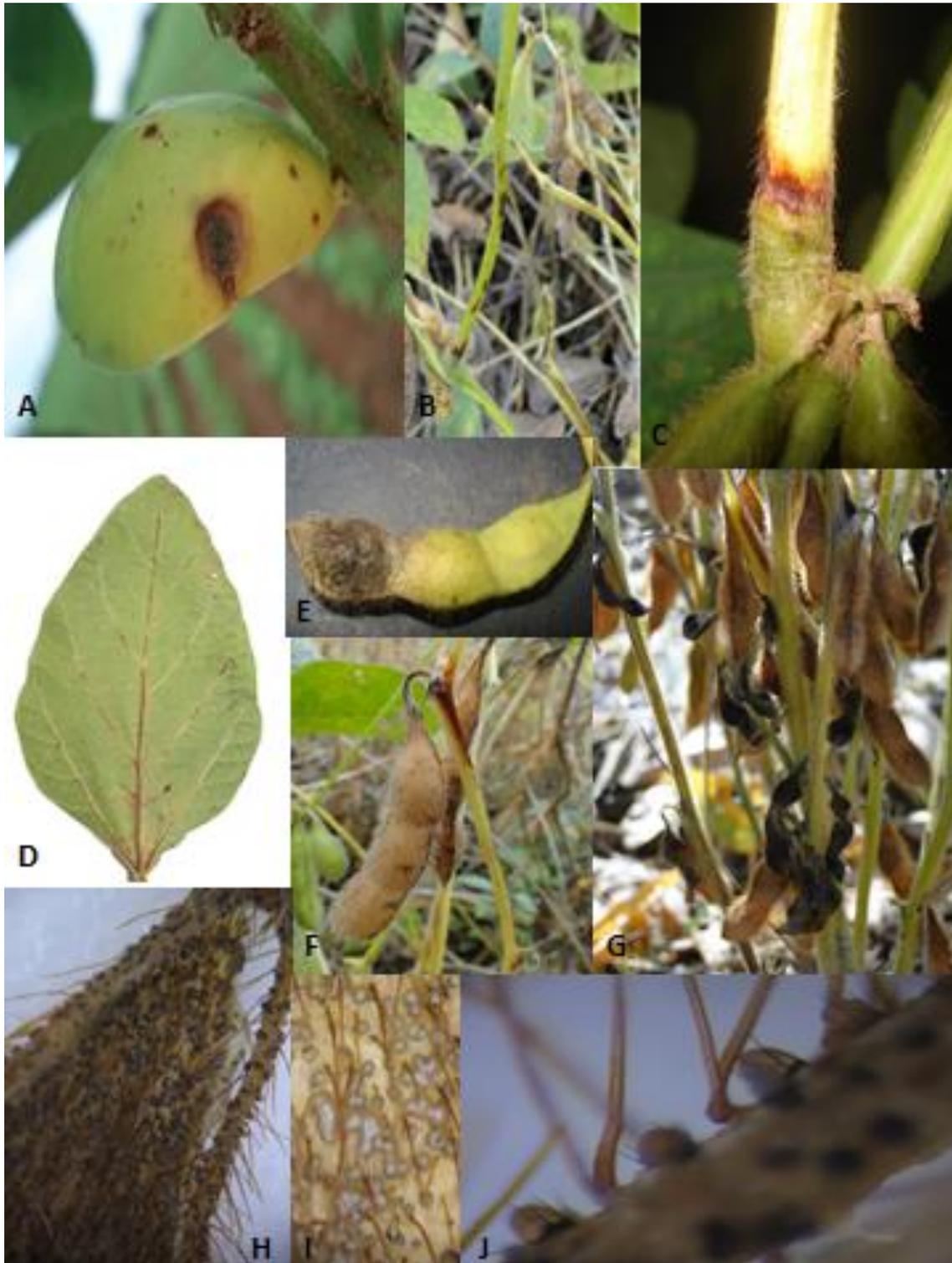


FIGURA 1. Sintomas de antracnose observados em lavouras comerciais de soja nos estados do TO e DF. **A**, lesão típica em cotilédones. **B**, sintomas no caule. **C**, lesão avermelhada deprimida na base do pecíolo. **D**, lesões nas nervuras com coloração castanha. **E**, lesões necróticas em vagens em granação. **F**, seca do pecíolo em vagem. **G**, vagem retorcida e negra. **H**, acérvulos com abundante esporulação em vagem. **I**, detalhes da massa de esporos produzidas pelos acérvulos. **J**, setas emergindo da massa de esporos dos acérvulos em vagem.



FIGURA 2. Inoculação e sintomas induzidos por *Colletotrichum cliviae* isolado de plantas de soja naturalmente infectadas. **A**, Planta de taboa. **B**, Detalhes da produção de inóculo em Taboa autoclavada com abundante colonização. **C**, Estádio de desenvolvimento da plântula no momento da inoculação. **D**, detalhes do processo de inoculação. **E**. Vista geral do ensaio em casa de vegetação. **F**, testemunha. **G**, sintoma no caule após 10 dias da inoculação com *C. cliviae*. **H**, sintoma nas folhas cotiledonares após 10 dias da inoculação com *C. cliviae*.

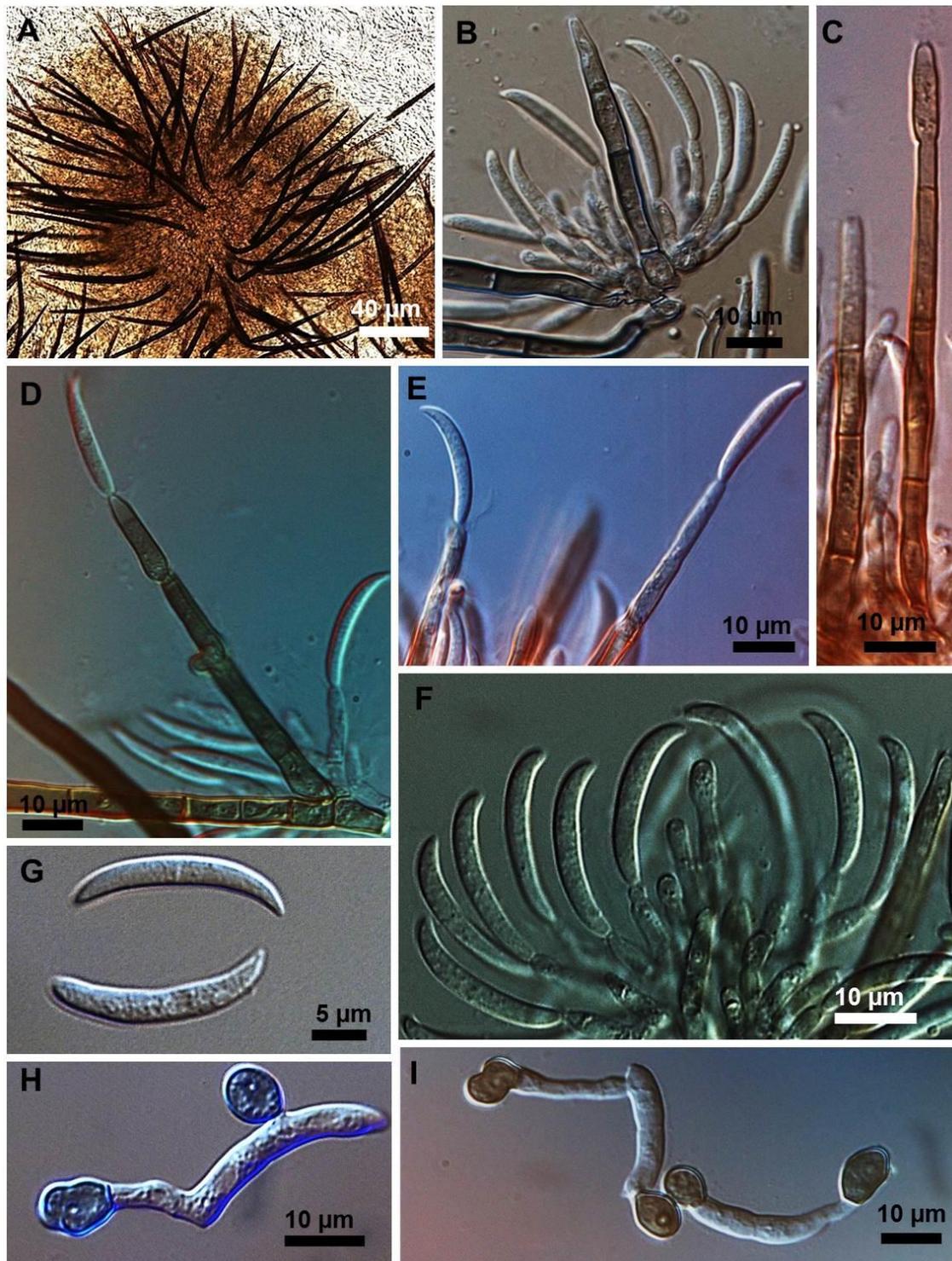


FIGURA 3. *Colletotrichum truncatum*, isolado 10C3MM obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**, Estroma setoso. **B e F**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios falcados. **C-E**, setas férteis com produção de conídios a partir da extremidade. **G**, detalhes dos conídios. **H e I**, apressórios de formato variado.

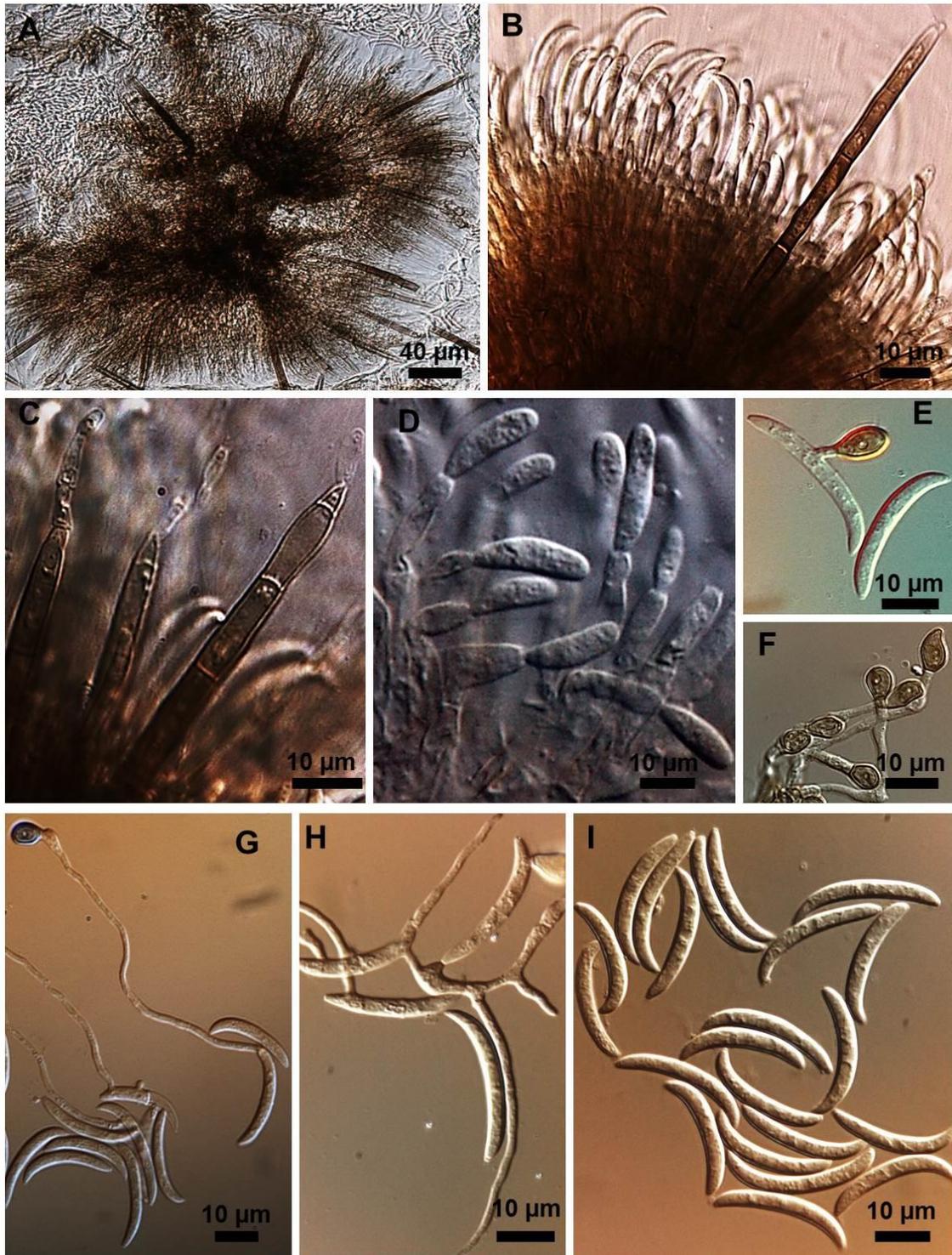


FIGURA 4. *Colletotrichum truncatum*, isolado 5.1MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A**, Estroma setoso. **B e D**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios cilíndrico-falcado. **C**, setas férteis com produção de conídios a partir da extremidade. **E,F,G** Apressórios. **H**, conidiogênese a partir de hifas **I**, detalhes dos conídios.

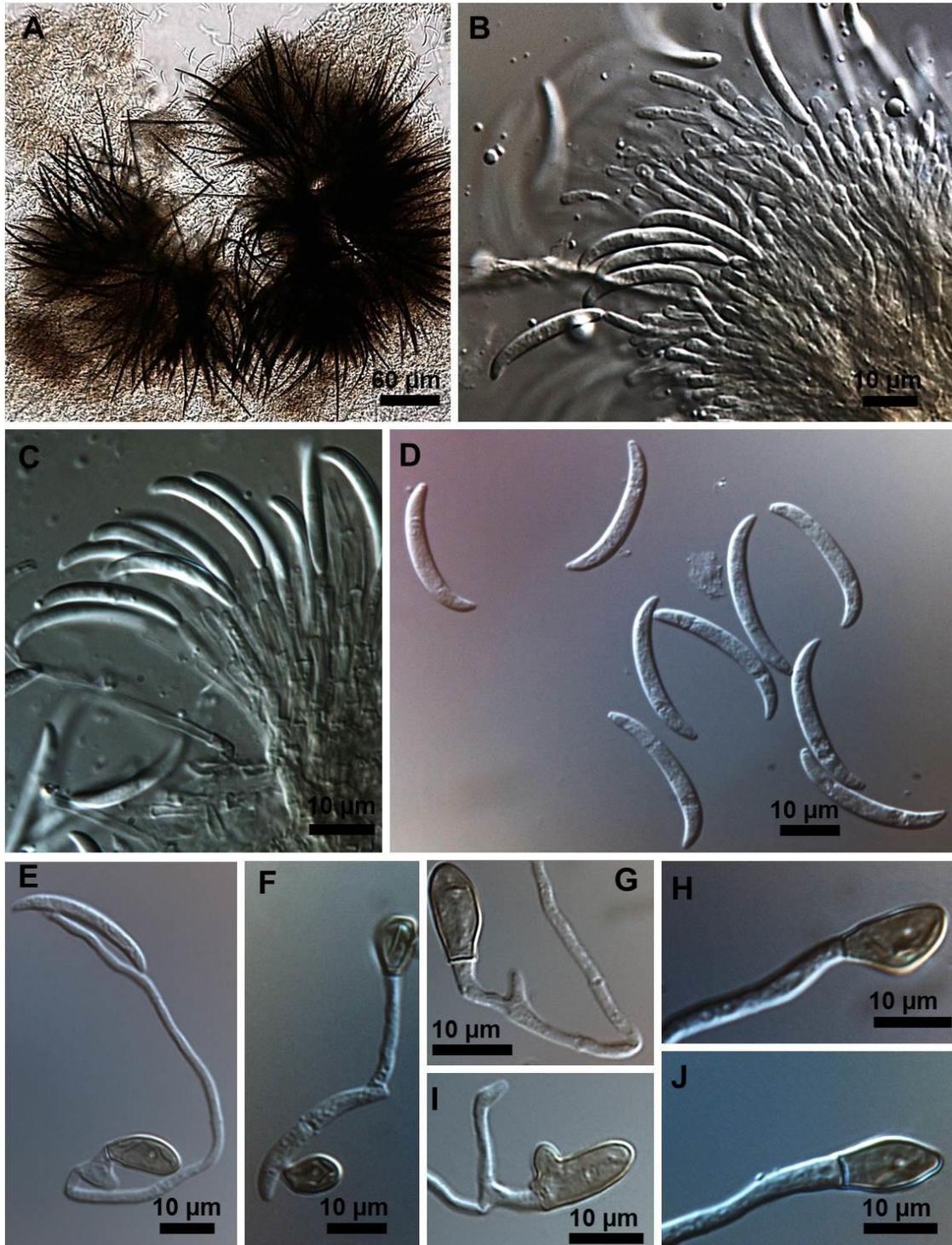


FIGURA 5. *Colletotrichum truncatum*, isolado 11.7MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica **A**, Estroma setoso. **B e C**, Esporodóquios formados nos estromas setosos mostrando grupos de células conidiogênicas fialídicas dando origem a conídios cilíndrico-falcado. **D**, grupo de conídios **E**, Apressórios formando hifas em cultura. **F-G**, Apressórios oriundos da germinação de conídios. **I, J e H**, apressórios de formato variado.

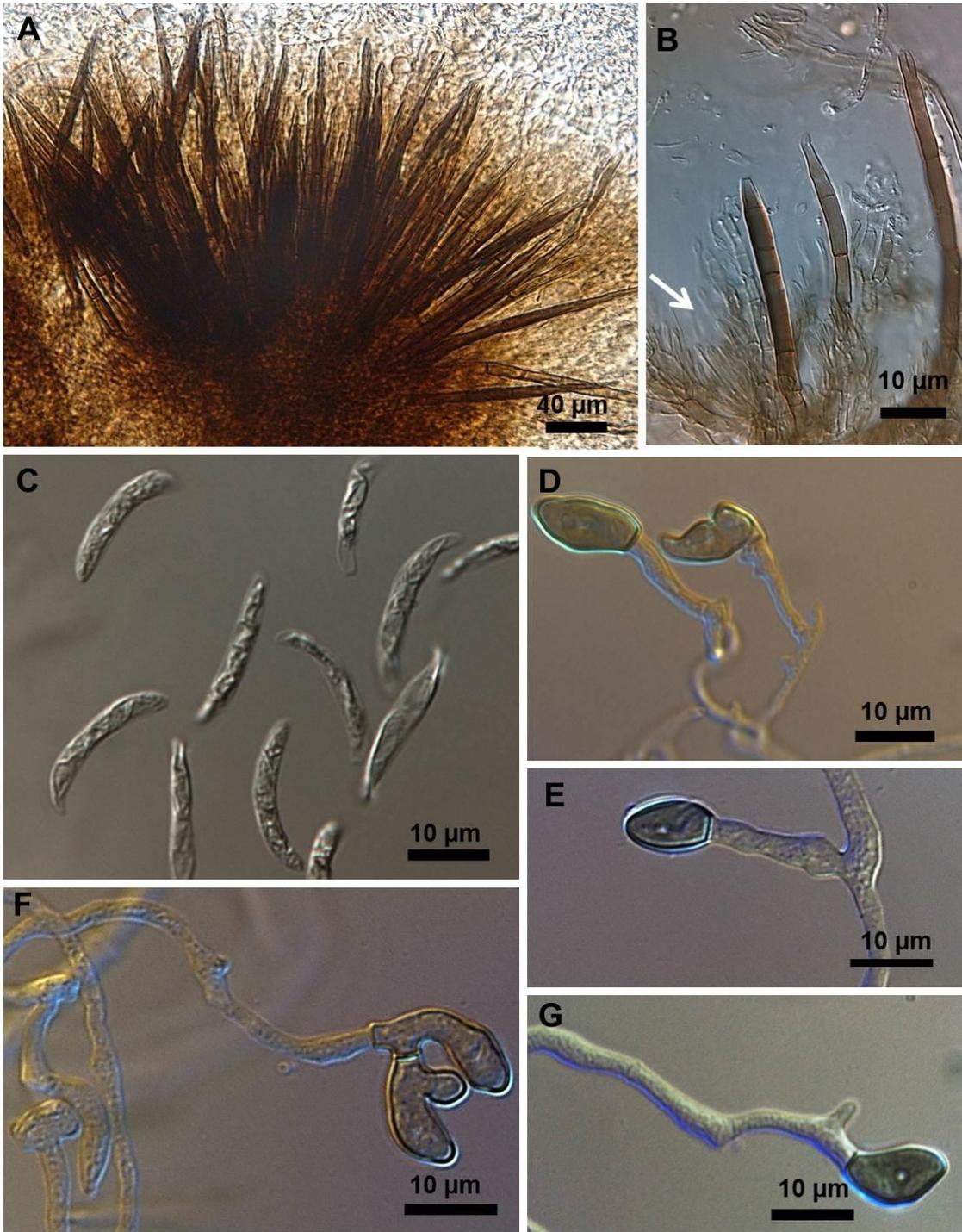


FIGURA 6. *Colletotrichum truncatum*, isolado 6.1MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. A, Estroma setoso. B, Célula conidiogênica formada em esporodóquio contida no estroma setoso. C, detalhes dos conídios E-G, Apressórios de formato variado.

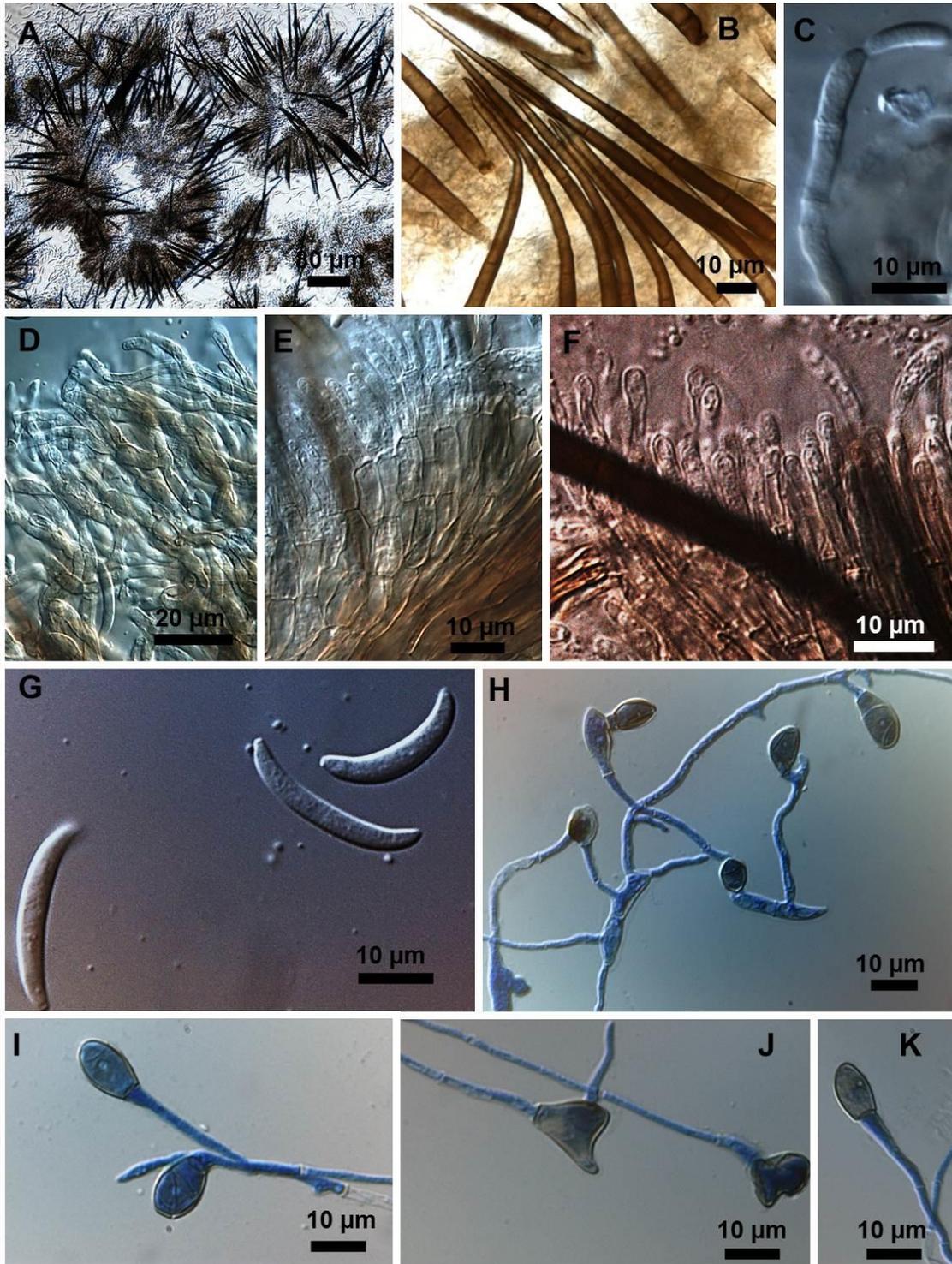


FIGURA 7. *Colletotrichum truncatum*, isolado 11A2MM, obtido de plantas de soja naturalmente infectada e fotografado em microscopia ótica. **A.** Estroma setoso. **B,** Detalhes das setas. **C,** Célula conidiogênica fialídica portando um conídio. **D,** Massa de conidióforos **E,** conidióforo septados, alguns com células conidiogências. **F,** Grupo de células conidiogências. **G,** conídios. **H-K,** Apressórios na extremidade de tubos germinativos.

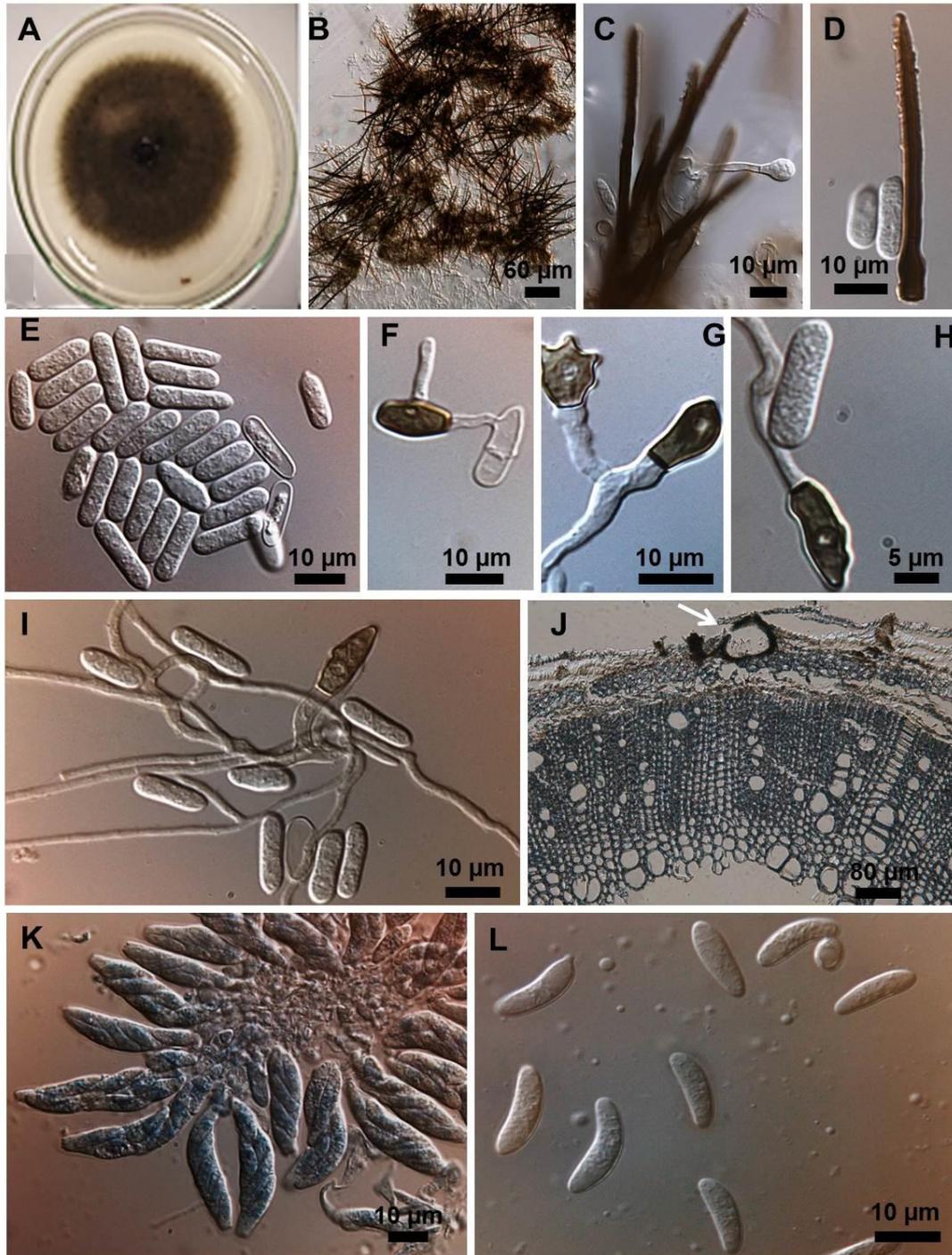


FIGURA 8. *Colletotrichum cliviae* isolado I5H visto em cultura e colonizando folha de Taboa (*Typha domingensis*) obtido de plantas de soja naturalmente infectadas. **A.** aspecto da colônia. **B.** Estroma setoso. **C.** Detalhes das setas. **D.** Detalhes de uma seta verrugulosa. **E.** Massa de conídios. **F.** Conídio germinado dando origem a apressório marrom escuro formando tubo de penetração. **G-H.** Apressórios de formato variado. **I.** Hifas e conídios. **J.** Ascoma Peritecióide suepidérmico em folha de Taboa autoclavadas. **K** Conjunto de ascos típicos de glomerella. **L,** Grupo de ascósporos.

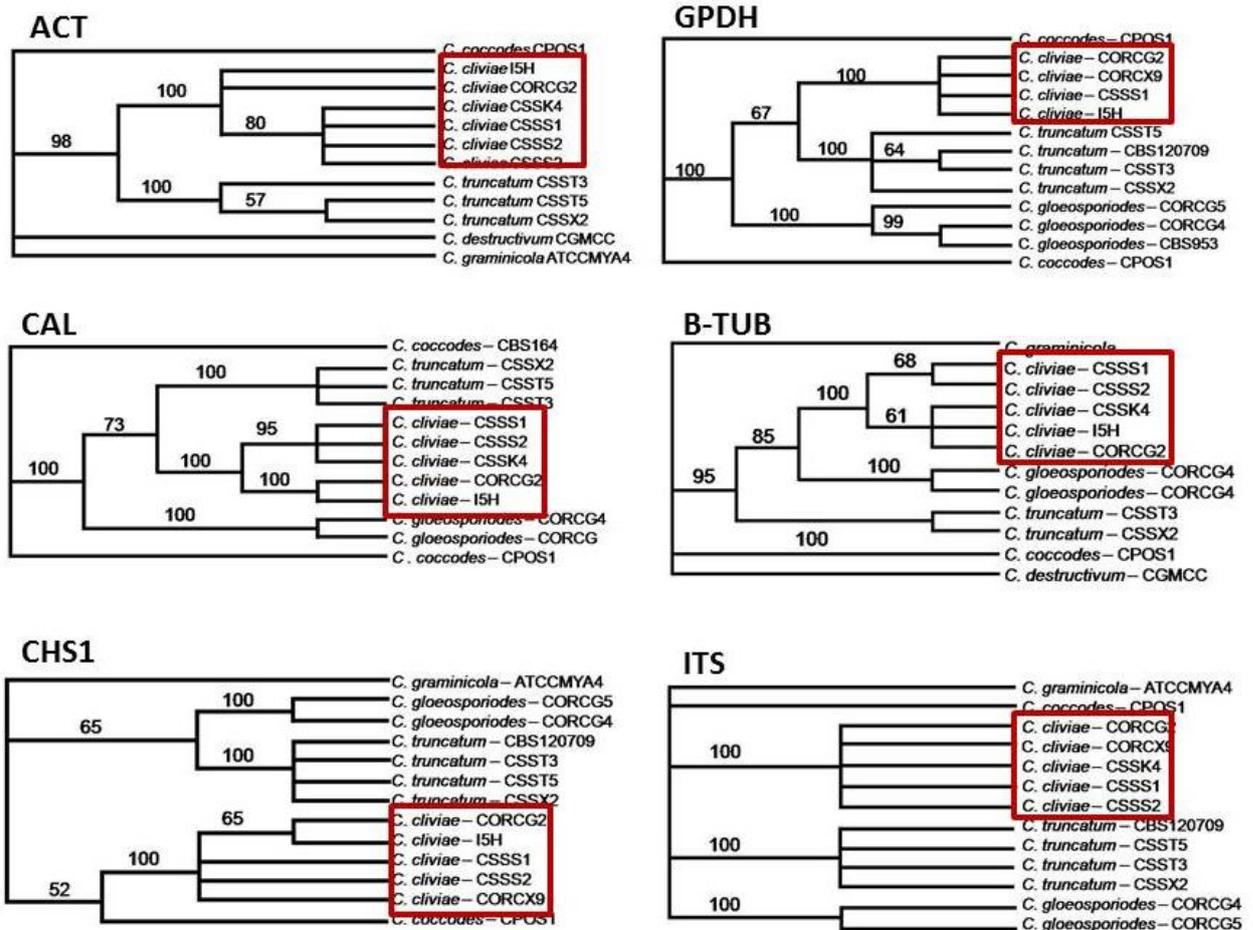


Figura 9 – Cladograma consenso obtida pela análise de máxima parcimônia a partir das sequências da região ACT, GPDH, CAL, β -TUB, CHS1 (CHS1-79F CHS1-354R) e ITS de *Colletotrichum* sp. associados a soja.

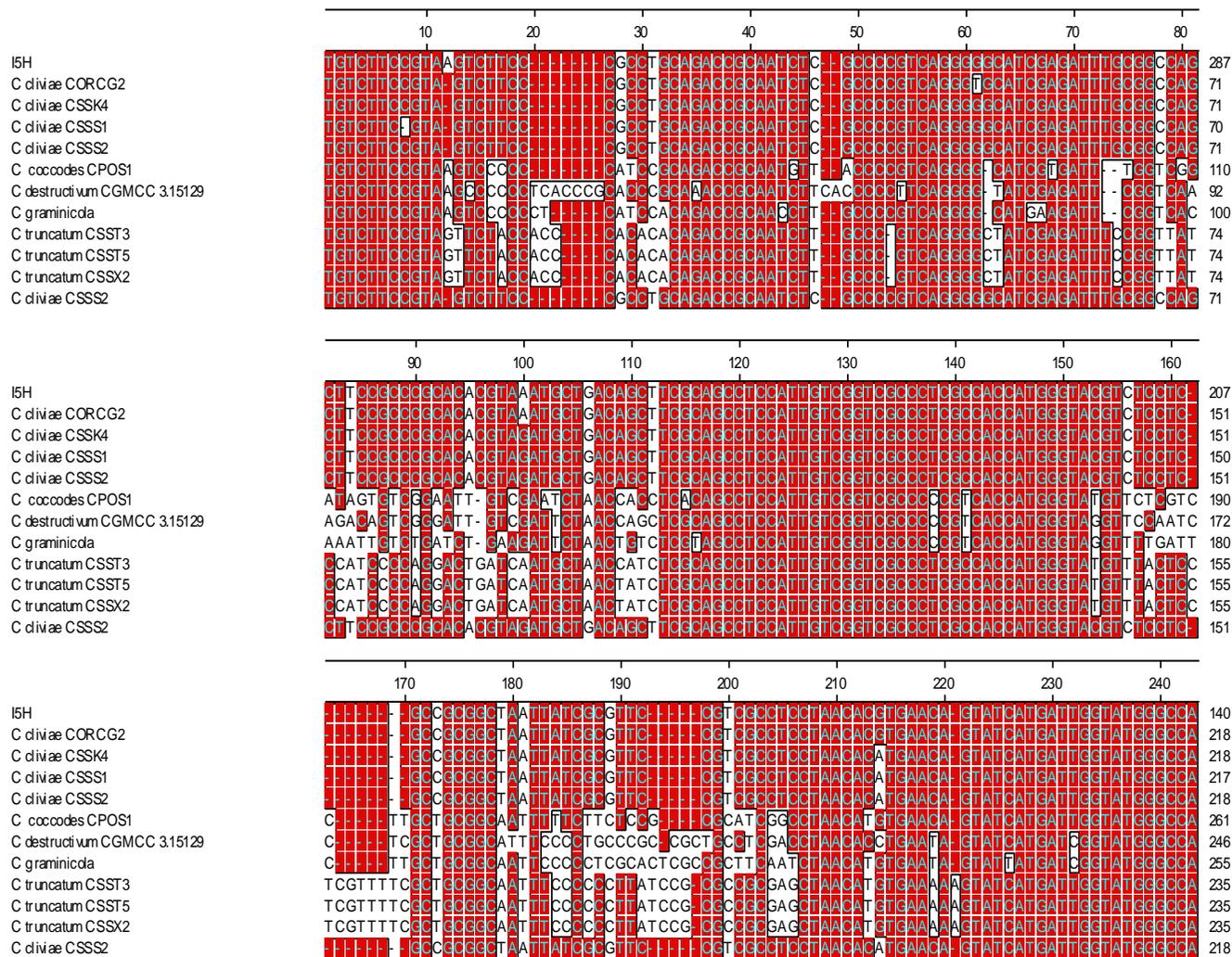


Figura 10 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica actina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum cliviae*, *C. coccodes*, *C. destructivum*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, associados a cultura da soja.

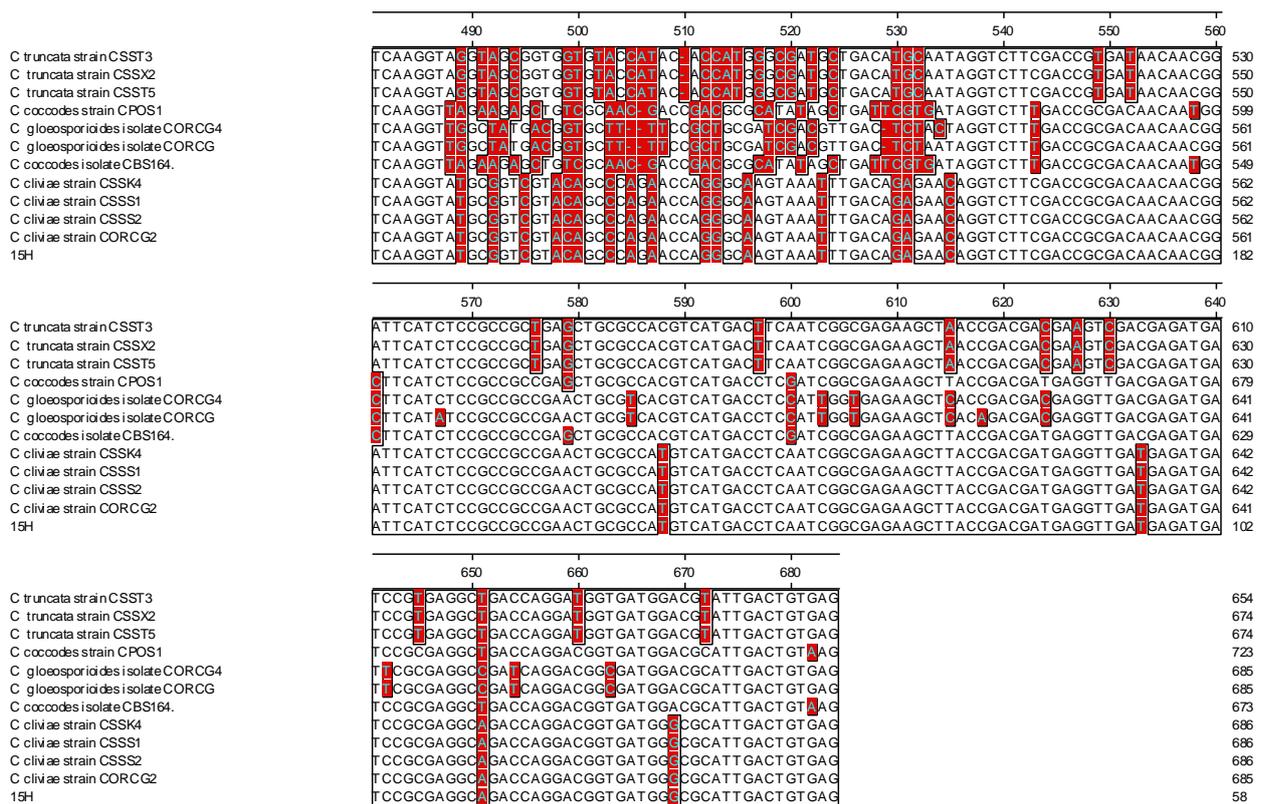


Figura 11 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica calmodulina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. cliviae*, I5H associados a cultura da soja. UnB:2014

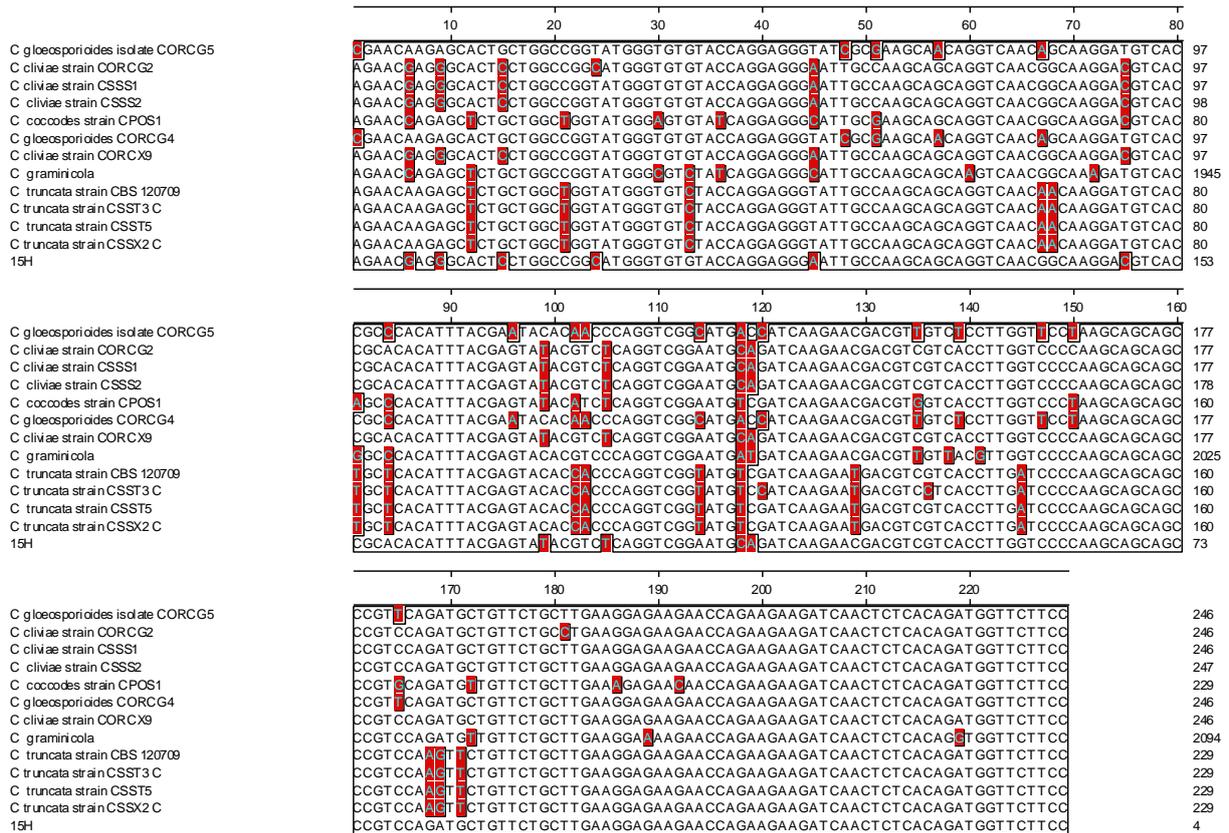


Figura 12 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica CHS1, entre os diversos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. cliviae*, *C. coccodes*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, I5H associados a cultura da soja.UnB:2014

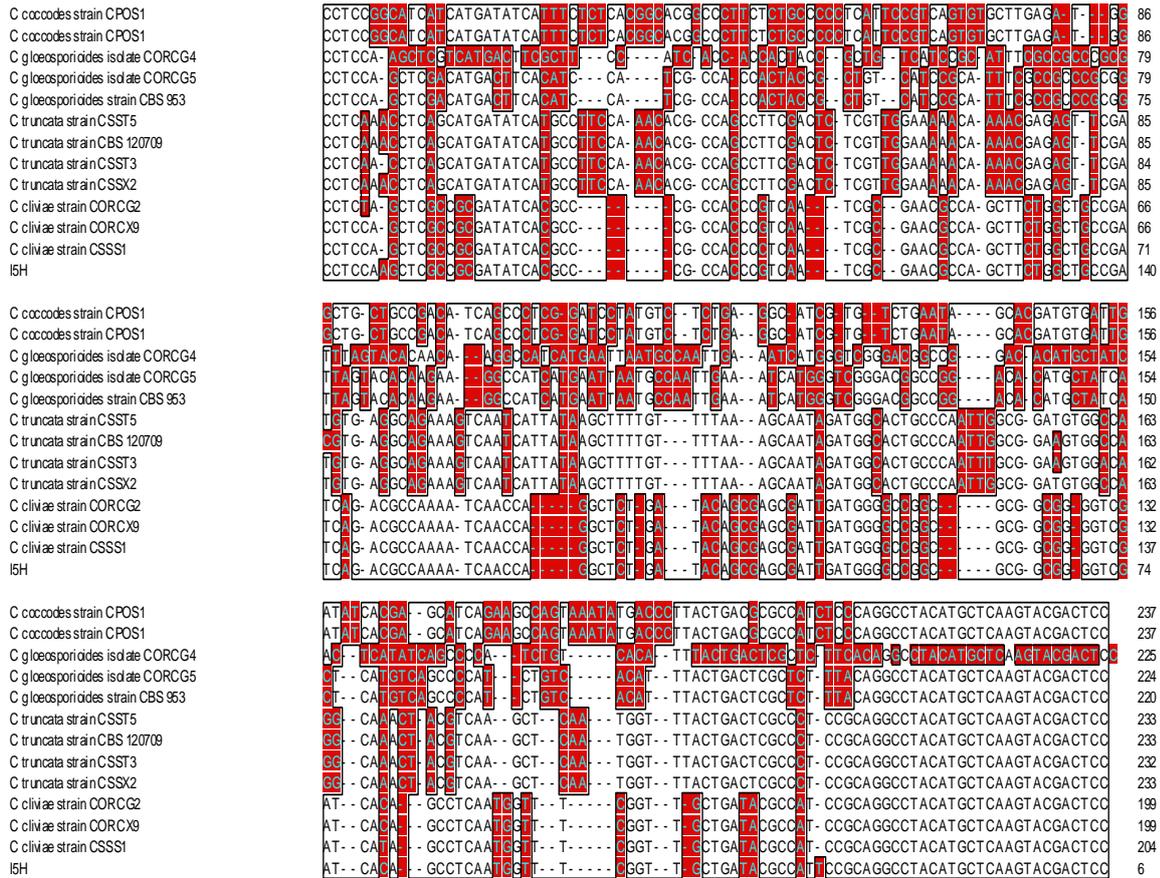


Figura 13 – Comparação por alinhamento de sequências de DNA da região gênica que codifica GPDH, entre os diversos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. cliviae*, *C. coccodes*, *C. graminicola* e *C. truncatum*, associados a cultura da soja. UnB:2014

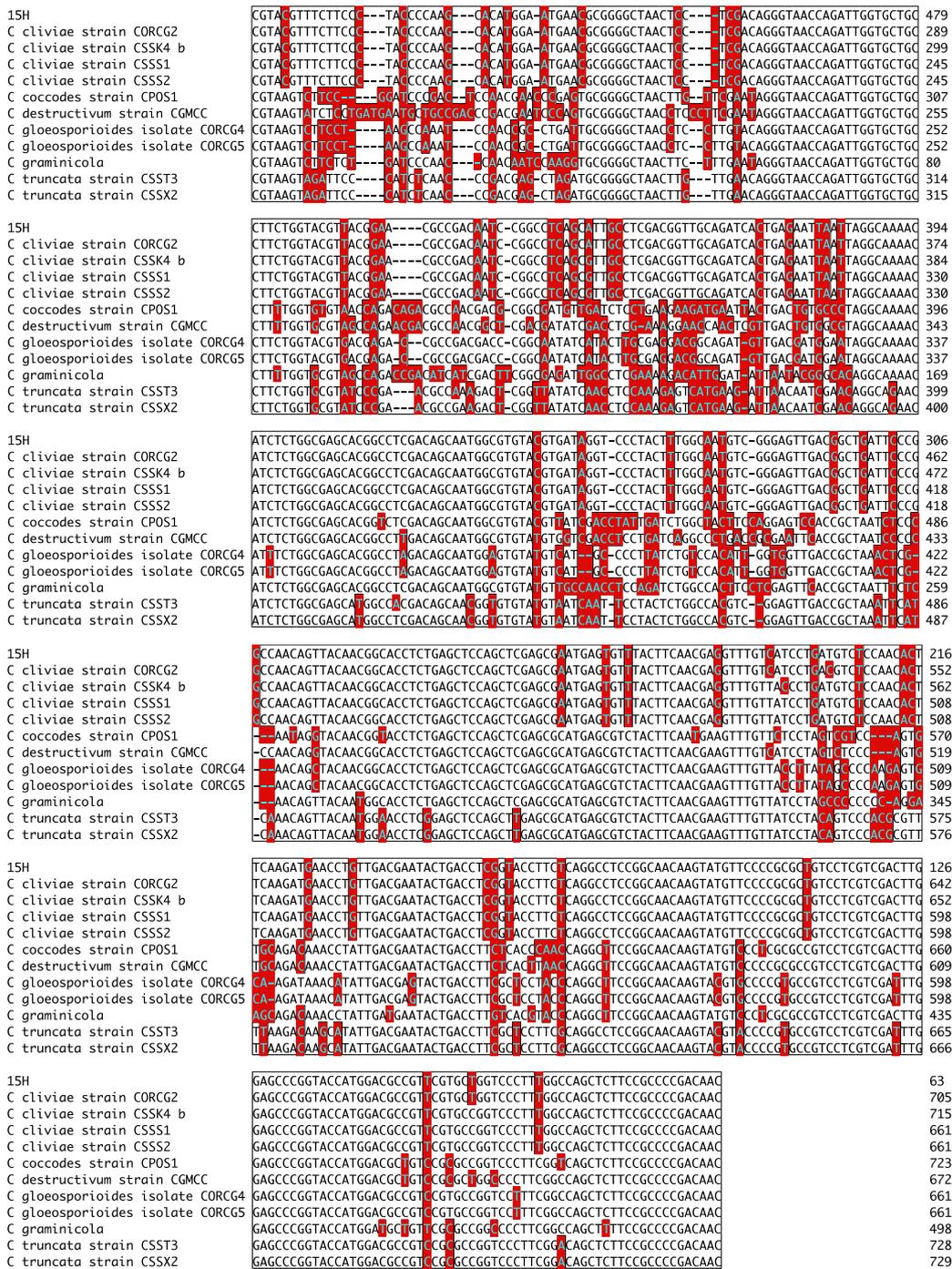


Figura 15 – Comparação por alinhamento de sequencias de DNA da região gênica que codifica β -tubulina, entre os diversos isolados de *Colletotrichum cliviae*, *C. coccodes*, *C. destructivum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, 15H, associados a uma cultura da soja.UnB:2014

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE FUNGICIDAS E PERDAS DE PRODUTIVIDADE CAUSADAS PELA ANTRACNOSE DA SOJA

RESUMO

A antracnose, causada por principalmente por *Colletotrichum truncatum*, ocorre em qualquer fase da cultura da soja. Os prejuízos, relacionados a doença, não foram ainda quantificados de forma sistemática no campo. O presente trabalho apresenta uma avaliação da eficácia de fungicidas no controle da antracnose da soja e uma estimativa das perdas de produtividade associadas à doença. Foram conduzidos dois ensaios em área comercial no município de Alvorada, TO em duas safras consecutivas, 2010/2011 e 2011/2012. Sendo os plantios realizados na segunda quinzena de novembro, com a cultivar M-Soy 9144 RR. Foram realizadas duas aplicações, a primeira no estágio R1/R2 e a segunda 20 dias após a primeira (R5.2), com volume de aplicação de 200 L ha⁻¹, pressurizada com CO₂ com pressão de 40lb, bico tipo leque em barra de 6 bicos. Os tratamentos foram: Clorotalonil, Trifloxistrobin + Ciproconazol + Carbendazin, Trifloxistrobin + Protioconazol, Trifloxistrobin + Ciproconazol, Trifloxistrobin + Tebuconazole, Piraclostrobin + Epoxiconazol, Picoxistrobin + Ciproconazol, Picoxistrobin + Tebuconazol + Carbendazin, Azoxistrobin + Ciproconazol e a testemunha não pulverizada. Os tratamentos Picoxistrobin + Tebuconazol + Carbendazin e Picoxistrobin + Ciproconazol foram avaliados apenas no segundo ensaio. O número total de vagens e o número de vagens infectadas foram determinados no estágio R6. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições, e parcelas de 18 m² (seis linhas de seis metros) e 10 tratamentos. Os resultados foram submetidos à análise de variância e separação de médias (Tukey, 5%). Na safra 2010/2011, apenas o tratamento Azoxistrobin + Ciproconazol apresentou menores índices de incidência da doença do que a testemunha, não diferindo dos demais tratamentos. Na safra 2011/2012 não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e a testemunha. As produtividades variaram entre 3.288 e 3.708 Kg ha⁻¹ nas testemunhas e máximos de 3.966 e 4.110 Kg ha⁻¹ nas parcelas tratadas, respectivamente em 2010/2011 e 2011/2012. Foram detectadas fortes correlações negativas entre a produtividade e a incidência da antracnose ($r = 0,8485$ e $r = 0,8133$, na primeira e segunda safras, respectivamente). Análise de regressão entre a incidência da doença e produtividade indicou que a cada 1% de incremento da doença, cerca de 90 Kg de soja são perdidos por hectare. Conclui-se que a antracnose é responsável por perdas significativas de produção e que o controle químico é insuficiente como único método de controle, embora possa compor uma estratégia de manejo integrado da doença.

Palavras-chave: *Colletotrichum truncatum*, *Glycine max*, antracnose, soja, controle químico, perdas de produção

ABSTRACT

Yield losses and fungicide effects on the control of soybean anthracnose

Anthracnose, caused mainly by *Colletotrichum truncatum*, occurs in any stage of the soybean crop. Yield losses, although expressive, have not been quantified systematically in the field. This work presents an evaluation of the agronomic efficacy of fungicides for the control of soybean anthracnose and of the yield losses associated to the disease. Two trials were carried out in commercial fields in the Alvorada county, state of Tocantins, Brazil, in two consecutive seasons, 2010/2011 and 2011/2012. Plantings were done in the second quarter of November, with cv. M-Soy 9144 RR. Experimental design was randomized complete block, with four replicates and experimental plots of 18 m² (six 6-m lines). Two foliar applications were performed, the first, at the R1/R2 stage and the second 20 days later, at stage R5.2, employing CO₂-pressurized equipment and a volume of 200 L ha⁻¹. The following products were evaluated: Chlorotalonil, Tryfloxistrobin + Cyproconazole + Carbendazin, Tryfloxistrobin + Prothioconazol, Tryfloxistrobin + Cyproconazole, Tryfloxistrobin + Tebuconazole, Piraclostrobin + Epoxiconazole, Picoxystrobin + Cyproconazole, Picoxystrobin + Tebuconazole + Carbendazin, Azoxystrobin + Cyproconazole, and a non-treated control. Treatments Picoxystrobin + Tebuconazole + Carbendazin and Picoxystrobin + Cyproconazole were evaluated only in the second trial. Total pod number and number of infected pods were determined at the R6 stage. Results were submitted to analysis of variance and mean separation (Tukey, 5%). In the 2010/2011, only treatment Azoxystrobin + Cyproconazole had significantly lower disease incidence than the control plots, and did not significantly differed from the other six treatments. In the 2011/2012 season there were no significant differences among treatments and the control. Grain yield varied between 3,288 and 3,708 Kg ha⁻¹ in the controls and maxima of 3,966 and 4,110 Kg ha⁻¹ in treated plots, respectively in 2010/2011 and 2011/2012. Strong negative correlations were detected between grain yield and anthracnose incidence ($r = 0.8485$ and $r = 0.8133$) in the first and second seasons, respectively. Regression analysis between disease incidence and yield, indicated that for each 1% increment in the disease, c. 90 Kg of soybean grain are lost per hectare. We conclude that anthracnose is responsible for significant losses of the soybean crop and that chemical control is insufficient as the sole control method, although it may compound an integrated disease management strategy.

Key words: *Colletotrichum truncatum*, *Glycine max*, anthracnose, soybean, chemical control, yield loss

1-INTRODUÇÃO

A contínua evolução da sojicultura nacional, incluindo a adoção de novos materiais genéticos, a expressiva área cultivada e a incorporação de novas regiões produtoras, a maior parte em monocultura e semeadura direta, afeta a prevalência e a intensidade das doenças. Dentre essas, destaca-se a antracnose, cujo agente causal em soja é geralmente delimitado no táxon *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore. A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil 1961 no Rio Grande do Sul (Barros, 2008) e causa redução de estande, redução da qualidade da semente e reduções estimadas de produtividade de 16-26% nos Estados Unidos, 30-50% na Tailândia, podendo alcançar até 100% no Brasil e na Índia (Hartman *et al*, 1999). Desde a década de 1980 existem registros de que a doença é prevalente na região do Cerrado, causando danos elevados à cultura da soja (Araújo *et al.*, 1988). A antracnose causa danos significativos onde prevalecem condições climáticas favoráveis a epidemias durante a safra, tais como temperaturas superiores a 25 °C e duração de molhamento foliar maior que 24 h, são (Embrapa, 2008). Isso ocorre principalmente na região Central e Norte do Brasil.

Outras doenças foliares importantes na cultura da soja incluem a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), o oídio (*Erysiphe difusa*), a mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), a mela (*Rhizoctonia solani*) e as doenças de final de ciclo como a mancha parda (*Septoria glycines*), mancha olho de rã (*Cercospora sojina*) e crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*). Frente aos elevados e recorrentes danos associados à ferrugem asiática, esta tem recebido maior atenção nos estudos de manejo, assim como tem recebido prioridade na definição de programas de controle com fungicidas. Estes programas nem sempre contemplam as particularidades das outras doenças, dentre elas a antracnose. Entretanto, muitos relatos recentes do aumento da importância da antracnose nas regiões Norte e Centro-Oeste indicam

que os produtos que compõem o programa de controle químico de doenças fúngicas em soja não são eficazes para antracnose (Dias *et al.*, 2012; Souza, 2009). Estimativas sistemáticas de perda de produtividade da cultura no estado do Tocantins, onde a prevalência da antracnose também é elevada (Dias *et al.*, 2011b, 2012), ainda não foram empreendidas.

As aplicações de fungicidas em soja visam principalmente o controle da ferrugem e são mais frequentes na fase reprodutiva da cultura, exceto quando a ferrugem ocorre mais cedo. Já a antracnose tem como suas principais fontes de inóculo as sementes infectadas e os restos culturais, sendo uma das primeiras doenças a se estabelecer na cultura, com aparecimento de lesões em cotilédones. Estudos de campo, conduzidos em áreas comerciais em Planaltina, DF registraram incidência média de 24% de lesões típicas de antracnose em cotilédones (Dias *et al.*, 2011). Segundo Yorinori (2000), *C. truncatum* e outros fungos fitopatogênicos estão associados com a parte aérea da soja muito antes do aparecimento de sintomas da doença. Além dos sintomas em hastes e folhas, um dos principais prejuízos causados pela doença é observado no estágio reprodutivo da cultura, culminando no aborto das vagens, que se tornam retorcidas e se desprendem das plantas, com reflexos diretos na produtividade (Hartman *et al.*, 1999).

Dentre as medidas recomendadas para redução da incidência da antracnose nas condições dos cerrados estão a rotação de culturas, maior espaçamento entre linhas, população adequada de plantas, tratamento químico de sementes e manejo adequado do solo, principalmente, com relação à adubação potássica (Embrapa, 2008). Experimentalmente foi observada a eficiência de controle com alguns fungicidas do grupo dos benzimidazóis isoladamente ou em mistura com triazóis (Embrapa, 2008). Entretanto, relatos de perdas significativas de produção devidos à antracnose continuam a ser frequentemente registrados em soja, especialmente nas regiões Norte e Centro-Oeste. Estudos recentes indicaram limitada eficácia do controle químico desta doença (Dias *et al.*, 2011a; Souza, 2009).

Diante do presente cenário de escassez de informações detalhadas sobre o controle químico e das perdas de produção devidas à doença, empreendeu-se neste trabalho: (a) uma avaliação de eficácia dos principais fungicidas atualmente empregados no manejo do complexo de doenças da soja para o controle da antracnose, e (b) uma estimativa das perdas causadas pela doença em condições de cultivo comercial da cultura.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois ensaios de campo, em área de plantio comercial de soja, sob sistema de plantio direto, no município de Alvorada-TO, situada na latitude 12°28'04,8''S longitude 49°05'30,6''W, a uma altitude de 290m, por duas safras consecutivas, 2010/2011 e 2011/2012.

Em ambos os ensaios o plantio foi realizado na segunda quinzena de novembro e a cultivar escolhida foi a M-Soy 9144 RR, devido a mesma apresentar susceptibilidade a antracnose em vagens, observada em safras anteriores e ser a cultivar mais plantada no Estado do Tocantins. Os tratamentos culturais seguiram as recomendações técnicas para a cultura (Embrapa, 2008). O espaçamento foi 0,5m entre linhas, com 13 plantas por metro linear.

Foram realizadas duas aplicações de fungicidas, a primeira no estágio fenológico R1 (Fehr & Caviness, 1977), e a segunda aplicação 20 dias após a primeira. As aplicações foram feitas com pressurizador a CO₂, acoplado a uma barra com seis bicos, tipo leque duplo, espaçados de 0,5m, pressão de 40lb e volume de aplicação de 200 L ha⁻¹.

Nove tratamentos foram avaliados quanto à eficácia no controle da antracnose. Algumas formulações foram aplicadas com adição de adjuvantes na forma de óleo vegetal (Aureo, Bayer CropScience) ou óleo mineral (Nimbus, Syngenta Proteção de Cultivos e Assist, Basf S.A.). Os tratamentos, as respectivas dosagens e adjuvantes (quando adicionados) foram: Trifloxistrobin + Tebuconazole (Nativo + Aureo) 0,5 L/ha; Trifloxistrobin + Tebuconazole + Carbendazim (Nativo + Derosal + Aureo) 0,5 + 1,0 L/ha; Azoxistrobin + Ciproconazol (PrioriXtra + Nimbus) 0,3 L/ha; Picoxistrobin + Ciproconazol (Approach Prima + Aureo) 0,3 L/ha; Piraclostrobin + Epoxiconazol (Opera + Assist) 0,5 L/ha; Trifloxistrobin + Ciproconazol (Sphere Max + Aureo) 0,3 L/ha, Chlorotalonil (Daconil) 1,5Kg/ha,

Trifloxistrobin + Protioconazol (Fox + Aureo) 0,3 L/ha; Picoxistrobin + Tebuconazol + Carbendazin (Horos + Bendazol) 0,5 + 0,8 L/ha. Os tratamentos Picoxistrobin + Ciproconazol (Approach Prima) e Picoxistrobin + Tebuconazol + Carbendazin (Horos + Bendazol) foram avaliados apenas no segundo ensaio (safra 2011/2012). È importante ressaltar que os fungicidas mencionados são recomendados para o controle da ferrugem asiática

No estágio R6/R7, foram avaliadas 10 plantas coletadas ao acaso por unidade experimental. Nas avaliações foram consideradas o número total de vagens por planta, e o número de vagens infectadas para determinação da porcentagem de incidência da antracnose em vagens. A produtividade da cultura em função do controle químico foi determinada em 5 m² equivalente à três linhas centrais de cada parcela, eliminando-se 0,5 m da bordadura.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e cada repetição foi constituída por uma área de 18 m² constituída por seis linhas de seis metros. As análises estatísticas foram efetuadas com emprego do programa SISVAR (Ferreira, 2008), o teste de média aplicado foi o Tukey 5% e as regressões foram efetuadas no programa Excell.

As condições climáticas de temperatura e precipitação pluviométrica, referentes aos períodos de condução dos ensaios nas duas safras consecutivas, 2011 e 2012, foram cedidas pelo Inmet e encontram-se representadas na Figura 1.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Incidência da doença e perdas de produtividade em campo, safra 2010/2011

Na safra 2010/2011, 16,3% das vagens das parcelas não tratadas apresentaram sintomas de antracnose. Dentre as parcelas tratadas com fungicidas, a porcentagem de vagens infectadas variou entre 9,5 e 15,5 % (Figura 2A). Apenas o tratamento com Azoxystrobina + Ciproconazol (PrioriXtra), com 9,5% de incidência diferiu significativamente da testemunha ($p < 0,05$), não se separando dos demais tratamentos. Mesmo com redução de 41,7% na incidência da antracnose em vagens, tendo a testemunha como padrão, a incidência de antracnose em vagens, no melhor tratamento pode ainda ser considerada relativamente alta.

A produtividade na safra 2010/2011 variou entre 3.282 e 3.966 Kg ha⁻¹. Apenas o tratamento Azoxystrobina + Ciproconazol (PrioriXtra) diferiu significativamente ($p < 0,05$) da testemunha, não se separando dos demais tratamentos (Figura 3A). Embora a maioria dos tratamentos não tenha se separado da testemunha, foi detectada uma forte correlação negativa entre a produtividade e incidência da doença, com coeficiente de Pearson $r = 0,8485$ (Figura 4A). As parcelas tratadas com Azoxystrobin + Ciproconozol promoveram um ganho médio de 678 Kg ha⁻¹, tendo a testemunha como padrão. Não foi observada incidência significativa de outras doenças, inclusive no tratamento não pulverizado.

3.2-Incidência da doença e perdas de produtividade em campo, safra 2011/2012

Na safra 2011/2012 a porcentagem de vagens infectadas nas parcelas não tratadas com fungicidas foi semelhante à do ano anterior, com incidência média de 15,6%. Não foram

detectadas diferenças significativas de incidência da doença entre os tratamentos e a testemunha na safra 2011/2012. No entanto, incidência de vagens com sintomas na testemunha foi 27% superior à média dos demais tratamentos, que variou entre 10,7 e 13,3 % (Figura 2B). De maneira análoga ao que foi observado na safra 2010/2011, a incidência de antracnose pode ainda ser considerada elevada, mesmo se considerando o tratamento com menor incidência de vagens doentes (Approach Prima, 10,7%).

Na safra 2011/2012, a produtividade variou entre 3.282 Kg ha⁻¹ (testemunha) 3.966 Kg ha⁻¹ e os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, registrou-se um incremento na produtividade de 402 Kg ha⁻¹, considerando-se a maior média obtida e tendo a testemunha como padrão (Fig. 3B). Novamente, confirmou-se a correlação negativa entre a incidência da antracnose nas vagens e a produtividade nas condições avaliadas ($r = 0,8133$, Figura 4B). Não houve incidência significativa de outras doenças durante o segundo ensaio.

No que se refere aos grupos químicos, os melhores tratamentos fungicidas foram aqueles combinando princípios ativos triazóis e estrobirulinas, tanto na redução da incidência da doença (Figura 2A,B), quanto no aumento da produtividade (Figura 3A,B).

O presente estudo indica claramente que o controle químico da antracnose nas condições avaliadas atingiu eficiências máximas de apenas 34% no primeiro ensaio e de 31% no segundo. No entanto, mesmo com níveis relativamente modestos de controle, o emprego dos fungicidas contribuiu com incrementos na produtividade da cultura de maneira considerável com ganhos de até 678 Kg ha⁻¹ no primeiro ensaio e de até 402 Kg ha⁻¹ no segundo em relação à testemunha não pulverizada.

As correlações negativas entre a produtividade e a incidência da antracnose nas vagens mostraram, de forma clara, que a cada 1% de aumento de incidência da doença em vagens, na

faixa entre 9 e 17 % de incidência, cerca de uma saca e meia (90 a 91 Kg) de soja são perdidos por hectare (Figura 4A,B).

Os resultados de dois anos de ensaios conduzidos em condições de lavouras comerciais em campo indicam que a antracnose é um importante fator limitante da produção de soja no Estado do Tocantins, e provavelmente em áreas com condições climáticas semelhantes às prevalentes na região Centro-Norte do Brasil, onde os relatos de perdas elevadas são frequentes. A ausência de incidência significativa outras doenças em campo no Tocantins por dois anos consecutivos comprova a importância da antracnose na cultura da soja na região de cerrado do Centro-Norte do país, reduzindo a produtividade de forma expressiva. A semelhança entre as condições ambientais prevalentes em ambos os experimentos (Figura 1), favoreceram a doença e são representativas da época de safra no Estado do Tocantins. Desta forma, os resultados de controle foram semelhantes nos dois ensaios e o efeito do ambiente foi mínimo.

Estes resultados demonstram a necessidade do manejo adequado da antracnose da soja, pelo seu potencial na redução da produtividade nas condições de cerrado do Centro Norte do país, cuja época de plantio é caracterizada por períodos chuvosos e altas temperaturas, condições ideais para ocorrência da doença. Os resultados aqui relatados também esclarecem o papel potencial do controle químico como componente do manejo da doença. Mesmo com níveis parciais de controle, a aplicação de fungicidas pode ser compensatória, sendo uma das estratégias no manejo da doença, a ser implementada em conjunto com outras práticas culturais como rotação de cultura, adubação equilibrada, população de plantas adequadas e sementes de boa qualidade sanitária.

A relativamente baixa eficiência dos produtos testados no controle desta doença pode ser atribuída a diferentes fatores. Um dos motivos pode estar relacionado com o período de

infecção da planta, que possivelmente ocorre muito antes das pulverizações, que geralmente são realizadas no estágio reprodutivo (R). Resultados obtidos em ensaios conduzidos em campo por Souza (2009) em Passo Fundo, RS nas safras 2005/2006 e 2006/2007, mostram controle inferior a 50% da antracnose, o que ele atribuiu em parte à reduzida ação curativa dos fungicidas. Outra causa de baixa eficiência pode estar associada à baixa sensibilidade do patógeno aos princípios ativos testados, ou da variabilidade das populações de *Colletotrichum* associadas à antracnose da soja, que pode envolver mais de uma espécie (Hartman et al., 1999).

Segundo Klingelfuss & Yorinori (2000), *Colletotrichum* está presente nos órgãos aéreos da planta muito antes do aparecimento dos sintomas da antracnose. Por isso, quando aplicações de fungicidas são realizadas após o aparecimento de sintomas, não há efeito na redução da doença. Os autores acima mencionados não observaram efeito da aplicação do fungicida Difenconazol sobre a antracnose da soja. Desta forma, o reduzido efeito das aplicações fungicidas observado em campo pode também estar relacionados ao momento da aplicação, possivelmente inadequado para esse patossistema e das condições climáticas favoráveis a doença.

A antecipação da aplicação pode resultar em melhores resultados, mesmo que não atinja o nível de 80% de controle exigido pelo Ministério da Agricultura para registro de produtos fitossanitários, e deve ser motivo de novos estudos. No momento, a recomendação de pulverização para soja segue as indicações para o manejo da ferrugem asiática. Entretanto, a antracnose da soja é um patossistema complexo com muitas questões em aberto sobre o momento da aplicação de fungicidas e a necessidade de desenvolvimento de programa específico de controle nas condições de cerrado.

Com base nesse trabalho, as perdas devidas à antracnose da soja foram quantificadas de maneira sistemática no Cerrado do Centro-Norte do país, área onde atualmente se dá o maior crescimento da área plantada da cultura. Além disso, evidenciou-se que o controle químico é insuficiente para a supressão completa da antracnose, embora apresente potencial para inclusão em um conjunto de práticas integradas, combinada com outros métodos de manejo da doença.

4-CONCLUSÕES

- O controle químico, em virtude da baixa eficiência na supressão da antracnose, deve estar associado a outras práticas de manejo da cultura.
- A antracnose afeta diretamente a produção de grãos na cultura da soja.
- A antracnose é um patossistema que necessita de programas específicos de controle nas condições de cerrado.

5-REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; CUPERTINO, F.P. 1988. Antracnose da soja na região geoeconômica do Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 13:130. (Resumo).
- BARROS, G.E.G.2008 Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e Estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD. Dissertação de mestrado. 64p.
- CENTRO DE INTELIGÊNCIA DA SOJA (boletim on line). O Brasil será o maior produtor mundial de soja. (<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=17636>). Acesso 15/10/2013.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Vol. I. Brasília: Conab. 2013. Em: <http://www.conab.gov.br>
- COSTA, I.F.D. 2005. Controle de Doenças de Final de Ciclo na Cultura da Soja. (Tese doutorado, UFSM). Santa Maria, 100p.
- DIAS, M.D.; CAFÉ-FILHO, A.C; PINHEIRO, V.F. 2012. Mais Desafiadora: Antracnose da Soja. *Cultivar Grandes Culturas* 155 (abril 2012): 22-23.
- DIAS, M.D.; MIRANDA-FILHO, R.J.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO, V.F. 2011.a. Controle químico da antracnose na cultura da soja. *Tropical Plant Pathology* 36: 429. (Resumo).
- DIAS, M.D.; MIRANDA-FILHO, R.J.; CAFÉ-FILHO, A.C.; PINHEIRO,V.F. 2011b. Avaliação da incidência da antracnose em soja (*Colletotrichum truncatum*), na região Centro Oeste do Brasil. *Tropical Plant Pathology* 36: 673. (Resumo).
- DIAS, M.D.; PINHEIRO, V.F.; MARTINS, J.H. 2006. Avaliação da eficiência do controle químico da antracnose na cultura da soja. In: XXVIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Embrapa, v. 27. p. 265-266. 2006. (Resumo).
- EMBRAPA.(2008) Tecnologia de Produção de Soja Região Central do Brasil 2009 e 2010. CNPSo, Londrina, PR., 261p.

FERREIRA, D.F. 2008. SISVAR: Um programa para análise e ensino de estatística. Revista Symposium (Lavras), v.6, p.36-41

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. Ames:Iowa State University.12p. (Special Report, 80).

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. 1999. Compendium of Soybean Diseases. Fourth Edition. APS Press, Saint Paul.

KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T. 2000. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* e efeito de fungicidas sobre doenças de final de ciclo em soja. Summa Phytopathologica 26: 356-361.

SOUZA, R.T. 2009. Reação de cultivares e controle da antracnose da soja. Tese doutorado. Passo Fundo-RS. 106p

YORINORI, J.T.; KLINGELFUSS, L.H.; CAMARGO,T.V.; HENNING, A.A. 2000. Levantamento das doenças fúngicas da soja, seus impactos sobre o rendimento e aferição das atuais medidas de controle. In: EMBRAPA SOJA. Resultados de pesquisa da Embrapa soja, 1999. Londrina, p.64-69.

(1A)- 2010/2011



(1B) – 2011/2012

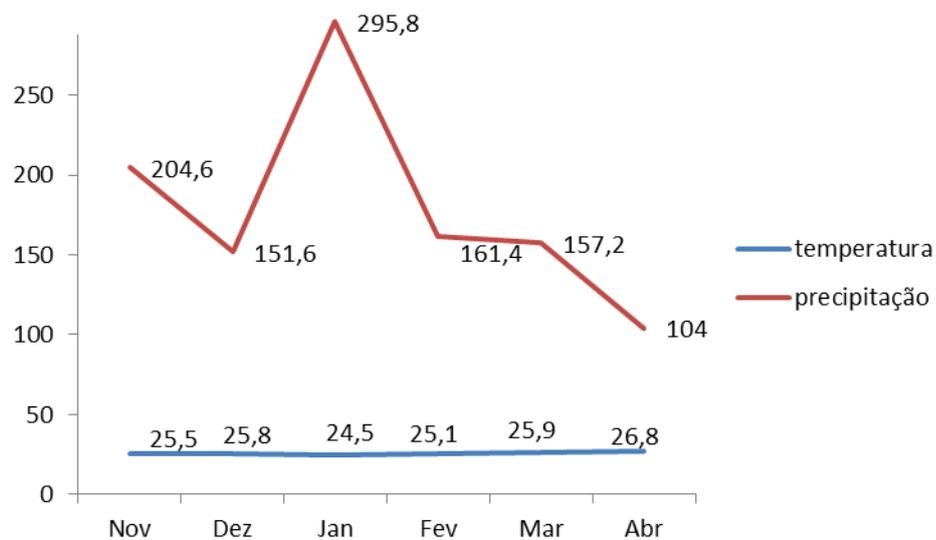


Figura 1- Médias de temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm), ocorridas nos períodos de condução dos ensaios. **1A**-condição climática do ensaio conduzido de novembro a Abril, referente a safra 2010/2011. **1B**- condição climática do ensaio conduzido de novembro a Abril, referente a safra 2011/2012.

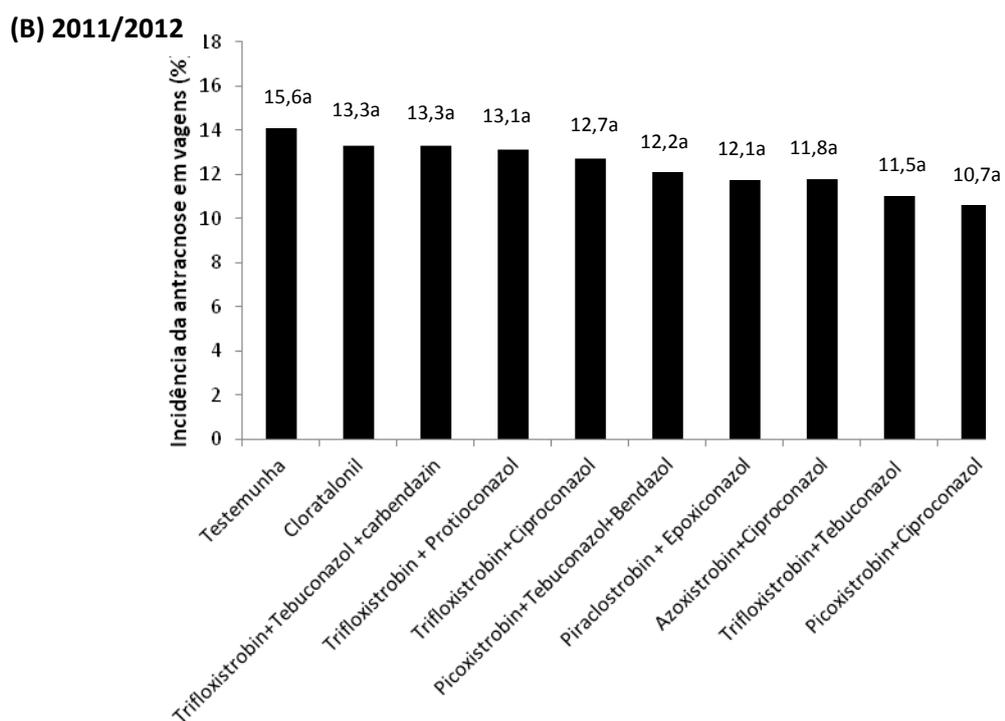
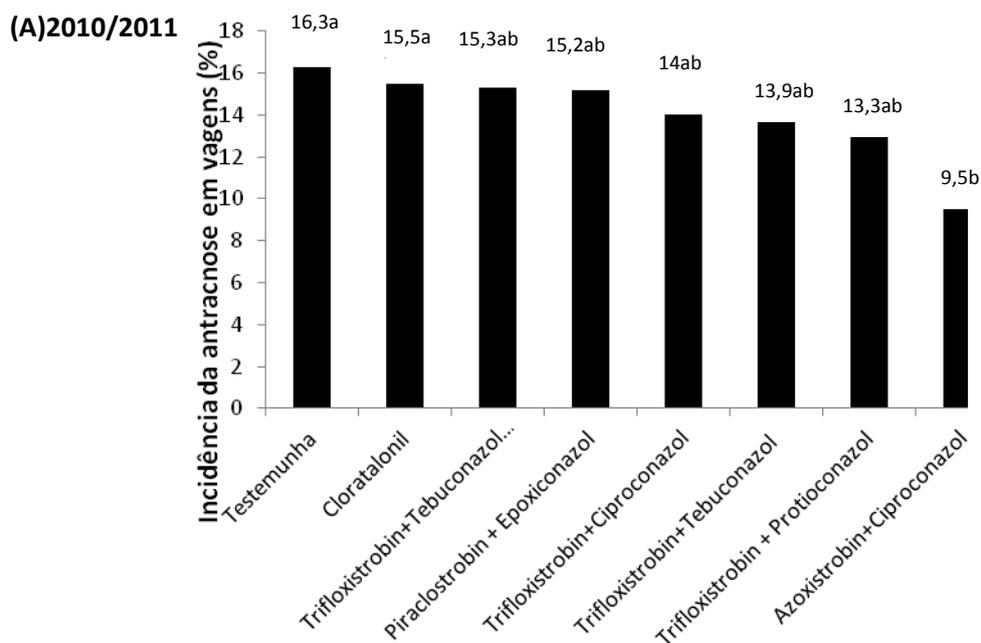
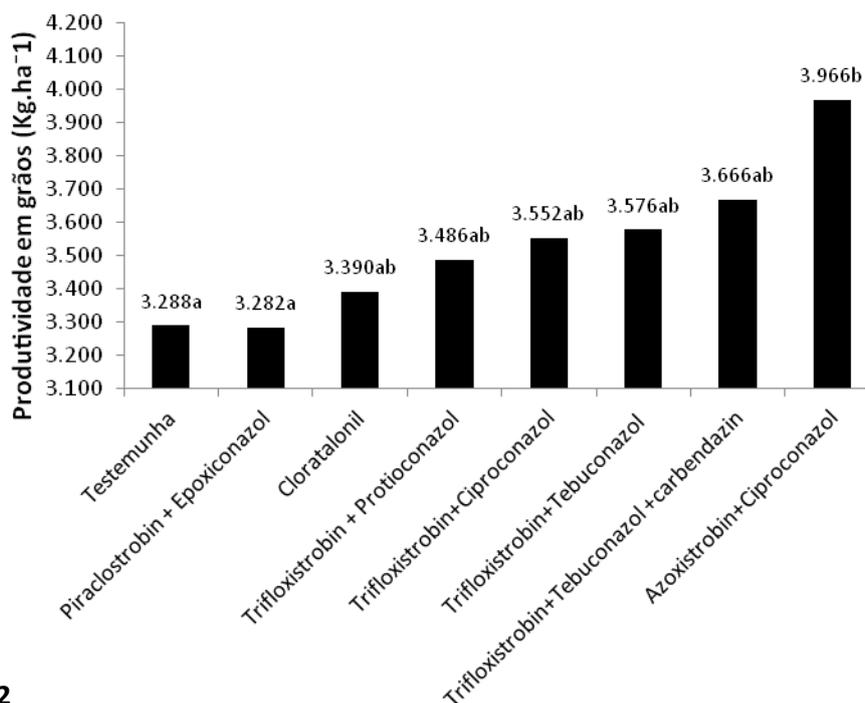


Figura 2. Porcentagem da Incidência da antracnose em vagens, em função do controle químico, safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B) no município de Alvorada, TO. UnB:2014.

(A) 2010/2011



(B) 2011/2012

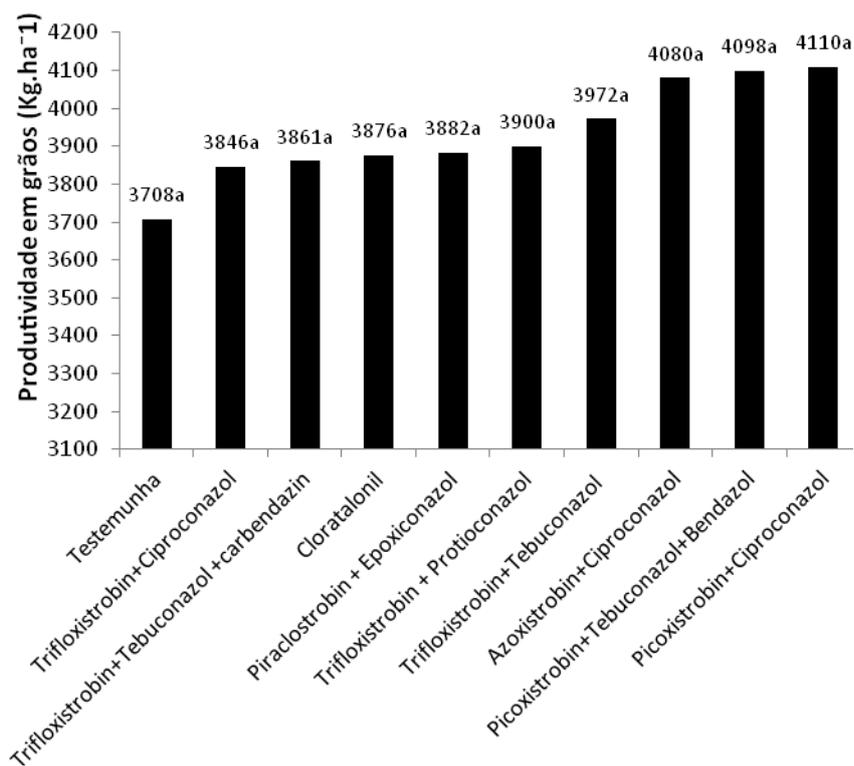


Figura 3. Produtividade da soja em função do controle químico da antracnose, safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B), no município de Alvorada, TO.

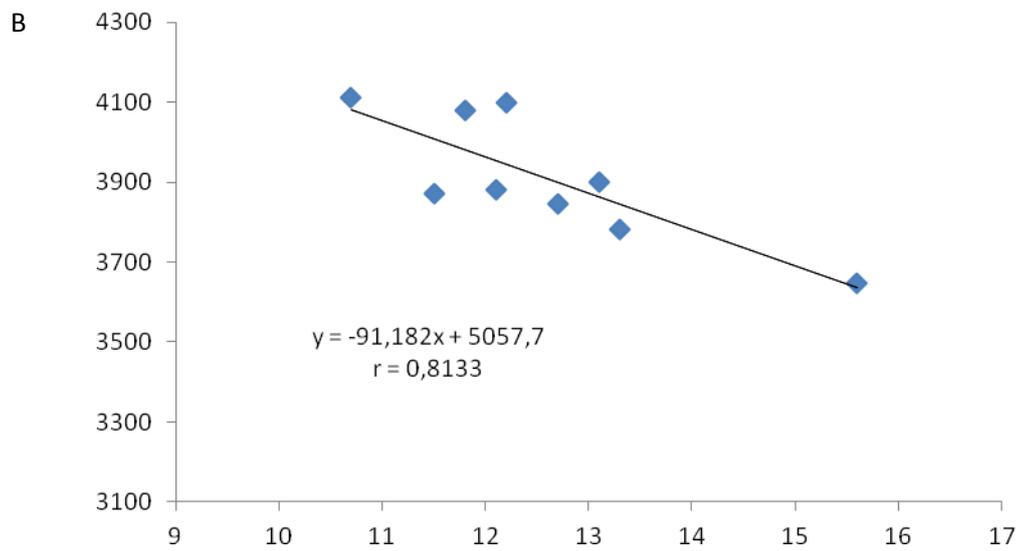
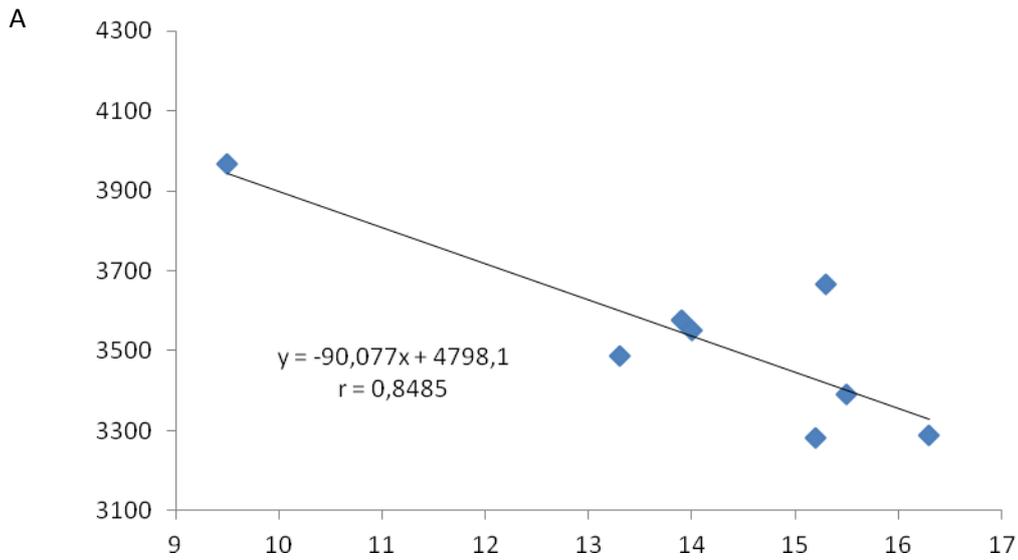


Figura 4. Correlação entre incidência da antracnose em vagens e produtividade. safra 2010/2011 (A) e 2011/2012 (B), no município de Alvorada, TO.