Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Sobrevivência de *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja, na forma de microescleródios no solo e em plantas daninhas

Ísis Tikami

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

Piracicaba
2020

Ísis Tikami
Engenheira Agrônoma/ Licenciada em Ciências Agrárias

Sobrevivência de *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja, na forma de microescleródios no solo e em plantas daninhas

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

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

Piracicaba
2020

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

Tikami, Ísis

Sobrevivência de *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja, na forma de microescleródios no solo e em plantas daninhas / Ísis Tikami. - - Piracicaba, 2020.

75 p.

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

1. *Glycine max* 2. Inóculo primário 3. Fungo fitopatogênico 4. *Digitaria insularis* 5. *Ipomoea* 5. Hospedeiros alternativos 6. Estrutura de resistência I. Título

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade de poder lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais, Renata e Auro, e às minhas irmãs, Bárbara e Maitê, por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Anselmo Arvani, pelo apoio e incentivo, pela ajuda em experimentos e por ceder uma área em meio à sua lavoura de soja para a realização de parte deste trabalho. Aos seus pais, Edna e Anselmo Joaquim, por todo apoio.

À Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz" (FEALQ), pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos que viabilizaram a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Nelson Sidnei Massola Junior, por todo apoio enquanto coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela acolhida em seu laboratório e orientação, pela amizade e prontidão em ajudar.

Aos alunos de graduação, Lucas Panciera e Victor Neves, pela amizade e ajuda essencial à realização dos experimentos, à Mariana Colli, também pela ajuda em experimentos.

À Dra. Maísa Ciampi-Guillardi, por todo apoio para a conclusão deste trabalho, pela amizade e pelo suporte fundamental às análises de genotipagem.

Ao Professor Dr. Edwin Ortega e ao Fábio Prataviera, pela ajuda com as análises estatísticas presentes neste trabalho.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, à Dra. Flávia Rogério, à Thaís Boufleur e à Renata de Castro, pela amizade e por todo o apoio para a execução deste trabalho, à Líllian Bibiano e Camila Carvalho, pela amizade e pelos ensinamentos no início do curso, ao Ricardo Feliciano pela amizade e ensinamentos, à Gressa Chinelato, Tiarla Souto e Mariana Saito por todo apoio e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e a todos os professores que já tive, pela inspiração e ensinamentos. Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, à Fabiana Wolak, pelo apoio e prontidão em ajudar, à Sílvia

Lourenço, à Dra. Maria Heloísa e ao Sr. Pedro Arthuso, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Simone Brand, ao Rodrigo Canelo e à Daniela Ribeiro pelo apoio e prontidão em ajudar.

Às minhas amigas, Lívia Barreto e Tamara Moraes, pela amizade e pela ajuda em experimentos.

Aos amigos Brena Ferneda, Andreia Erdmann e Eduardo Zavaschi, pela amizade e apoio durante o curso.

À Dra. Daniela Lobo, ao Dr. Paulo Alexandre, ao Dr. Fernando Freire e aos fisioterapeutas Cristiane Carmona, Aline Esteves e Renan Esteves, por todo amparo durante o período da realização deste trabalho.

À Professora Sílvia Molina, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos que não me acompanharam de perto, mas torceram pelo meu sucesso nesta jornada.

Muito obrigada!

"Das coisas a mais nobre é a mais justa, e a melhor é a saúde; Mas a mais doce é alcançar o que amamos."

(Inscrição de Delos,
"Ética a Nicômaco", Aristóteles)

SUMÁRIO

RESUMO....7

ABSTRACT....8

1. INTRODUÇÃO GERAL....9

REFERÊNCIAS....13

2. SOBREVIVÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA SOJA, NA FORMA DE MICROESCLERÓDIOS NO SOLO....19

RESUMO....19

ABSTRACT....19

2.1. INTRODUÇÃO....20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS....22
2.2.1. Sobrevivência de microescleródios de *C. truncatum* em condições de campo....22
2.2.1.1. Produção de microescleródios e instalação do experimento....22
2.2.1.2. Avaliação da sobrevivência....25
2.2.1.3. Testes de patogenicidade à soja....27
2.2.2. Infectividade de microescleródios de *C. truncatum* ao longo do tempo....29
2.2.2.1. Instalação do experimento....29
2.2.2.2. Avaliação da manutenção da infectividade de *C. truncatum*....30
2.2.3. Confirmação da identidade de isolados....31
2.2.4. Análise de dados....33
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO....33
2.3.1. Sobrevivência de microescleródios de *C. truncatum* em condições de campo....33
2.3.1. Infectividade de microescleródios de *C. truncatum* ao longo do tempo....43
2.3.2. Confirmação da identidade de isolados....45
2.4. CONCLUSÕES....48
2.5. REFERÊNCIAS....48

3. SOBREVIVÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA SOJA, EM *DIGITARIA INSULARIS* E *IPOMOEA* SP.....53

RESUMO....53

ABSTRACT....53

3.1. INTRODUÇÃO....54
3.2. MATERIAL E MÉTODOS....56
3.2.1. Sobrevivência de *C. truncatum* em capim-amargoso....56
3.2.1.1. Obtenção de plantas e inoculação....56
3.2.2. Isolamento de *C. truncatum* em *Digitaria insularis* e *Ipomoea sp.*....59
3.2.3. Observação de conídios germinados de *C. truncatum* em folhas de capim-amargoso....60
3.2.4. Confirmação da identidade de isolados....61
3.2.5. Testes de patogenicidade à soja....62
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO....64
3.3.1. Sobrevivência de *C. truncatum* em capim-amargoso....64
3.3.2. Observação de conídios germinados de *C. truncatum* em folhas de capim-amargoso....66
3.3.3. Confirmação da identidade de isolados....67
3.3.4. Testes de patogenicidade à soja....67
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS....71
3.5. REFERÊNCIAS....72

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS....75

RESUMO

Sobrevivência de *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja, na forma de microescleródios no solo e em plantas daninhas

O cultivo de soja está entre os de maior importância para a segurança alimentar mundial e o Brasil é o segundo maior produtor da cultura. A antracnose é uma das principais doenças da soja e relatos de aumento de sua incidência, juntamente com a dificuldade em seu controle, preocupam produtores da principal região produtora de soja deste país. Informações sobre a sobrevivência de *Colletotrichum truncatum,* que é a espécie mais frequentemente associada à doença, ainda são escassas. No Brasil, o período de estressafra da soja normalmente tem duração de 8 meses e um estudo de populações de *C. truncatum* indica que é provável que ocorra o acúmulo de genótipos deste patógeno com o passar dos anos, o que necessitaria de sua sobrevivência na ausência do hospedeiro nas épocas que ele é ausente nas áreas de produção. Os objetivos deste trabalho foram verificar se *C. truncatum* é capaz de sobreviver na forma de microescleródios no solo e se estas estruturas podem permanecer infectivas por períodos de até 8 meses no solo; verificar se *C. truncatum* pode sobreviver em plantas de capim-amargoso; e confirmar a patogenicidade à soja de um isolado de capim-amargoso (*D. insularis*) e de três isolados de corda-de-viola (*Ipomoea* sp.), oportunamente obtidos a partir de plantas provenientes de uma área produtora de soja. Microescleródios de *C. truncatum* dos isolados CMES 1059 e GO2-12, permaneceram em bolsas de poliéster na superfície do solo ou enterradas a 8 cm de profundidade em uma área de produção comercial de soja. As bolsas foram coletadas após períodos de 92 a 246 dias e a viabilidade dos microescleródios de cada coleta foi avaliada por meio da germinação e crescimento de colônias características dos isolados em meio de Martin; o modelo de regressão logística foi utilizado para avaliar os dados de microescleródios recuperados em relação aos não recuperados. Em outro experimento, realizou-se a inoculação de solo com microescleródios do isolado GO2-12, a semeadura escalonada a cada 5 semanas até 245 dias após a inoculação e o reisolamento a partir das plantas obtidas. Em outro experimento, plantas de *D. insularis* foram inoculadas com suspensão de conídios do isolado GO2-12 e cultivadas em estufa; aos 30 e 60 dias após a inoculação, tentou-se o reisolamento de *C. truncatum.* Adicionalmente, isolados de capim-amargoso e de corda-de-viola de plantas provenientes de área agrícola foram testados quanto à patogenicidade à soja. *C. truncatum* foi recuperado a partir de microescleródios que sobreviveram a períodos de 92 a 246 dias no solo com maior recuperação para o período de 153 dias, que indica a presença de dormência constitutiva. Obteve-se êxito também no isolamento de *C. truncatum* a partir de plantas de soja semeadas em solo inoculado há 245 dias com microescleródios e a partir de plantas de capim-amargoso inoculadas com suspensão de conídios há 30 dias, havendo um caso de recuperação a partir desta daninha aos 60 dias após a inoculação. Quatro isolados obtidos de microescleródios da última coleta (246 dias), um dos isolados obtido de planta de soja infectada por inóculo que permaneceu por 245 dias no solo, um isolado recuperado de planta de capim-amargoso que permaneceu viável por 30 dias no primeiro experimento com *D. insularis* e o isolado recuperado aos 60 dias após a inoculação no segundo, apresentaram perfis genéticos idênticos aos dos isolados inicialmente utilizados na instalação destes experimentos, para 12 locos microssatélites. Estes isolados recuperados e também os obtidos das plantas daninhas do campo mostraram-se patogênicos à soja. Assim, microescleródios de *C. truncatum* podem sobreviver durante 8 meses no solo e constituir inóculo primário da antracnose da soja e as plantas daninhas *D. insularis* e *Ipomoea* sp. podem ser fontes de inóculo desta doença.

Palavras-chave: *Glycine max*; Inóculo primário; Fungo fitopatogênico; *Digitaria insularis*; *Ipomoea*; Hospedeiros alternativos; Estrutura de resistência

ABSTRACT

Survival of *Colletotrichum truncatum*, the causal agent of soybean anthracnose, as microsclerotia in soil and on weeds

Soybean cultivation is among the most important for world food security and Brazil is the second largest producer of the crop. Anthracnose is one of the main soybean diseases and reports of increased incidence, together with the difficulty in its control, concern producers in the main soybean producing region of the country. Information on the survival of *Colletotrichum truncatum*, which is the most often associated species with the disease, is still scarce. In Brazil, the off-season period of soybean usually lasts 8 months and a study of *C. truncatum* populations indicates that genotype accumulation of this pathogen is likely to occur over the years, which would require its survival in the absence of the host at times when it is absent in the production areas. The objectives of this work were to verify if *C. truncatum* can survive in the form of microsclerotia in the soil and if these structures can remain infectious for up to 8 months in the soil; verify whether *C. truncatum* can survive in sourgrass plants; and to confirm the pathogenicity to soybean of a sourgrass isolate (*D. insularis*) and three isolates of morning glory (*Ipomoea* sp.), timely obtained from plants from a soybean-producing area. *C. truncatum* microsclerotia of CMES 1059 and GO2-12 strains remained in ground surface polyester pockets or buried 8 cm deep in a commercial soybean production area. The bags were collected after periods of 92 to 246 days and the viability of the microsclerotia of each collection was evaluated by germination and growth of characteristic colonies of isolates on Martin medium; the logistic regression model was used to evaluate the recovered and non-recovered microsclerotia data. In another experiment, soil inoculation with microsclerotia of GO2-12 strain was carried out, the sowing stepped every 5 weeks until 245 days after inoculation and reisolation from the obtained plants. In another experiment, *D. insularis* plants were inoculated with a conidial suspension of GO2-12 strain and grown in a greenhouse; at 30 and 60 days after inoculation, *C. truncatum* reisolation was attempted. Additionally, sourgrass and morning glory isolates from the field were tested for pathogenicity to soybean. *C. truncatum* was recovered from microsclerotia that survived for periods from 92 to 246 days in the soil with greater recovery for the 153 days, indicating the presence of constitutive dormancy. Isolation of *C. truncatum* was also successful from soybean plants sown in soil inoculated with microsclerotia 245 days ago and from sourgrass plants inoculated with conidial suspension 30 days ago and from one plant of this weed at 60 days after inoculation. Four isolates obtained from the last collection (246 days), one of the isolates obtained from soybean plant that remained for 245 days in the soil with microsclerotia, one recovered from a sourgrass plant that remained viable for 30 days in the first experiment with *D. insularis* and the isolate recovered at 60 days after inoculation in the second, presented the same genetic profiles to the strains initially used in the installation of these experiments, for 12 microsatellite loci. These recovered isolates and also those obtained from agricultural weeds from the field were pathogenic to soybean. Thus, *C. truncatum* microsclerotia can survive for 8 months in the soil and constitute primary inoculum of soybean anthracnose and weeds *D. insularis* and *Ipomoea* sp. may be sources of inoculum for this disease.

Keywords: *Glycine max*; Primary inoculum; Plant pathogenic fungi; *Digitaria insularis*; *Ipomoea*; Alternative hosts; Survival structure

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) possui importância de caráter global, tanto devido ao fornecimento de proteína e óleo para a indústria de alimentos e produção pecuária, como pela movimentação financeira em sua comercialização. Na safra 2018/2019, a produção mundial do grão foi superior a 358,2 milhões de toneladas, sendo Estados Unidos e Brasil os principais produtores e responsáveis por cerca de 33,6% e 32,7% deste montante, respectivamente (USDA, 2019).

A cultura da soja teve início no Brasil com sua adoção em sucessão ao trigo, na região Sul. A partir da década de 70, a valorização do grão impulsionou a expansão da cultura para o Brasil central, onde a correção dos solos e o desenvolvimento de cultivares adaptados a regiões de baixa latitude permitiram o estabelecimento da cultura na região Centro-Oeste (CESB, 2018), que se tornou a maior produtora nacional. Na safra 2018/2019, os estados com maior produção foram Mato Grosso (28,2%), Rio Grande do Sul (16,7%), Paraná (14,1%), Goiás (9,9%) e Mato Grosso do Sul (7,4%). Apesar da distribuição heterogênea, há produção de soja em todas as macrorregiões do Brasil e a cultura vem crescendo em estados do Norte e Nordeste (CONAB, 2019).

Frente à importância da cultura e ao desafio de se ter produtividades cada vez mais elevadas com a demanda crescente pelo grão, a cultura convive com problemas fitossanitários que podem reduzir a produção ou a rentabilidade do cultivo. A antracnose é uma das principais doenças fúngicas da soja e pode provocar a morte de plântulas antes ou após a emergência, necrose dos pecíolos e nervuras e manchas necróticas em hastes e vagens (GODOY et al., 2016). As plantas infectadas possuem o desenvolvimento acelerado e produtividade reduzida e podem formar grãos menores ou não formar grãos (YANG; HARTMAN, 2016). Danos mais representativos devido à doença incluem retorcimento, abertura prematura e abortamento de vagens (ROGÉRIO et al., 2017). No Brasil, reduções de 90 kg/ha foram atribuídas a cada 1% de aumento na incidência da doença (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

A antracnose da soja teve seu primeiro relato em 1917 no continente asiático (TIFFANY, 1950; YANG; HARTMAN, 2016) e está amplamente distribuída nas áreas produtoras da cultura. Sua etiologia é atribuída a algumas espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo *C. truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore a principal delas (YANG; HARTMAN, 2016). Enquanto a associação de *C. truncatum* à antracnose da soja é de abrangência

generalizada, relatos de outras espécies causando a doença (como *C. chlorophyti*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. incanun* e *C. plurivorum*) indicam ocorrências mais restritas (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012; RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998; MAHMODI et al., 2013; CHEN et al., 2006; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2015; BARBIERI et al., 2017; DAMM, 2019). *C. truncatum* pode infectar também outras leguminosas cultivadas como grão-de-bico, lentilha, ervilha e feijão-fava (WEIDEMANN; TEBEEST; CARTWRIGHT, 1988; SOUSA et al., 2018).

Sementes infectadas e restos culturais podem ser fontes de inóculo da doença que, uma vez estabelecida, leva à formação de acérvulos com setas de cor preta e numerosos conídios envoltos por uma mucilagem. Os conídios consituem o inóculo secundário da doença, que é disseminado principalmente por respingos de água de chuva ou de irrigação. A infecção de plantas de soja por *C. truncatum* pode ocorrer em qualquer estádio de desenvolvimento da soja (YANG; HARTMAN, 2016); quando em estádios vegetativos, pode permanecer latente até a formação de corpos de frutificação durante a fase reprodutiva ou de senescência da cultura (CERKAUSKAS; DHINGRA; SINCLAIR, 1983).

Tradicionalmente, a antracnose era conhecida como uma doença de final de ciclo, por ser observada normalmente nos estádios reprodutivos (YANG; HARTMAN, 2016), até as constatações frequentes de sua presença já nas fases iniciais da cultura, relatada por produtores e pesquisadores da região Centro-Oeste nos últimos anos (ROGÉRIO et al., 2019). Em alguns locais, sob condições ambientais favoráveis à doença, de elevadas temperatura e umidade, a antracnose foi relatada como principal doença da cultura.[1]

Embora genótipos de soja com maior resistência à doença venham sendo buscados (YANG; HARTMAN, 2016), seu controle se dá principalmente pelo uso de sementes livres do patógeno e pela aplicação de fungicidas. No entanto, o controle químico tem se mostrado ineficiente para a antracnose da soja (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Assim, apesar da importância da doença, ainda há aspectos pouco esclarecidos neste patossistema. Em um estudo recente, foram identificados três grupos populacionais bastante distintos de *C. truncatum* no Brasil, sem indícios de ocorrência de reprodução sexuada, o que levantou a hipótese de que genótipos do patógeno permaneceriam no campo após a colheita da soja, de modo a acumularem-se com outros introduzidos via sementes infectadas no início da safra seguinte (ROGÉRIO et al., 2019). Como a duração da entressafra de soja é de 8 meses na principal região produtora do país, que foi contemplada no estudo populacional

[1] Comunicação pessoal com Rodrigo Canelo e Felipe de Freitas Cordeiro

citado e onde foi observado um aumento da importância da doença, a permanência do patógeno no campo só ocorreria se garantida por sua sobrevivência na ausência do hospedeiro.

A capacidade de *C. truncatum* formar microescleródios está relatada, mas a função destas estruturas na sobrevivência do fungo não é conhecida. Microescleródios são agregados de hifas frequentemente melanizados, formados em condições ambientais ou nutricionais desfavoráveis, que possuem de 50 a 600 µm de diâmetro e são capazes de armazenar reserva nutricional endógena para uso quando condições favoráveis retornam (JACKSON; PAYNE, 2016). Para *C. truncatum*, estas estruturas são também referidas como primórdios de escleródios (BRASIL, 2009) ou escleródios (KHAN; SINCLAIR, 1991; YANG; HARTMAN, 2016).

A infecção de plantas de soja semeadas em substrato inoculado com microescleródios de *C. truncatum* foi estudada a diferentes temperaturas, todavia, o período em que estas estruturas poderiam permanecer viáveis não foi avaliado (KHAN; SINCLAIR, 1991). No Canadá, foi constatada a sobrevivência e infectividade deste patógeno em restos culturais de lentilha que permaneceram por até 44 meses no campo, no entanto, não foi possível atribuí-la aos microescleródios presentes nos tecidos vegetais ou mesmo às baixas temperaturas de inverno neste país (BUCHWALDT et al., 1996). No Brasil, foi verificada uma baixa taxa de sobrevivência de *C. truncatum* em restos culturais de soja após a permanência durante 6 meses no campo, todavia, novamente não se sabe se esta sobrevivência pode ser atribuída a microescleródios que eventualmente poderiam estar alojados no interior do tecido vegetal (ALMEIDA et al., 2001).

No caso da atuação de microescleródios como estruturas de sobrevivência de *C. truncatum* durante a entressafra da soja, o controle da doença visaria não apenas reduzir danos na safra vigente, mas também não incrementar o inóculo para a safra seguinte, e ainda, medidas adicionais de controle, que atinjam estas estruturas no solo, poderiam ser estudadas e implementadas.

Outro aspecto deste patossistema que merece atenção é a sobrevivência de *C. truncatum* em hospedeiros alternativos. *C. truncatum* foi isolado de diversas espécies de plantas daninhas: *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus retroflexus*, *Ambrosia trifida*, *Apocynum cannabinum*, *Asclepias syriaca*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Hibiscus trionum*, *Ipomoea hederacea*, *I. purpurea*, *Solanum nigrum*, *S. carolinense*, *Xanthium pensylvanicum* e *Polygonum pensylvanicum* (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986), *Desmodium*

tortuosum (GARDINA; LITTRELL; HANLIN, 1988), *Sesbania exaltata*, (JACKSON; SCHISLER, 1995), *Metricaria perforate* (FORSEILLE et al., 2011), *Bidens pilosa* e *Bidens subalternas* (VIEIRA et al., 2018). Há estudos que sugerem o uso de *C. truncatum* como bioherbicida para o controle de algumas destas invasoras: *Matricaria perforata* (HYNES et al., 2010), *Sesbania exaltata* (JACKSON; SCHISLER, 1995; BOYETTE et al., 2012) *Bidens pilosa* e *Bidens subalternans* (VIEIRA et al., 2018), ideia que claramente necessita de cautela no estudo de sua aplicabilidade.

Considerando-se o patossistema objeto de estudo deste trabalho, o controle de plantas daninhas infectadas por *Colletotrichum truncatum* garante a eliminação de uma fonte de inóculo, no entanto, os crescentes casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas dificultam seu controle e implicam um aumento do período de convívio das plantas daninhas com a cultura da soja e de sua provável atuação como fonte de inóculo. Entre as principais plantas daninhas nas áreas de produção agrícola brasileiras, cujo monitoramento da resistência é realizado pelo Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas (HRAC), destaca-se o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), de difícil controle pelo produtor (CASSOL; MATTIUZZI; ALBRECHT, 2019; CARVALHO et al., 2019).

D. insularis é uma planta herbácea perene, que se multiplica tanto por sementes como por rizomas (LORENZI, 2014). Esta invasora teve resistência a herbicidas de diferentes modos de ação relatada no Brasil para plantas ocorrendo em área de cultivo de soja: em 2008, a glifosato (inibidor da 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintase, EPSPS) e em 2016 a fenoxaprope-P-etílico e haloxifope-P-metílico (inibidores da acetil coenzima A carboxilase, ACCase) (HEAP, 2019). O controle químico satisfatório do capim-amargoso tem sido obtido utilizando herbicidas de outros mecanismos de ação (ADEGAS et al. 2010), requerendo maior atenção e investimento do produtor para evitar o surgimento de populações de *D. insularis* resistentes. Em áreas de produção de soja com populações de capim-amargoso resistentes a gligosato, os custos de controle aumentaram em média 198,35 reais por hectare, em relação a áreas sem a resistência (ADEGAS et al., 2017).

Embora *D. insularis* seja uma monocotiledônea, diferente de todas as plantas em que *C. truncatum* foi relatado, sabe-se que outro fitopatógeno do mesmo gênero, *C. abscissum*, antes classificado como *C. acutatum* (CROUS et al., 2015), pode sobreviver nesta planta daninha (FRARE et al., 2016). O crescente aumento da importância da antracnose da soja e também da dificuldade de controle do capim-amargoso nas áreas produtoras da cultura levaram à hipótese de que esta pode ser uma fonte de inóculo de *C. truncatum*. O esclarecimento desta questão pode reforçar a importância do manejo adequado para esta

invasora, não apenas para evitar a matocompetição, que por si só já causa perdas expressivas (GAZZIERO et al., 2019), mas também para reduzir o inóculo de *C. truncatum,* especialmente em áreas produtoras em que a antracnose tem maior expressividade.

Outra planta daninha importante na cultura da soja é a corda-de-viola (*Ipomoea* spp.), que por ser uma trepadeira (LORENZI, 2014) e ficar em contato íntimo com as plantas de soja, enrolando-se nas hastes e folhas, chama a atenção no contexto deste trabalho. Embora não haja relatos de resistência de *Ipomoea* spp. a herbicidas, seu controle é dificultado pela dormência de sementes com diferentes fluxos de germinação (OGUNWENMO; UGBOROGHO, 1999). Como já mencionado, *C. truncatum* já foi isolado de duas espécies deste gênero nos Estados Unidos (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986).

Este trabalho teve como objetivos: verificar se *C. truncatum* é capaz de sobreviver na forma de microescleródios no solo e se estas estruturas podem permanecer infectivas por períodos de até 8 meses de permanência no solo; verificar se *C. truncatum* pode sobreviver em plantas de capim-amargoso; e confirmar a patogenicidade à soja de um isolado de capim-amargoso (*D. insularis*) e de três isolados de corda-de-viola (*Ipomoea* sp.), oportunamente obtidos a partir de plantas provenientes de uma área produtora de soja.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S. et al. Alternativas de controle químico de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto, SP. **Anais**... Ribeirão Preto, SP: SBCPD, 2010.

ADEGAS, F.S., L. VARGAS, D.L.P. GAZZIERO; D. KARAM. **Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil.** Londrina: Embrapa Soja, 2017. 12p.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2016. 516p.

ALMEIDA, Á. M. R. et al. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1231-1238, 2001.

BARBIERI, M. C. G.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; MORAES, S. R. G.; BONALDO, S. M.; ROGÉRIO, F.; LINHARES, R. R.; MASSOLA, N. S. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, 2017.

BLAKEMAN, J. P.; HORNBYT, D. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia ad conidia. **Transactions of the British Mycological Society,** v. 49, n. 2, p.227-240, 1966.

BOYETTE, C.; BRYSON, C.; HOAGLAND, R.; WEAVER, M. Effects of Simulated Rainfall on Disease Development and Weed Control of the Bioherbicidal Fungi *Alternaria cassiae* and *Colletotrichum truncatum*. **Weed Technology,** v.*26, n.*1, p.117-121. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes.** Brasília. 2009.

BUCHWALDT, L.; MORRALL, A. A.; CHONGO, G.; BERNIER, C. C. Windborne Dispersal of *Colletotrichum truncatum* ans Survival in Infested Lentil Debris. **Phytopathology,** v. 86, p. 1193–1198, 1996.

CARVALHO, R.; ROSSI, C.; DEMANT, L.; SUGAYAMA, R. Manejo da resistência. **Revista cultivar,** Pelotas, v.241, 2019. Disponível em: <https://b73f4c7b-d632-4353-826f-b62eca2c370a.filesusr.com/ugd/48f515_3d4ddc2a628748c0bfd5f98b67a27303.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2019.

CASSOL, M; MATTIUZZI, M. D; ALBRECHT, A. J. P; *et al.* Efficiency of isolated and associated herbicides to control Glyphosate-Resistant Sourgrass. **Planta Daninha**, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, v. 37, p. 1-8, 2019.

CERKAUSKAS, R. F.; DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Effect of Three Desiccant-Type Herbicides on Fruiting Structures of *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. on Soybean Stems. **Plant Disease,** v. 67, n. 6, p. 620-622, 1983.

CHEN, L. S. L. S. C.; CHU, C. C. C.; LIU LIU, C. D. C. D.; CHEN, R. S. R. S. C.; TSAY TSAY, J. G. J. G. PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology,** v. 154, n.11-12, p. 654662, 2006.

COMITÊ ESTRATÉGICO SOJA BRASIL – CESB. **Soja: quebrando recordes: CESB: 10 anos de máxima produtividade.** Sorocaba: CESB. 2018. Disponível em: <http://www.cesbrasil.org.br/livro-soja-quebrando-recordes/>. Acesso em: 2 dez. 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Brasília: Conab, 2019. v.6.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 320-370. **Persoonia**, v. 34, p. 167–266, 2015. Disponível em: <www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimjhttp://dx.doi.org/10.3767/003158515X688433>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology,** v. 92, p. 1–46, 1 mar. 2019.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, 2016.

FORSEILLE, L.; PENG, G.; WEI, Y.; GOSSEN, B. D. Molecular and morphological differentiation of *Colletotrichum truncatum* from scentless chamomile and selected crop species. **Canadian Journal of Plant Pathology,** v. 33, n. 4, p. 512–524, 2011.

FRARE, G. F; COUTO, H. T. Z.; CIAMPI-GUILLARDI, M; AMORIM, L. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum,* can survive on weeds. **Australasian Plant Pathology,** Amsterdam, v. 45, n. 4, p. 339-346, 2016.

GARDINA, J. ; LITTRELL, R. H.; HANLIN, R.T. Anthracnose of Florida Beggarweed (*Desmodium tortuosum*) Caused by *Colletotrichum truncatum*. Cambridge University Press, v.36, n.3, p.329-334. 1988

GAZZIERO, D.L.P.; ADEGAS, F.S.; SILVA, A.F.;CONCENCO, G.. Estimativas de Perdas de Rendimento na Soja Devido à Interferência do Capim-Amargoso. **Planta daninha,** v.17, jun. 2019.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V.; Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de Fitopatologia.** v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. cap.67, p. 657-675.

HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; SINCLAIR, J. B. Incidence of *Colletotrichum* spp. on Soybeans and Weeds in Illinois and Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 70, n. 8, p. 780–782, 1986.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 2 dez. 2019.

HYNES, R.; CHUMALA, P.; HUPKA, D.; PENG, G. A complex coacervate formulation for delivery of *Colletotrichum truncatum* 00-003B1. **Weed Technology,** v.24, n.2, p. 185-192. 2010.

JACKSON, M. A.; BOTHAST, R. J. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 56, n. 11, p. 3435–3438, 1990.

JACKSON, M. A.; PAYNE, A. R. Liquid culture production of microsclerotia. In: GLARE, T. R.; MORANDIEZ, M. E. **Microbial-Based Biopesticides; Methods and Protocols.** v.1477. New York: Springer Science+Business Media, 2016. p. 71–83.

JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research,** v. 99, n. 7, p. 879–884, 1995.

KHAN, M.; SINCLAIR, J. B. Effect of Soil Temperature on Infection of Soybean Roots by SclerotiaForming Isolates of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 75, n. 12, p. 1282–1285, 1991.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional.** 7.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 383 p.

MAHMODI, F.; KADIR, J. B.; WONG, M. Y.; NASEHI, A.; PUTEH, A.; SOLEIMANI, N. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Soybean (Glycine max) in Malaysia. **Plant Disease,** v. 97, n. 6, p. 841–841, 2013.

OGUNWENMO, K.; UGBOROGHO, R. E. Effects of chemical and mechanical scarification on seed germination of five species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 69, p. 147-162, 1999.

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

ROGÉRIO, F.; CAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA JR., N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology,** v. 122, n. 2. p. 402–415, 2017.

ROGÉRIO, F.; GLADIEUX, P.; MASSOLA JR, N. S.; CAMPI-GUILLARDI, M. Multiple introductions without admixture of *Colletotrichum truncatum* associated 2 with soybean anthracnose in Brazil. **Phytopathology,** v. 109, n. 4. 2019

SHORT, D. P. G.; SANDOYA, G.; VALLAD, G. E.; KOIKE, S. T.; XIAO, C.-L.; WU, B.-M.; GURUNG, S.; HAYES, R. J.; SUBBARAO, K. V. Dynamics of *Verticillium* Species Microsclerotia in Field Soils in Response to Fumigation, Cropping Patterns, and Flooding. **Phytopathology,** v. 105, n. 5, p. 638–645, 2015.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in Soil and in Residue of Soybean. **Phytopathology,** v. 70, p. 13–17, 1980.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; DA SILVA MATOS, K.; DE ANDRADE LIMA, G. S.; BESERRA, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology,** v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

TIFFANY, L. H. **The anthracnose complex on soybeans**. Iowa State University, Ames. 1950. Disponível em: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=14049&context=rtd>. Acesso em: 25 out. 2018.

UNITED STATES OF AGRICULTURE - USDA. **World Agricultural Production.** 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2019.

VIEIRA, B. S.; DIAS, L. V. S. A.; LANGONI, V. D.; LOPES, E. A. Liquid fermentation of *Colletotrichum truncatum* UFU 280, a potential mycoherbicide for beggartick. **Australasian Plant Pathology,** v. 47, p. 277– 283, 2018.

YANG, H.-C.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. **Compendium of soybean diseases and pests.** 5.ed. St. Paul: APS Press, 2016.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum chlorophyti* Causing Soybean Anthracnose. **Plant Disease,** v. 96, n. 11, p. 1699–1699, 2012.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. Multiplex Real-time PCR Detection and Differentiation of *Colletotrichum* Species Infecting Soybean. **Plant Disease,** v.99, n. 11, p. 1559–1568, 2015.

WEIDEMANN, G. J.; TEBEEST, D. O.; CARTWRIGHT, R. D. Host Specificity of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* and *C. truncatum* in the Leguminosae. **Phytopathology**, v. 78, p. 986– 990, 1988.

2. SOBREVIVÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA SOJA, NA FORMA DE MICROESCLERÓDIOS NO SOLO

RESUMO

A soja é uma das principais culturas agrícolas do mundo e o Brasil tem papel expressivo em sua produção. Uma das principais doenças da soja é a antracnose e foi observado o aumento de sua incidência na região de maior produção deste país, onde a entressafra da soja dura 8 meses. Esta doença é causada principalmente por *Colletotrichum truncatum*, que é capaz de formar microescleródios, cuja função de sobrevivência não foi descrita previamente. Este trabalho teve como objetivo verificar se microescleródios de *C. truncatum* podem permanecer viáveis e infectivos por períodos de até 8 meses. Microescleródios de dois isolados deste fungo (CMES 1059 e GO2-12) foram inseridos em bolsas de poliéster que foram colocadas na superfície do solo ou a 8 cm de profundidade em uma área de produção comercial de soja. As bolsas foram coletadas de forma escalonada após períodos de até 8 meses para avaliação da viabilidade dos microescleródios, por meio da germinação e formação de colônias típicas em meio de Martin; os dados de microescleródios recuperados em relação aos não recuperados foram analisados utilizando o modelo de regressão logística. Adicionalmente, foi realizada a semeadura escalonada em solo inoculado com microescleródios (isolado GO2-12) e o reisolamento a partir das plantas obtidas até 8 meses após a inoculação. Microescleródios de *C. truncatum* sobreviveram a períodos de 92 a 246 dias em solo agrícola, com maior recuperação para o período de 153 dias, sugerindo dormência constitutiva. O teste de patogenicidade com colônias obtidas na última coleta (246 dias) mostrou que os isolados mantiveram-se patogênicos à soja. Paralelamente, *C. truncatum* foi isolado de plantas de soja semeadas 245 dias após a inoculação do solo com microescleródios. O perfil genotípico para 12 locos microssatélites de isolados obtidos na última coleta de microescleródios (246 dias) e de planta da última data de semeadura (245 dias) foram os mesmos dos isolados utilizados na instalação dos experimentos. Assim, microescleródios de *C. truncatum* contidos no solo podem atuar como inóculo primário da antracnose da soja.

Palavras-chave: *Glycine max;* Estrutura de resistência; Dormência constitutiva; Inóculo primário

ABSTRACT

Soybean is one of the main crops in the world and Brazil has a significant role in its production. One of the main diseases of soybean is anthracnose and it has been observed an increase in its incidence in the region of the highest production of this country, where the soybean off-season period lasts 8 months. This disease is mainly caused by *Colletotrichum truncatum*, which is capable to produce microsclerotia, whose survival function has not been previously described. This study aimed to verify whether *C. truncatum* microsclerotia can remain viable and infectious for periods of up to 8 months. Microsclerotia from *C. truncatum* (CMES 1059 and GO2-12 strains) were inserted into polyester pockets that were placed on the soil surface or 8 cm deep in a commercial soybean production area. The bags were collected staggered after periods of up to 8 months to evaluate the viability of the microsclerotia through germination and formation of typical colonies on Martin medium; data from recovered versus non-recovered microsclerotia were analyzed using the logistic regression model. Additionally, stepped sowing was performed in soil inoculated with microsclerotia (GO2-12 strain) and reisolated from plants obtained up to 8 months after inoculation. *C. truncatum* microsclerotia survived for periods from 92 to 246 days in agricultural soil, with greater recovery for 153 days, suggesting constitutive dormancy. The

pathogenicity test with colonies obtained in the last collection (246 days) showed that the isolates remained pathogenic to soybean. *C. truncatum* was isolated from soybean plants sown 245 days after soil inoculation with microsclerotia. The genotypic profile for 12 microsatellite loci of isolates obtained in the last collection of microsclerotia (246 days) and plant of the last sowing date (245 days) was the same as the strains used in the installation of the experiments. Thus, *C. truncatum* microsclerotia contained in the soil may act as primary inoculum of soybean anthracnose.

Keywords: *Glycine max;* Survival structure; Constitutive dormancy; Primary inoculum

2.1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, sua produção é destinada principalmente à indústria de alimentos e pecuária, assumindo papel expressivo na segurança alimentar e economia global. A antracnose ocorre de forma generalizada nas áreas de produção de soja (YANG; HARTMAN, 2016) e é um problema emergente no Brasil, que supre 32,7% da demanda mundial do grão (USDA, 2019).

Na região norte deste país, onde o cultivo de soja se encontra em expansão (CONAB, 2019), os fungicidas comumente aplicados na cultura têm se mostrado ineficazes e reduções de produção de 90 kg/ha foram atribuídas a cada 1% de aumento em incidência da antracnose (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016). Os relatos de maiores incidências desta doença nas áreas produtoras no Centro-Oeste do Brasil indicam que o controle químico também não é satisfatório na região (ROGÉRIO et al., 2019), que é a principal produtora do grão (CONAB, 2019).

O potencial destrutivo desta doença e sua ocorrência em maiores incidências no campo têm preocupado produtores e estimulado um melhor entendimento do patossistema. *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore é o principal agente causal da antracnose da soja (YANG; HARTMAN, 2016), embora outras espécies do mesmo gênero também tenham sido associadas à sua etiologia: *C. chlorophyti* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2012), *C. coccodes*, (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998), *C. gloeosporioides* (MAHMODI et al., 2013; CHEN et al., 2006), *C. incanun* (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2015) e *C. plurivorum*, a princípio relatado como *C. cliviae* (BARBIERI et al., 2017) e reclassificado posteriormente (DAMM, 2019).

C. truncatum pode sobreviver em restos culturais (YANG; HARTMAN, 2016) e sementes infectadas (SCHNEIDER et al., 1974), pelas quais é possível sua disseminação a longas distâncias. Além da soja, pode infectar plantas de lentilha, grão-de-bico, ervilha e feijão-fava (WEIDEMANN; TEBEEST; CARTWRIGHT, 1988; SOUSA et al., 2018) e

determinadas espécies de plantas daninhas (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986; GARDINA; LITTRELL; HANLIN, 1988; JACKSON; SCHISLER, 1995; FORSEILLE et al., 2011; VIEIRA et al., 2018). Temperatura e umidade relativa do ar elevadas são favoráveis à doença e, após seu estabelecimento, a disseminação entre plantas ocorre por meio de respingos, que liberam e transportam conídios produzidos em acérvulos. Seus conídios têm formato falcado (ROGÉRIO et al., 2017) e constituem o inóculo secundário neste patossistema. A infecção se dá com a presença de água durante a germinação do conídio e, após estabelecida, pode permanecer quiescente, com um desenvolvimento tardio dos sintomas (SINCLAIR, 1991). A antracnose pode provocar morte de plântulas, redução da área fotossintética por meio de manchas necróticas em folhas e hastes, queda de folhas e vagens e necrose parcial ou generalizada de vagens não abortadas. Manchas necróticas nas folhas cotiledonares e necrose no colo de plântulas, manchas irregulares em hastes, necrose de pecíolos e de nervuras são sintomas típicos da doença (GODOY et al., 2016).

Um estudo recente sobre populações brasileiras de *C. truncatum* associadas à antracnose da soja relata a existência de três grupos genéticos, contudo, sem haver evidências de que ocorra reprodução sexuada, o que levou os autores à proposição de que a variabilidade ocorre devido ao acúmulo de genótipos já existentes com outros introduzidos, com a ocorrência de três eventos fundadores que justificariam esta estrutura populacional (ROGÉRIO et al., 2019).

Na maioria das áreas de produção de soja do país, seu cultivo se dá em sucessão com outra cultura, como milho, algodão ou sorgo, visando atender a uma medida legislativa estabelecida para o manejo da ferrugem asiática, que proíbe o cultivo da soja e determina a eliminação de plantas voluntárias durante alguns meses do ano (conhecida como vazio sanitário), e também maximizar o aproveitamento econômico das áreas de produção. Assim, o período entre a colheita da soja e a semeadura na safra seguinte, e ao qual *C. truncatum* precisaria sobreviver para que isolados permaneçam em um campo de produção e possam se acumular com outros isolados que cheguem na área na safra seguinte, possivelmente via sementes, é de oito meses em geral.

Sabe-se que *C. truncatum* pode formar microescleródios, agregados de hifas com infectividade à soja comprovada (KHAN; SINCLAIR, 1991), que são descritos como estruturas que podem sobreviver no interior de restos culturais (YANG; HARTMAN, 2016); no entanto, a sobrevivência de microescleródios deste fungo no solo ainda não foi relatada. Para outros fitopatógenos como *Macrophomina phaseolina*, *C. coccodes*, *Verticillium dahliae*

e *V. longisporum,* é conhecido que os microescleródios podem atuar como inóculo primário em seus patossistemas (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980; BLAKEMAN; HORNBYT, 1966; SHORT et al., 2015). Microescleródios e escleródios podem apresentar dormência, que é um período em que permanecem com metabolismo reduzido, podendo germinar posteriormente. Há dois tipos de dormência, que podem ocorrer isoladamente ou em conjunto: constitutiva, em que a germinação da estrutura de resistência é impedida por propriedades inatas do estádio dormente, que pode ser interrompido após o fornecimento de uma condição normalmente adversa ao desenvolvimento vegetativo do fungo, e exógena, em que características do meio externo estimulam a germinação quando se tornam favoráveis ao desenvolvimento vegetativo do fungo (COLEY-SMITH; COOKE, 1971).

Para *C. truncatum*, foi verificada manutenção de sua viabilidade em restos culturais de lentilha que permaneceram por 44 meses no solo no Canadá (BUCHWALDT et al., 1996), mas a ocorrência de invernos rigorosos, que não ocorrem no Brasil, pode ter favorecido sua sobrevivência e uma suposta situação análoga poderia não ser observada em outras condições climáticas. No Brasil, a sobrevivência de *C. truncatum* em restos culturais de soja foi relatada com uma baixa taxa de isolamento a partir de partes vegetais que ficaram por 6 meses em solo agrícola, em relação a outros fitopatógenos isolados do mesmo material vegetal (ALMEIDA et al., 2001). Em ambos os casos, não se sabe se a sobrevivência foi garantida pela existência de estruturas de resistência no interior dos restos culturais.

Os objetivos deste trabalho foram verificar se *C. truncatum* sobrevive na forma de microescleródios em solo agrícola por períodos de até 8 meses e se infectam plantas de soja após a permanência no solo, por até 8 meses, em ambiente controlado.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Sobrevivência de microescleródios de *C. truncatum* em condições de campo

2.2.1.1. Produção de microescleródios e instalação do experimento

Dois isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas de soja provenientes de Goiás, GO2-12 (ROGÉRIO et al., 2019) e do Paraná, CMES 1059 (ROGÉRIO et al., 2017), foram cultivados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) a 24°C, com fotofase de 12 h por 14 dias e transferidos para meio de cultura líquido de caldo de batata (200 g/L) contendo alta concentração de dextrose (50 g/L), visando obter microescleródios sem a produção de conídios. Esta metodologia de produção foi baseada em um teste prévio, no relato de haver

formação de microescleródios e supressão da produção de conídios utilizando alta concentração de dextrose (JACKSON; BOTHAST, 1990) e também pela maior facilidade de separação destas estruturas de um meio líquido em relação a um meio solidificado. Foram transferidos dois discos de micélio de 6 mm de diâmetro por erlenmeyer de 125 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio líquido. Os erlenmeyers foram incubados durante 15 dias em mesa agitadora horizontal a 300 rpm, à temperatura e iluminação ambiente. A rotação de incubação foi a mesma utilizada para a produção de microescleródios de *C. truncatum* em outro meio de cultura líquido, que possui ingredientes de elevado custo (JACKSON; SCHISLER, 1995) e por isso não seria de adoção viável. A melanização dos microescleródios foi acompanhada por meio da observação diária de uma pequena quantidade ao microscópio óptico a partir do décimo dia. O meio de cultura contendo microescleródios foi peneirado em malhas de 40 mesh (poros de 425 µm) e 80 mesh (poros de 180 µm), nesta ordem, fazendo-se a adição de água destilada (Figura 1). Os microescleródios retidos na malha de 80 mesh foram lavados com água destilada, para a eliminação de esporos eventualmente presentes. O volume recolhido foi submetido à agitação e teve a concentração estimada por meio da contagem de microescleródios em 3 alíquotas de 10 µL, ao microscópio óptico.

Figura 1. Aspecto dos microescleródios de *Colletotrichum truncatum* produzidos em meio de cultura líquido (A) e durante o peneiramento, sobre malhas de 40 mesh (B) e de 80 mesh (C).

A suspensão obtida foi distribuída em placas de Petri de poliestireno estéreis (superfície hidrofóbica, em que não ocorre a adesão dos microescleródios) utilizando 52 placas para cada isolado, com o mesmo volume de suspensão por placa. O número de microescleródios por placa foi superior a 200 para os dois isolados. As placas permaneceram abertas cobertas com toalhas de papel a 22ºC durante 15 horas para a secagem e os microescleródios foram transferidos para bolsas de poliéster (100%) de 7 x 9 cm, com poros de aproximadamente 180 µm, utilizando um pincel. O conteúdo de cada placa foi inserido em uma bolsa e todas as bolsas foram fechadas com linha de poliéster (100%). Uma pequena porção dos microescleródios secos, não inserida nas bolsas, foi utilizada para estimar sua viabilidade inicial. Foram usados 50 microescleródios por isolado, dispostos em 5 placas contendo meio de Martin, incubados a 24ºC durante 10 dias com fotofase de 12 horas, para posterior contagem do número de colônias formadas.

As bolsas foram levadas a campo para a permanência por 92, 120, 153, 184, 215 e 246 dias no solo, embora inicialmente 8 períodos estivessem previstos, e não 6. O experimento foi instalado em 04/01/2019 em um área de produção comercial de soja, com histórico de cultivo em sucessão com milho há 4 anos, em sistema de plantio direto. A área está situada no município de Salto/SP (23°07'34.4"S, 47°19'39.4"W) e foi escolhida devido à proximidade do laboratório em que as avaliações foram realizadas e ao consentimento do produtor para a instalação do experimento, que viabilizaram sua realização. Foram utilizadas 3 repetições em delineamento casualizado em blocos em esquema fatorial 2 x 2 x 8 (para 2 isolados, 2 profundidades e para os 8 períodos de permanência no campo anteriormente previstos). Foram adotadas as profundidades de 0 e 8 cm, espaçamento de 30 cm entre pontos de colocação das bolsas (devidamente identificados), utilizando 36 bolsas de cada isolado, para a composição de 3 blocos lado a lado.

Ao lado da identificação de cada ponto, os locais para enterrio das bolsas foram abertos utilizando uma cavadeira articulada manual. Metade das bolsas foram enterradas a 8 cm de profundidade conforme localização sorteada. Na superfície, sobre o local de enterrio, uma bolsa do mesmo isolado foi colocada amarrada à haste de identificação. As bolsas foram cobertas por palha de milho, armazenada após a última colheita do grão nesta mesma área (Figura 2).

Figura 2. Bolsas com microescleródios de *Colletotrichum truncatum* colocadas em área agrícola de produção de soja, a 8 cm de profundidade (A) e sobre a superfície do solo (B) e área do experimento coberta por palha de milho (C).

2.2.1.2. Avaliação da sobrevivência

Decorridos os intervalos de tempo mencionados, foi realizada a coleta de uma bolsa de cada isolado, de cada posição de permanência no solo (na superfície ou enterrado), em cada bloco, totalizando 12 bolsas. Para a coleta das bolsas enterradas, fez-se o desenterrio de maneira cuidadosa, com o auxílio de uma pá (Figura 3).

Após cada coleta, as bolsas contendo microescleródios foram armazenadas a 4ºC, no interior de recipiente hermeticamente fechado para evitar a perda de água, para posterior plaqueamento, tendo-se o cuidado de realizar o plaqueamento dos microescleródios de todas

as bolsas de um único bloco em um mesmo dia, já que iniciar a avaliação das bolsas coletadas nos três blocos de forma simultânea não era possível. Os períodos de armazenamento dos microescleródios a 4°C, entre e coleta e a avaliação, foram de 1 dia para o bloco I, 4 dias para o bloco II e 7 dias para o bloco III. Na avaliação, os microescleródios ainda no interior das bolsas foram submetidos à desinfestação superficial por meio da imersão em etanol (70%) por 10 s e hipoclorito de sódio (0,75%) por 10 s. Sessenta microescleródios por bolsa foram coletados sob visualização ao estereomicroscópio e distribuídos em três placas de Petri de 9 cm de diâmetro sobre meio de Martin com estreptomicina (0,03 g/L), quando disponíveis nesta quantidade. Quando o número de microescleródios presentes na bolsa foi inferior a 60, todos foram utilizados na avaliação e seu número total foi anotado. A placas foram fechadas com filme plástico e incubadas a 24°C com fotofase de 12 horas durante 10 dias. Ao longo deste período, realizou-se diariamente a observação e transferência de todas as colônias suspeitas de serem de *C. truncatum* para placas de Petri de 6 cm de diâmetro sobre meio BDA, que foram incubadas sob as mesmas condições. As colônias das placas com meio de Martin foram numeradas utilizando caneta permanente no verso da placa de Petri, para que uma mesma colônia não fosse repicada mais de uma vez. Esta numeração e identificação da placa com meio de Martin de que foi proveniente foram utilizadas para identificar as placas de BDA em que foi realizada a transferência das colônias (Figura 4). Após o cultivo em BDA, foram obtidas colônias características de *C. truncatum* e também colônias de outros fungos, indistinguíveis em seu desenvolvimento inicial sobre meio de Martin. Estas últimas foram descartadas.

Figura 3. Coleta de bolsa com microescleródios de *Colletotrichum truncatum* que permaneceu enterrada (A) e bolsas de um dos blocos de uma das datas de coleta, antes da desinfestação e plaqueamento dos microescleródios (B).

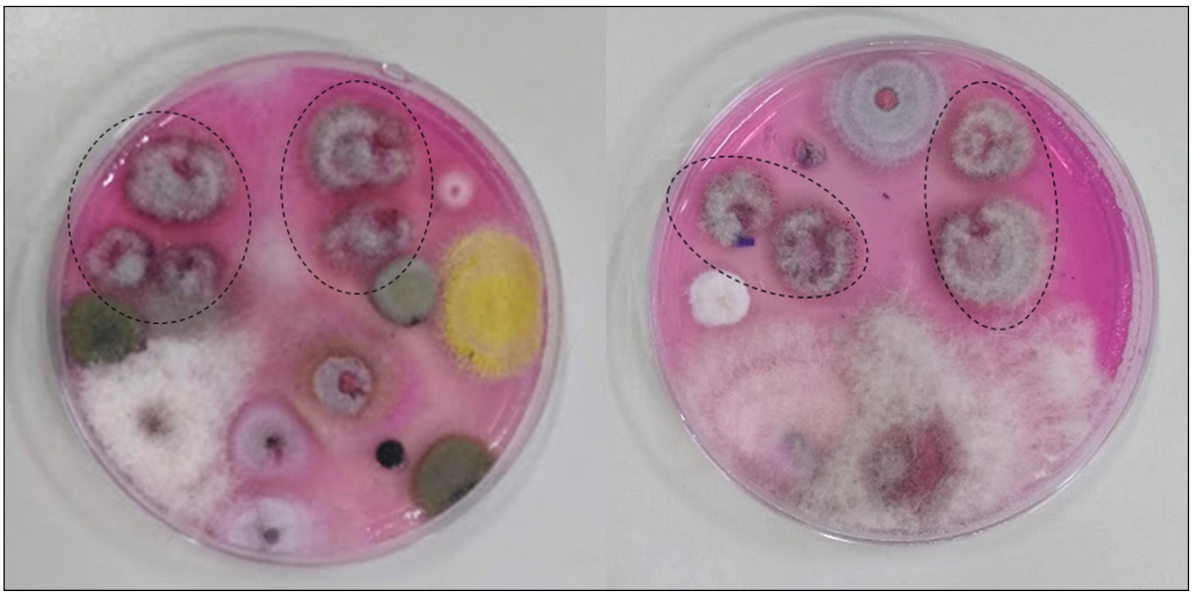

Figura 4. Placas de meio de Martin com microescleródios que permaneceram em solo agrícola, com crescimento de algumas colônias com morfologia típica de *Colletotrichum truncatum* em destaque.

As colônias típicas dos isolados dos isolados GO2-12 e CMES 1059 obtidas foram contabilizadas e todas foram conservadas pelo método de Castellani (ALFENAS; MAFIA, 2016).

2.2.1.3. Testes de patogenicidade à soja

Sementes de soja (não tratadas com fungicidas) da cultivar AMS Tibagi, de suscetibilidade aos isolados GO2-12 e CMES 1059 previamente confirmada, provenientes de lote submetido a teste de sanidade (BRASIL, 2009) a partir do qual se constatou ausência de *C. truncatum,* foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito de sódio (1%) por 3 min e dispostas sobre tolhas de papel por 24 h para secagem à temperatura ambiente. As sementes secas foram colocadas em placas de Petri, dispostas sobre a superfície de colônias de quatro isolados obtidos a partir de microescleródios da última coleta realizada (nomeados 6IAS5-2 e 6IAE2-1, de microescleródios do isolado CMES 1059 que ficaram na superfície do solo e enterrado, respectivamente, e 6IBS1-2 e 6IBE1-1, de microescleródios do isolado GO2-12 que permaneceram na superfície do solo e enterrado, nesta ordem), cultivadas em meio de cultura BDA acrescido de manitol (-1,0 MPa), para inoculação pelo método da restrição hídrica (COSTA et al., 2003). Sementes desinfestadas foram colocadas em placas sobre este meio de cultura não inoculado para constituir o tratamento controle. As placas com as sementes foram fechadas com filme plástico e permaneceram em câmara BOD (*Biological Oxygen Demand*) a 24°C, com fotofase de 12 horas, durante 2 dias, para posterior semeadura

de 10 sementes por vaso, contendo substrato autoclavado, composto por solo, areia e esterco de curral (na proporção 1:1:1). O ensaio se deu em delineamento inteiramente aleatorizado, com 9 tratamentos, sendo 1 controle, 4 compostos por estes isolados e 6 por isolados de outro estudo (Capítulo 3, item 3.2.5), com 4 repetições, sendo cada parcela experimental composta por um vaso. Os vasos foram mantidos em estufa e, 10 dias após a semeadura, 2 plantas de cada vaso foram coletadas para a secção de fragmentos contendo área de transição entre tecido com e sem sintoma da doença. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente por meio da imersão em etanol (70%) por 1 min e hipoclorito de sódio (1%) por 2 min e colocados sobre meio de cultura BDA com estreptomicina (0,03 g/ L). Após a incubação por 4 dias, as colônias obtidas a partir destes fragmentos foram transferidas para meio BDA para melhor observação de suas características morfológicas. Adicionalmente, plantas de soja (AMS Tibagi) em estádio fenológico R2 (florescimento pleno) obtidas de sementes desinfestadas da mesma maneira, foram inoculadas por meio da aspersão de suspensões de conídios (10^5 conídios/ mL) dos isolados 6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2 e 6IBE1-1, utilizando borrifadores manuais. O preparo das suspensões se deu após adição de água destilada estéril sobre as colônias cultivadas em meio de cultura BDA, liberação dos conídios com o auxílio de uma alça de Drigalsky, filtração da suspensão obtida em gaze, estimativa de sua concentração após a contagem de conídios em câmara de Neubauer, seguida da diluição da suspensão para a concentração mencionada. De forma análoga, este experimento também utilizou isolados em teste em outro estudo (Capítulo 3, item 3.2.5) e teve 9 tratamentos, 1 controle e 4 deles compostos pelos isolados 6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2 e 6IBE1-1. O experimento teve 4 repetições por tratamento e um vaso com 2 plantas de soja correspondeu a uma parcela experimental. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida durante 48 h no escuro e então cultivadas em estufa e observadas diariamente, visando constatar o desenvolvimento de sintomas característicos de antracnose (Figura 5).

Figura 5. Inoculação de sementes de soja pelo método da restrição hídrica (A), inoculação de plantas de soja por aspersão de suspensão de conídios de *Colletotrichum truncatum* (B) e câmara úmida após a inoculação por aspersão (C).

2.2.2. Infectividade de microescleródios de *C. truncatum* ao longo do tempo

2.2.2.1. Instalação do experimento

O experimento foi instalado com delineamento inteiramente aleatorizado e foram fatores em avaliação, além da condição do solo (inoculado ou não inoculado), 8 períodos de tempo (decorridos entre a inoculação e a semeadura), com 7 repetições por tratamento.

Cento e quatorze porções de 140 g de solo autoclavado (por 2 horas a 121ºC) foram separadas em sacos plásticos, sendo duas para a determinação da umidade do solo após a secagem em estufa a 40ºC e pesagem diária até a repetição da massa e as 112 restantes para a instalação do experimento (56 para a constituição de parcelas experimentais com inóculo e 56 para as parcelas sem inóculo). Da mesma maneira que para o outro experimento já descrito (item 2.2.1), microescleródios do isolado GO2-12 foram produzidos e separados em suspensão, que teve sua concentração estimada. Para estimar a viabilidade dos microescleródios utilizados na instalação deste experimento, 60 microescleródios da mesma suspensão utilizada para a inoculação do solo foram distribuídos em 3 placas de Petri contendo meio de Martin (20 por placa) e incubados a 24ºC com fotofase de 12 h por 10 dias.

Alíquotas de mesmo volume da suspensão de microescleródios foram retiradas sob agitação, em agitador magnético (Marconi), e utilizadas para a inoculação individual de cada porção de 140 g de solo (das 56 destinadas à inoculação), pesada em saco plástico. As porções foram homogeneizadas por meio da agitação manual dos sacos plásticos. Apesar do uso do agitador magnético, como as últimas alíquotas retiradas da suspensão visivelmente não possuíam a mesma concentração que as retiradas no início, foi realizada a mistura das porções inoculadas por meio da agitação manual e rolagem em bancada em um saco plástico maior

contendo volume de ar suficiente para permitir a homogeneização, durante 1 hora. O solo inoculado foi então pesado novamente em porções de 140 g, em vasos de 180 mL. A concentração de inóculo utilizada foi de 12,84 microescleródios por grama de solo seco. As 56 porções de solo não inoculado também foram colocadas em vasos de igual volume. Os vasos foram colocados em uma câmara de crescimento (Conviron) e mantidos a 25ºC com fotofase de 12 h, no dia 07/12/18. Cada vaso constituiu uma parcela experimental. Foi realizada a semeadura de 3 sementes por vaso, a 1 cm de profundidade, variando-se o momento da semeadura, de modo que, logo após a colocação dos vasos na câmara de crescimento e a cada 5 semanas, 14 vasos (7 com inóculo e 7 sem inóculo) foram utilizados. Os vasos em que se realizava a semeadura foram irrigados diariamente com água destilada, de forma cuidadosa e utilizando uma seringa, com 20 mL no dia da semeadura e com 10 mL nos dias subsequentes, até o 21º dia. Aos 10 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste de plântulas, mantendo-se uma planta por vaso, coletada no 21º dia (Figura 6). A última semeadura ocorreu 245 dias após a inoculação do solo.

2.2.2.2. Avaliação da manutenção da infectividade de *C. truncatum*

Quatro dos vasos com inóculo e 4 sem inóculo dos dois primeiros momentos de semeadura e todos os 7 vasos com inóculo e 7 sem inóculo, dos demais momentos de semeadura foram submetidos a esta avaliação utilizando as plântulas desbastadas aos 10 dias e a planta mantida até os 21 dias após a semeadura, que foram submetidas à secção de fragmentos da raiz e região de inserção dos cotilédones ou folhas cotiledonares. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente com a imersão em etanol (70%) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio (1%) por 2 minutos, e incubados em câmara úmida em placas de Petri com meio de cultura BDA com estreptomicina (0,03 g/L), a 24ºC e fotofase de 12 h, por 10 dias. Os fragmentos foram obervados diariamente ao estereomicroscópio e acérvulos típicos de *C. truncatum* foram transferidos para placas de Petri com o mesmo meio de cultura, para a obtenção de colônias puras do patógeno. Em alguns casos, foi possível detectar a presença de acérvulos em raízes antes mesmo da incubação em câmara úmida (Figura 6E). Nestes casos, foi realizado o isolamento direto logo após a coleta das plantas. Os isolados obtidos foram cultivados em meio BDA com pedaços de papel filtro estéreis e os pedaços de papel com micélio foram secos ao ar no interior de câmara de fluxo laminar para posterior conservação em microtubos contendo sílica, a -80ºC.

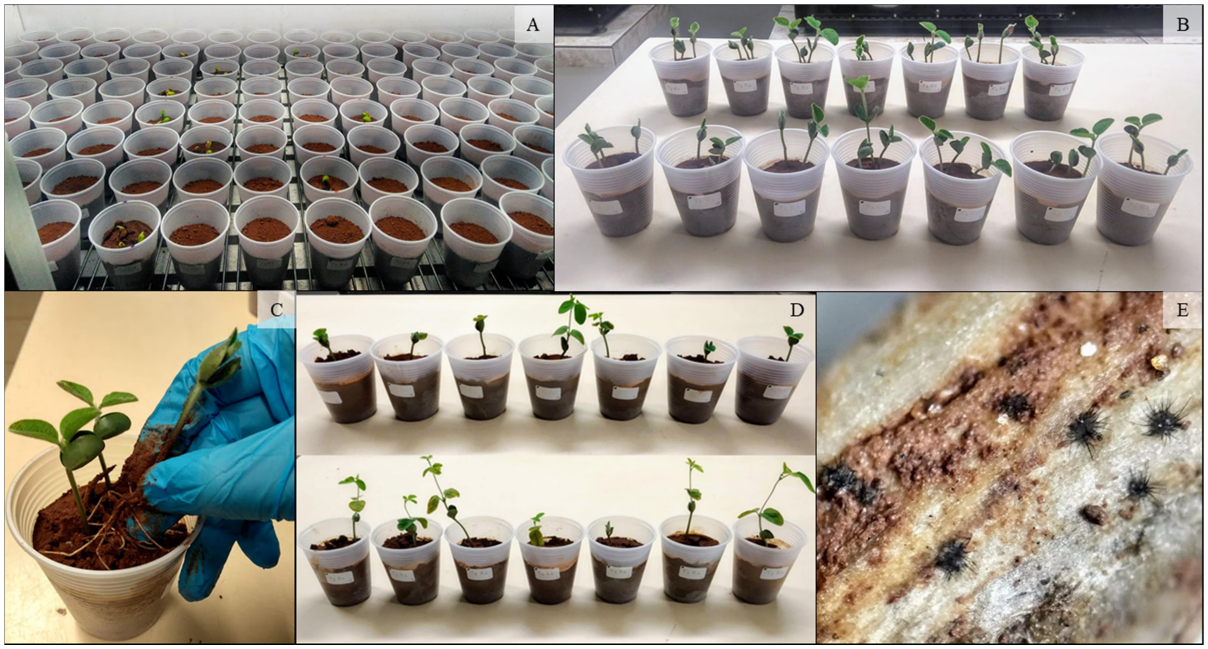

Figura 6. Vasos na câmara de crescimento com plântulas de soja da primeira época de semeadura em emergência (A), vasos com plantas aos 10 dias após a semeadura antes da realização do desbaste (B), desbaste de plântulas (C), vasos com plantas mantidas até 21 dias após a semeadura antes de serem coletadas (D), acérvulos típicos de *Colletotrichum truncatum* em raiz de planta de soja, ao estereomicroscópio, semeada em solo inoculado com microescleródios, 10 semanas após a inoculação (E).

2.2.3. Confirmação da identidade de isolados

Uma a cada duas colônias obtidas de microescleródios, com aspecto típico dos isolados utilizados na instalação do experimento na área de produção comercial de soja (2.2.1) e todas as colônias obtidas de plantas de soja ao longo do experimento conduzido em câmara de crescimento (2.2.2) tiveram o formato dos conídios observado ao microscópio óptico para a verificação de seu formato, como um indicativo de que eram de *C. truncatum*.

Colônias de isolados que permaneceram por 246 dias no campo, utilizados no teste de patogenicidade (6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2, 6IBE1-1) e também de seu reisolamento de plantas provenientes de sementes inoculadas (2.2.1.3), tiveram os conídios observados ao microscópio óptico, para a verificação de seu formato. As imagens foram registradas ao microscópio óptico com câmara acoplada (Zeiss Axioskop). Além disso, estes isolados e um outro, nomeado T7R6, obtido de uma das plantas provenientes do último momento de semeadura em solo inoculado (item 2.2.2), foram submetidos à extração de DNA e genotipagem de microssatélites (ROGÉRIO et al., 2019) para verificar se apresentavam o mesmo perfil genotípico dos isolados utilizados na instalação dos experimentos. O isolado CMES 1059 também foi submetido à mesma análise.

Após o cultivo em BDA por 2 semanas a 24ºC, com fotofase de 12 h, porções de micélio de cada um dos isolados foram recolhidas com escalpelo estéril e maceradas em

cadinho com areia estéril. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação da concentração de DNA de cada amostra e a verificação de sua qualidade, baseada nas razões de absorbância da luz na faixa de 260/280 nm e 230/260 nm, foram realizadas em espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Para verificar a qualidade do DNA, as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) imerso em tampão TBE 0,5X (Tris-Ácido bórico-EDTA), corado com SYBR Safe (Invitrogen) para observação em transluminador, sob luz ultravioleta.

Posteriormente, foram realizadas amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), separadamente para cada um de 12 locos microssatélites (SSR 01, SSR 05, SSR 10, SSR 17, SSR 29, SSR 34, SSR 42, SSR 44, SSR 53, SSR 55, SSR 56 e SSR 59) dos 13 utilizados em um estudo populacional de *C. truncatum* (ROGÉRIO et al., 2019). Os iniciadores diretos utilizados, marcados com as fluorescências 6-FAM (SSR 05 e SSR 1), VIC® (SSR 10, SSR 59 e SSR 23), PET® (SSR 44, SSR 29 e SSR 55) e NED® (SSR 34, SSR 56, SSR 01 e SSR 42), foram combinados com os respectivos iniciadores reversos, não marcados. As reações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad) em volume final de 15 µL, contendo 20 ng do DNA molde, 0,8 mM de cada iniciador, 0,15 µM de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl e 0,5 U de Taq DNA polimerase, com desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos a 95°C por 1 min, temperaturas de anelamento de 55,1^{o}C (SSR 29, SSR 59, SSR 01, SSR 55, SSR 10), 56,2 ^{o}C (SSR 17, SSR 56, SSR 53, SSR 44) ou 53,8 ^{o}C (SSR 05, SSR 34, SSR 42) por 30 s, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR em que diferentes fluorescências foram utilizadas foram misturados de modo a otimizar a genotipagem, podendo diferenciar os fragmentos amplificados pela fluorescência emitida. A genotipagem foi realizada em sequenciador capilar ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) na Universidade Estadual de Campinas, sendo que um marcador molecular de fluorescência distinta das já empregadas, GS600 LIZ (Applied Biosystems), foi adicionado às amostras. Com base na fluorescência emitida pelo marcador, os tamanhos dos fragmentos de interesse amplificados foram determinados utilizando o programa Genemarker v.1.191 (SoftGenetics).

O genótipo multilocos de cada isolado foi determinado pela combinação dos tamanhos de fragmentos amplificados em cada loco microssatélite. A comparação do tamanho dos fragmentos amplificados para os 12 locos foi utilizada para confirmar a identidade dos isolados. Para o isolado GO2-12, o tamanho dos fragmentos para os mesmos locos, também utilizados na comparação, foi obtido em outro estudo (ROGÉRIO, et al., 2019).

Adicionalmente, em análise conjunta do tamanho dos fragmentos correspondentes de 166 isolados de 10 populações brasileiras de *C. truncatum*, fornecido pelos autores do mesmo estudo, foi obtida a probabilidade de identidade, ou de surgimento ao acaso de isolados com o mesmo perfil genotípico que os isolados caracterizados, para os 12 locos considerados, utilizando o programa GenAlex v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

2.2.4. Análise de dados

O número de colônias recuperadas e não recuperadas (2.2.1) a partir do total de microescleródios avaliados para cada tempo de coleta, de cada isolado e de cada localização de permanência no solo (na superfície ou a 8 cm de profundidade) foi submetido à análise descritiva e à análise utilizando o modelo de regressão logística, em que, para cada microescleródio avaliado, foi considerada a variável resposta 1 quando se obteve colônia característica dos isolados de *C. truncatum* utilizados (microescleródios recuperados) e 0, quando não foi possível a recuperação dos isolados (microescleródios não recuperados). Com este modelo, foi obtida a distribuição de frequências das probabilidades de recuperação de cada um dos isolados, para os tempos de permanência no campo, e para a recuperação de qualquer um dos isolados, que permaneceram na superfície do solo ou a 8 cm de profundidade, para os diferentes momentos de coleta. A qualidade do ajuste do conjunto de dados ao modelo foi verificada por meio da análise de resíduos em gráfico de envelope simulado.

Os dados de isolamento a partir de plantas semeadas de forma escalonada em substrato inoculado (item 2.2.2) foram submetidos à análise descritiva.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Sobrevivência de microescleródios de *C. truncatum* em condições de campo

A viabilidade inicial média dos microescleródios utilizados para a instalação do experimento, estimada com base nos microescleródios amostrados, foi de 94% para o isolado GO2-12 e 88% para o isolado CMES 1059.

O número de microescleródios recuperados (280) corresponde a cerca de 10% do total avaliado (2896), devido ao elevado número destas estruturas das quais não foi possível obter colônia (microescleródios não recuperados). O total de microescleródios recuperados representa o total que certamente sobreviveu ao respectivo período de permanência no campo.

No entanto, o total de microescleródios não recuperados não reflete apenas o número destas estruturas que não germinaram em meio de cultura, mas também, aqueles que formaram colônias que não puderam se desenvolver a tempo de serem transferidas para meio BDA devido ao crescimento mais rápido de algum saprófita, que estivesse colonizando outro microescleródio ou aderido à sua superfície na mesma placa, apesar da observação e repicagem diária.

Além disso, outra informação relevante é a de que os valores empregados nas análises refletem o número de microescleródios possíveis de serem avaliados. Para aqueles que ficaram enterrados, o número encontrado nas bolsas foi, em geral, inferior ao de microescleródios nas bolsas que ficaram na superfície do solo (Tabela 1, Figura 7).

Tabela 1. Número de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* recuperados (viáveis) e avaliados (total), para os isolados CMES 1059 (A) e GO2-12 (B) aos 92, 120, 153, 184, 215 e 246 dias após a instalação do experimento (DAI).

DAI	Isolado	Posição de permanência no solo	Bloco I		Bloco II		Bloco III	
			Viáveis	Total	Viáveis	Total	Viáveis	Total
92	A	Superfície	0	60	1	60	23	60
		Enterrado	5	16	0	60	0	2
	B	Superfície	13	60	3	60	2	59
		Enterrado	0	4	0	9	0	2
120	A	Superfície	5	60	1	60	3	60
		Enterrado	5	20	0	7	6	12
	B	Superfície	5	60	1	60	0	60
		Enterrado	1	3	0	14	0	9
153	A	Superfície	3	60	24	60	10	60
		Enterrado	20	33	10	29	6	49
	B	Superfície	11	40	5	60	0	60
		Enterrado	0	4	8	35	0	4
184	A	Superfície	1	60	0	60	13	60
		Enterrado	0	8	2	60	0	15
	B	Superfície	1	60	1	60	3	60
		Enterrado	0	10	0	60	3	13
215	A	Superfície	3	60	2	60	6	60
		Enterrado	14	60	2	60	0	1
	B	Superfície	1	60	0	60	6	60
		Enterrado	0	9	0	13	0	3
246	A	Superfície	14	60	16	60	4	60
		Enterrado	2	16	2	60	0	11
	B	Superfície	1	60	0	60	3	60
		Enterrado	1	11	8	31	0	4

A ausência de um microescleródio inicialmente colocado no interior de uma das bolsas que permaneceu a 8 cm de profundidade pode ser devida à decomposição do

microescleródio, mas também pode ter resultado de sua quebra durante o desenterrio, mesmo que cuidadoso, seguida de escape por meio de poros do tecido. Ambas as causas possíveis, individualmente ou associadas, levaram a um menor número de microescleródios obtidos em bolsas que ficaram enterradas (Figura 7).

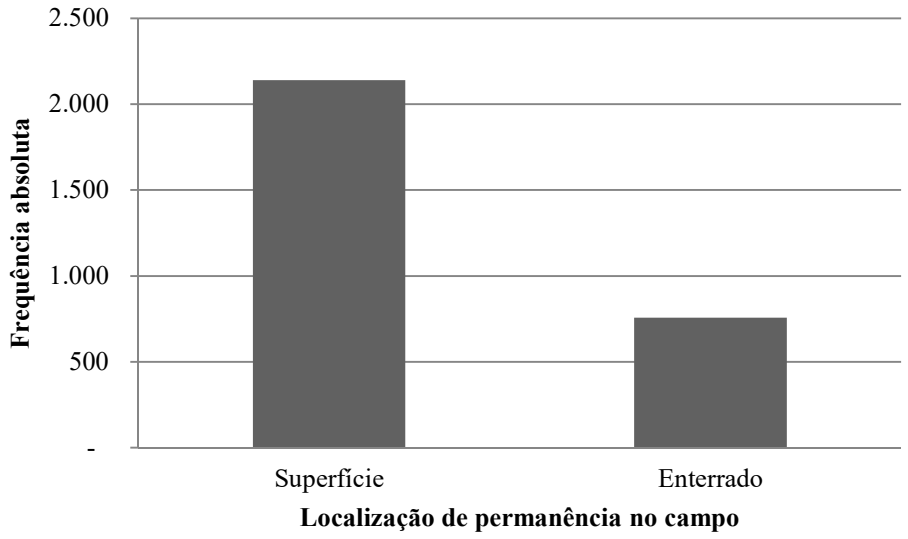

Figura 7. Frequências absolutas dos microescleródios de *Colletotrichum truncatum* avaliados por localização de permanência no campo.

Assim, é provável que existam casos em que a não recuperação de um microescleródio não significa sua morte. Pode não ter sido possível recuperar sua colônia em formação, germinando ou a germinar ao lado de um saprófita de crescimento acelerado (e estes microescleródios foram considerados nas análises, dentro da categoria não recuperados), e pode ser que o microescleródio tenha se quebrado no momento da coleta, não podendo ser avaliado e contemplado nas análises, apesar do número mínimo de 200 microescleródios terem sido inseridos em cada uma das bolsas para a instalação do experimento, e por isso o total de microescleródios inseridos nas bolsas não foi considerado (Figura 8).

Deste modo, as análises apresentadas, tanto descritiva, como utilizando o modelo de regressão logística, consideraram o número de microescleródios recuperados (que certamente sobreviveram) em relação ao número de microescleródios não recuperados (que puderam ser avaliados, dos quais não foi obtida colônia que confirmasse sua viabilidade).

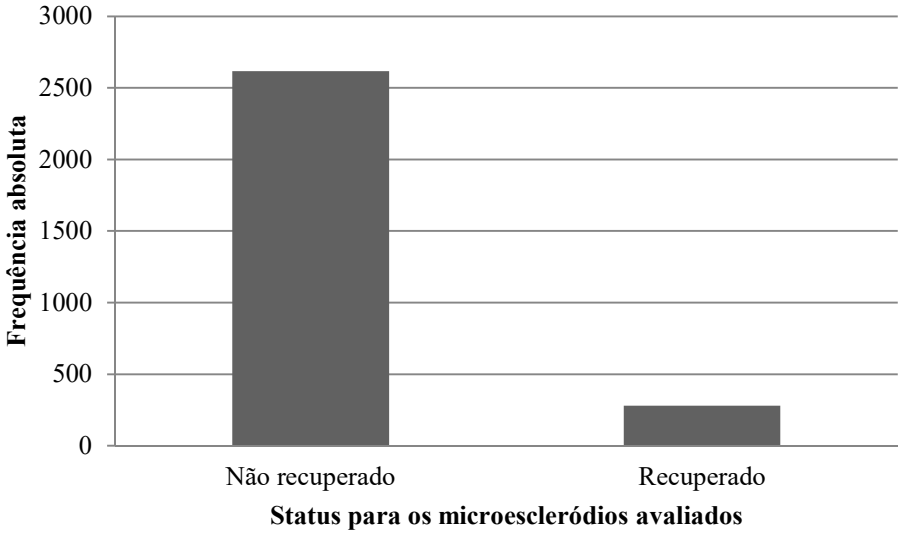

Figura 8. Frequências abolutas dos microescleródios de *Colletotrichum truncatum* avaliados por status (recuperados e não recuperados).

Considerando-se os diferentes tempos de permanência no solo, houve um maior número de microescleródios avaliados para a coleta aos 184 dias após a instalação do experimento. A maior frequência absoluta de microescleródios recuperados foi obtida com a coleta das bolsas que ficaram por 153 dias no solo (Figura 9).

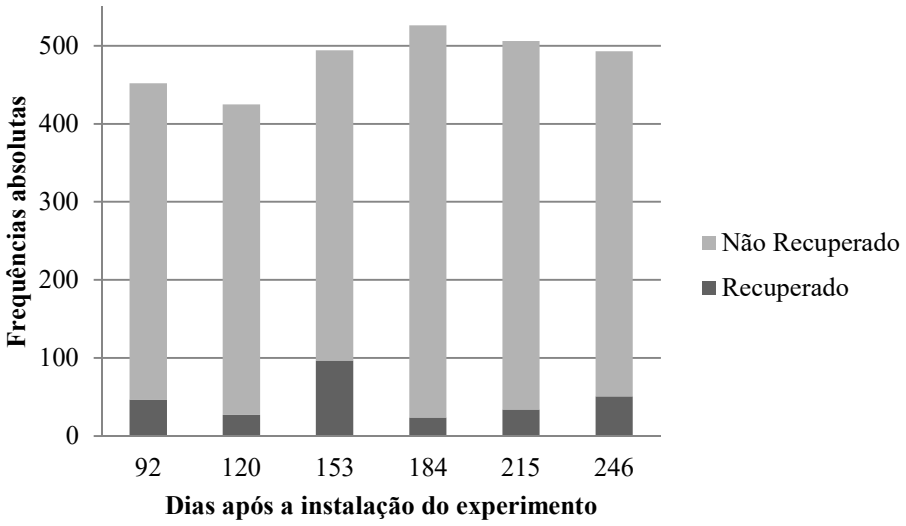

Figura 9. Número de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* recuperados e não recuperados por tempo de permanência no solo.

A frequência absoluta para microescleródios que foram avaliados no bloco II foi superior à observada nos demais blocos, apesar das frequências absolutas próximas para os três blocos, considerando-se o número de microescleródios recuperados. Assim, no bloco II, o

número de microescleródios dentro das bolsas após as coletas foi maior que nos blocos I e III (Figura 10).

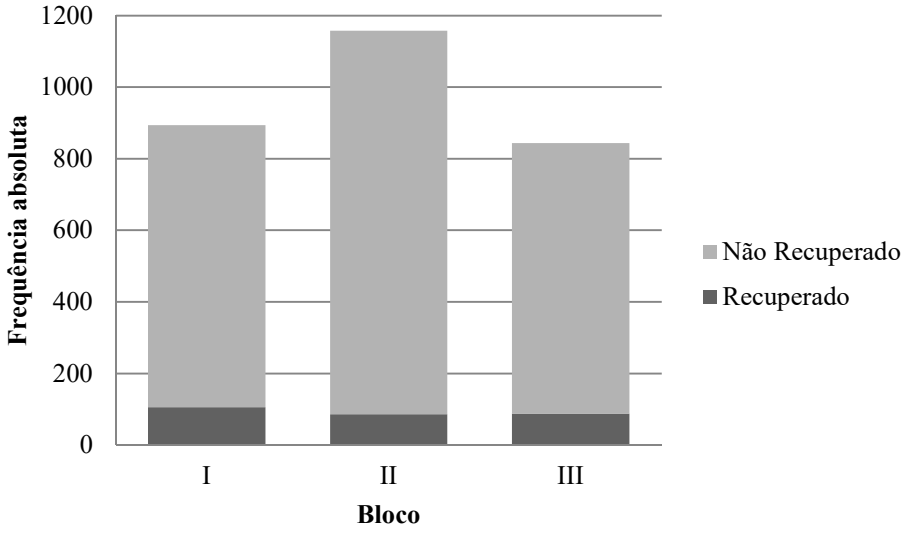

Figura 10. Número de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* recuperados e não recuperados para os três blocos em gráfico de barras empilhadas, que representam o total de microescleródios avaliados.

A estrutura da regressão logística para a análise do número de microescleródios recuperados em relação aos não recuperados, com as variáveis bloco, isolado, localização e tempo decorrido entre a instalação do experimento e a coleta de bolsas com os microescleródios, foi dada pela equação:

$$logito \frac{\pi_i}{1-\pi_i} = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \beta_3 x_{3i} + \beta_4 x_{4i} + \beta_5 x_{5i} + \beta_6 x_{6i} + \beta_7 x_{7i} + \beta_8 x_{8i} + \beta_9 x_{9i}$$

, em que π_ié a probabilidade de obter o status recuperado (obter uma colônia a partir de um microescleródio avaliado), sendo β o vetor de parâmetros desconhecidos, com as variáveis independentes: x_{1i} para bloco II, x_{2i} para bloco III, x_{3i} para isolado GO2-12, x_{4i} para a localização enterrado, x_{5i} para o tempo de 120 dias de permanência no solo, x_{6i} para 153 dias, x_{7i} para 184 dias, x_{8i} para 215 dias e x_{9i} para 246 dias. E:

$$\pi_i = \frac{exp\,(x_i^T \beta)}{1+\exp(x_i^T \beta)}$$

, em que x_i^T o conjunto das variáveis independentes listadas.

Aplicando-se os dados de recuperação ou não, de cada microescleródio avaliado ao longo do experimento ao modelo, utilizando o programa R, obteve-se a significância do parâmetro β de comparação entre os níveis de cada fator do estudo e a razão de chance (*odds ratio*, OR), para quantificar a relação entre tais níveis (Tabela 2).

Tabela 2. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança para o ajuste do modelo de regressão logística aos dados de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* recuperados em relação a não recuperados, com base no teste de Wald, para as variáveis independentes tendo como referência o Bloco I, para o fator bloco; o isolado CMES 1059 (A), para o fator isolado, a localização enterrado, para o fator localização e o tempo de 92 dias, para o fator tempo de permanência no campo.

Efeitos	Coeficientes	OR	2.5 %	97.5 %
Bloco II	β_1 ***	0.563	0.413	0.768
Bloco III	β_2	0.841	0.616	1.148
CMES 1059 (B)	β_3 ***	0.477	0.360	0.633
Superfície	β_4 *	0.702	0.529	0.931
Tempo 120	β_5 *	0.585	0.355	0.962
Tempo 153	β_6 ***	1.977	1.349	2.899
Tempo 184	β_7 **	0.424	0.254	0.708
Tempo 215	β_8 *	0.562	0.352	0.897
Tempo 246	β_9	0.998	0.654	1.523

O número de asteriscos se refere ao quanto a diferença entre os níveis comparados, para cada fator, é significativa: * para $p \leq 0{,}05$, ** para $p \leq 0{,}01$ e *** para $p \leq 0{,}001$.

A razão de chance para a recuperação de um microescleródio do bloco II em relação ao bloco I indica que há 0,56 vezes menos chance de recuperação no bloco II. Comparando-se o bloco III com o bloco I, não houve diferença significativa entre a chance de recuperação de isolados em cada um. A chance de recuperação, menor para o bloco II, parece estar associada ao maior número de microescleródios disponíveis nas bolsas coletadas neste bloco, que levou a um maior número de microescleródios avaliados (Figura 10); no entanto, é possível que o tempo que os microescleródios permaneceram a 4°C entre a coleta e a avaliação influencie a germinação de microescleródios de *C. truncatum*. Para *Claviceps purpurea*, agente causal do ergot de cereais, o período de permanência de escleródios a 4°C influenciou a ocorrência de germinação ou a taxa de germinação, de acordo com a temperatura de incubação empregada na avaliação da germinação. Para a incubação dos escleródios entre 10 e 20°C durante a germinação, a incubação prévia a 4°C, por pelo menos 2 semanas, aumentou o número de escleródios germinados. Para a temperatura de incubação durante a germinação de 25°C, a incubação a 4°C por ao menos 4 semanas foi determinante para a germinação ocorrer (UPPALA; WU; ALDERMAN, 2016). Para determinar interferência similar do período de permanência a baixas temperaturas na germinação de microescleródios de *C. truncatum*, os resultados obtidos por este trabalho não foram conclusivos, embora este não fosse um de seus objetivos. Quanto à localização de cada bloco na área do experimento, é pouco provável que tenha influenciado este resultado, já que os blocos estava dispostos lado a lado e tinham uma área pequena, cerca de $1m^2$ cada um.

Quanto ao tempo de permanência dos microescleródios no campo, a chance de recuperação foi cerca de duas vezes maior para o período de 153 dias que para o período de

92 dias. A chance de recuperação de um isolado decorridos 246 dias da instalação do experimento não diferiu da chance obtida para a coleta realizada aos 92 dias (Tabela 2).

Comparando-se os dois isolados utilizados, a chance de obter um isolado recuperado foi cerca de 0,48 vezes menor para o isolado GO2-12 que para isolado CMES 1059, apesar da viabilidade inicial estimada ter sido maior para o isolado GO2-12 (94%) que para o isolado CMES 1059 (88%). As probabilidades para a recuperação (π_i) estão de acordo com este resultado, e foram maiores para o isolado CMES 1059 para todas as coletas consideradas (Figura 11).

As maiores probabilidades de recuperação de microescleródios foram obtidas para o isolado CMES 1059 após a permanência por 153 dias no campo, com probabilidade de recuperação variando entre cerca de 23% e 30%, para 50% dos dados. A maior probabilidade de recuperação do isolado GO2-12 também foi maior para o mesmo período de permanência no campo. Estas informações sugerem a existência de dormência constitutiva. Alguma barreira dos próprios microescleródios à germinação pode ter sido rompida para um número considerável destas estruturas após 153 dias de permanência no solo. Resultado similar foi obtido para *Stromatinia cepivora*, com a média de escleródios germinados maior para o período de incubação de 6 meses no solo, comparando-se com a germinação média obtida para menores períodos de incubação (MCLEAN et al., 2005). No caso de *C. truncatum*, após o período de maiores probabilidades de obter microescleródios recuperados, de 153 dias, cerca de 5 meses, observou-se um declínio na recuperação, que pode ser devido à ocorrência de germinação de microescleródios que ainda seriam avaliados em coletas subsequentes quando ainda estavam no solo. Outras possíveis causas são a perda de viabilidade devido ao envelhecimento destas estruturas, independentemente de sua germinação e o maior período de sua exposição aos agentes de biocontrole naturalmente presentes no solo. A redução da viabilidade, a partir da coleta realizada decorridos 184 dias da instalação do experimento pode ser resultado de uma combinação destes fatores. Para o estudo com *Stromatinia cepivora* citado, não foram avaliados períodos de maior duração que o que resultou na máxima germinação de escleródios. Não foi possível notar padrão similar no isolamento de *C. truncatum* a partir de restos culturais de soja que permaneceram no campo por até 6 meses em outro estudo (ALMEIDA et al., 2001).

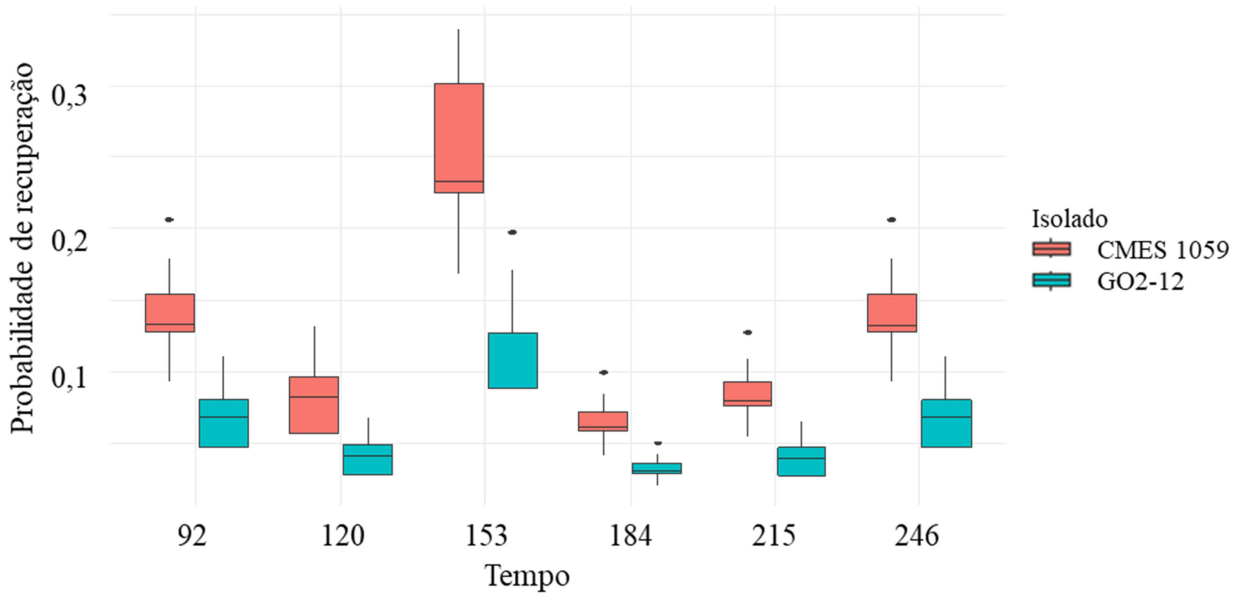

Figura 11. Probabilidade de obter isolados recuperados a partir de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* dos isolados CMES 1059 e GO2-12 para diferentes períodos de tempo de permanência no campo, em dias.

Considerando-se o local de permanência no solo, para os microescleródios recuperados e não recuperados, para 153 dias de permanência no campo, as maiores probabilidades de recuperação foram obtidas para os microescleródios mantidos enterrados, em comparação àqueles que permaneceram sobre a superfície do solo. Embora esta diferença provavelmente tenha influência do menor número de microescleródios que puderam ser submetidos à avaliação dos que estiveram enterrados, a diferença entre as temperaturas máximas do solo em sua superfície e a 8 cm de profundidade pode ter favorecido a sobrevivência dos microescleródios enterrados, já que a amplitude térmica diminui com o aumento da profundidade do solo (GASPARIM et al., 2005). Em um estudo que avaliou a infecção de plântulas de soja, semeadas em substrato contendo microescleródios de *C. truncatum* mantido a diferentes temperaturas, foi constatada maior severidade da antracnose da soja a 30ºC do que a 35ºC, que pode ser um indicativo da menor adaptabilidade do patógeno a esta temperatura mais elevada (KHAN; SINCLAIR, 1991). Em outro estudo, foi constatada menor infectividade de *C. truncatum* proveniente de restos culturais de lentilha que permaneceram na superfície do solo, em comparação aos que permaneceram enterrados a uma profundidade de 10 a 15 cm, para avaliações realizadas após períodos a partir de 12 meses no campo, no Canadá, onde os autores atribuíram a menor sobrevivência à exposição à ocorrência de molhamento e secagem dos microescleródios, repetidas vezes, à exposição a temperaturas extremas e também à radiação ultravioleta (BUCHWALDT et al., 1996).

Neste trabalho, para o período de 184 dias, em que as probabilidades de recuperação de microescleródios que ficaram na superfície do solo foram similares às obtidas para microescleródios enterrados, a mediana referente aos dados de recuperação de microescleródios enterrados teve valor superior ao correspondente para microescleródios que permaneceram na superfície do solo. De modo geral, a sobrevivência maior para microescleródios enterrados parece ter sido uma tendência para todos os períodos considerados (Figura 12).

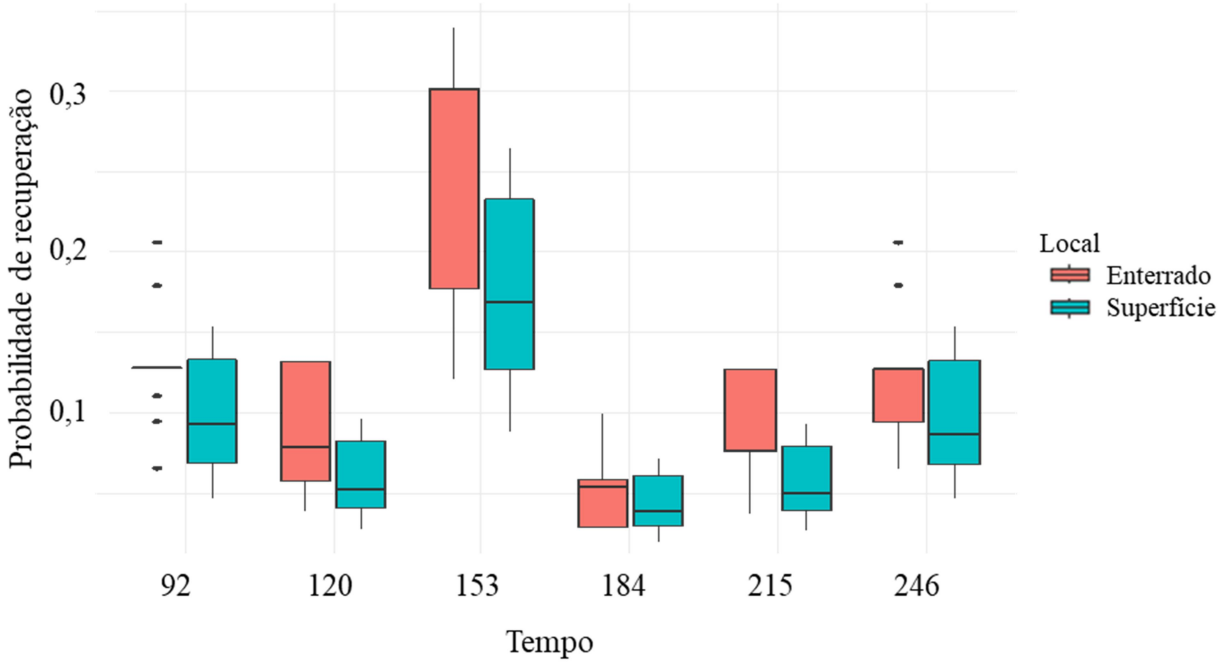

Figura 12. Probabilidades para a recuperação de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* que permaneceram por diferentes períodos de tempo, em dias, enterrados a 8 cm de profundidade ou na superfície do solo.

Para o maior período de permanência no campo considerado, de 246 dias, que equivale ao período da entressafra da soja observado na região em que os aumentos da antracnose da soja em incidência foram relatados, foram obtidas probabilidades de recuperação de microescleródios do isolado CMES 1059 de ao menos 13% (valor aproximado) para 75% dos microescleródios deste isolado que foram avaliados. Para o isolado GO2-12, as probabilidades de obter microescleródios recuperados para 50% do total avaliado deste isolado, para o período correspontente, variaram de 5% e 8%, aproximadamente (Figura 11).

Considerando-se a localização de permanência no campo, foram obtidas probabilidades de recuperação de cerca de 9,5% ou mais com base em 75% dos microescleródios que ficaram no campo por 246 dias a 8 cm de profundidade e puderam ser

avaliados. Para os microescleródios que ficaram na superfície do solo, o valor correspondente foi de ao menos 8% de probabilidade de recuperação (Figura 12). Uma análise mais detalhada destas probabilidades de recuperação, ainda não realizada, permitirá estimar a probabilidade de recuperação de um microescleródio de *C. truncatum* após cada um dos períodos de permanência no campo considerados, com base nos dados obtidos para os isolados utilizados neste estudo.

A análise dos resíduos para ajuste dos dados de recuperação ou não dos microescleródios ao modelo de regressão logística, utilizando um gráfico de envelope simulado, em que os limites do envelope representam a banda de confiança de 5%, permitiu verificar um bom ajuste ao modelo (Figura 13), validando as demais análises apresentadas.

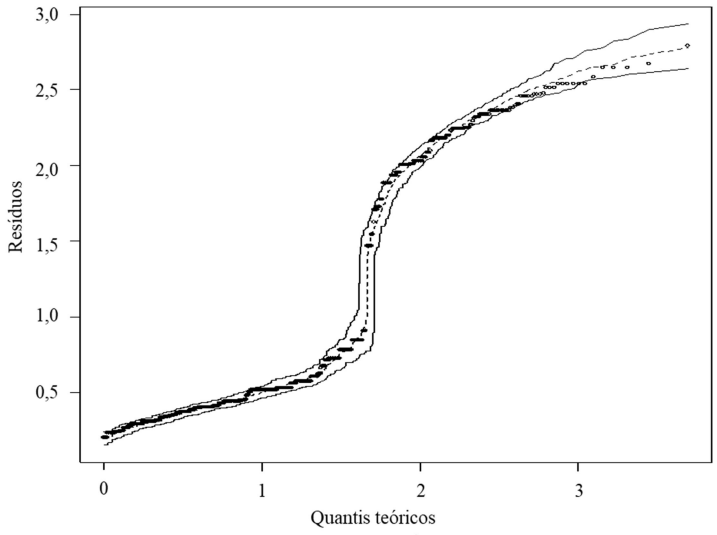

Figura 13. Gráfico de envelope simulado para os resíduos deviance.

Quanto à manutenção da infectividade dos isolados recuperados, após sua permanência por 246 dias em solo agrícola na forma de microescleródios, avaliada por meio dos testes de patogenicidade descritos, todos os isolados avaliados (6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2 e 6IBE1-1) mostraram-se patogênicos, tanto através da inoculação de sementes como da inoculação de plantas utilizando suspensões de conídios. Para as plântulas obtidas de sementes inoculadas, o reisolamento permitiu obter colônias características dos isolados utilizados (Figura 14), de todas as repetições, exceto de um dos vasos do tratamento 6IBE1-1, em que não houve emergência.

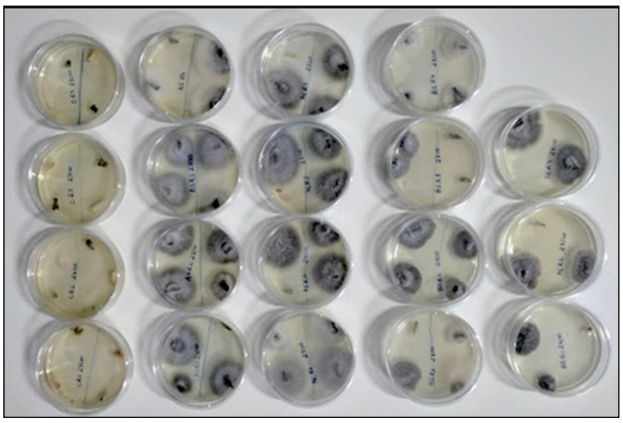

Figura 14. Reisolamento de *Colletotrichum truncatum* de plantas de soja cujas sementes foram inoculadas com isolados obtidos de microescleródios que permaneceram por 246 dias em solo agrícola

Sintomas típicos de antracnose puderam ser identificados em plantas inoculadas utilizando suspensões de conídios dos isolados 6IAS5-2, 6IAS2-1, 6IBS1-2 e 6IBE1-1, recuperados de microescleródios que permaneceram 246 dias no solo, confirmando sua patogenicidade à soja (Figura 15).

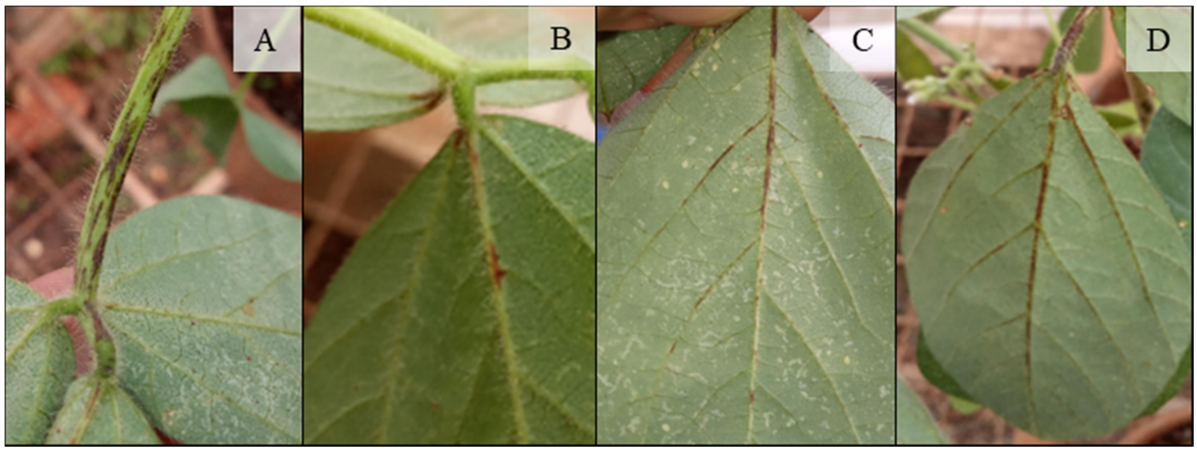

Figura 15. Sintomas de antracnose em plantas de soja inoculadas com isolados 6IAS5-2 (A), 6IAE2-1 (B), 6IBS1-2 (C) e 6IBE1-1, obtidos de microescleródios de *Colletotrichum truncatum* que permaneceram em solo agrícola por 246 dias.

2.3.1. Infectividade de microescleródios de *C. truncatum* ao longo do tempo

A viabilidade dos microescleródios utilizados para a inoculação do solo foi estimada em 100%, pois todos os microescleródios avaliados germinaram no meio de Martin.

Ao longo do experimento, não foram constatados acérvulos e não houve isolamento de *C. truncatum* a partir de plantas semeadas em solo não inoculado. Para a semeadura em solo inoculado, foi possível isolar o fungo de plantas semeadas 0, 35, 70, 105, 175, 210 e 245 dias após a inoculação do solo com microescleródios. Para o período de 140 dias, que é o

mais próximo daquele em que houve maior recuperação de microescleródios no experimento conduzido em área agrícola, não ocorreu isolamento. Provavelmente, o não isolamento para esta época de semeadura, assim como os poucos isolamentos obtidos ao longo do experimento como um todo, se devem à baixa concentração de inóculo utilizada. Outro trabalho em que se pretendeu a infecção de plantas de soja semeadas em solo inoculado, foram utilizados 80 microescleródios por grama de solo (KHAN; SINCLAIR, 1991). Embora neste trabalho a concentração de inóculo pretendida para a instalação deste experimento fosse a mesma utilizada por estes autores, limitações da capacidade máxima de produção de microescleródios por vez de uso na mesa agitadora disponível, limitações do tempo disponível para a realização da produção de maior quantidade de inóculo frente ao longo período do experimento que seria subsequente e também a dificuldade de obtenção de microescleródios bem melanizados com a metodologia de produção adotada, levaram a adoção de uma concentração de inóculo cerca de 6 vezes menor. Embora o cultivo em meio de cultura líquido de caldo de batata com alta concentração de dextrose tenha resultado em produção de microescleródios bem melanizados em um teste prévio, a reprodução da metodologia não resultou sempre nos mesmos resultados. Em algumas das tentativas de produzir microescleródios nestas condições, não ocorreu sua completa melanização. Os fatores que afetam a produção de microescleródios deste fungo ainda não estão esclarecidos, e podem constituir objeto de estudo futuro. Em contrapartida, este estudo permitiu constatar que a infecção de plantas de soja a partir de microescleródios ocorre mesmo a baixas concentrações, o que é um indicativo de que estas estruturas podem apresentam importância epidemiológica no patossistema em questão, mesmo que em baixas concentrações no solo. Os dados de isolamento obtidos com as avaliações deste experimento têm maior valor qualitativo e a infecção de duas plantas de soja (uma de cada vaso) semeadas 245 dias após a inoculação do solo com microescleródios mostrou que estas estruturas sobreviveram e permaneceram infectivas por período correspondente à duração da entressafra da soja.

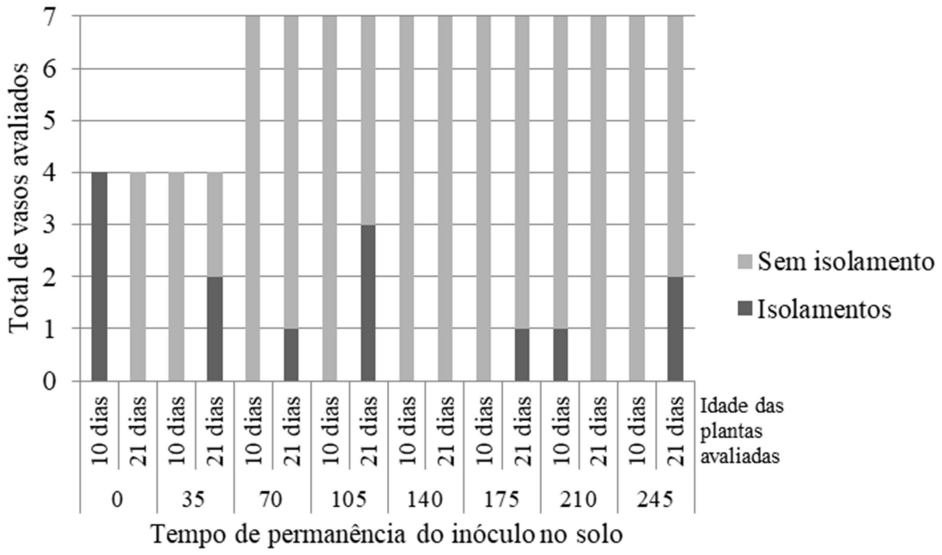

Figura 16. Frequências absolutas para presença e ausência de isolamentos de *Colletotrichum truncatum* em plantas de 10 e 21 dias de idade, para diferentes períodos de permanência do inóculo no solo.

2.3.2. Confirmação da identidade de isolados

Foram obtidas 280 colônias típicas dos isolados de *C. truncatum* utilizados (GO2-12 e CMES 1059), a partir dos microescleródios que permaneceram na área de produção de soja (item 2.3.1). As 140 colônias que tiveram seus conídios observados ao microscópio apresentaram conídios falcados. Quanto ao teste de patogenicidade com os isolados 6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2 e 6IBE1-1, os conídios dos isolados obtidos das plantas inoculadas via semente mostraram-se indistinguíveis daqueles das colônias utilizadas na inoculação (Figura 17).

Para o outro experimento, em que foi estudada a infectividade de microescleródios ao longo do tempo, em condições controladas (2.3.2), todas as colônias obtidas, típicas do isolado utilizado na inoculação do solo (GO2-12), apresentaram conídios falcados (Figura 17).

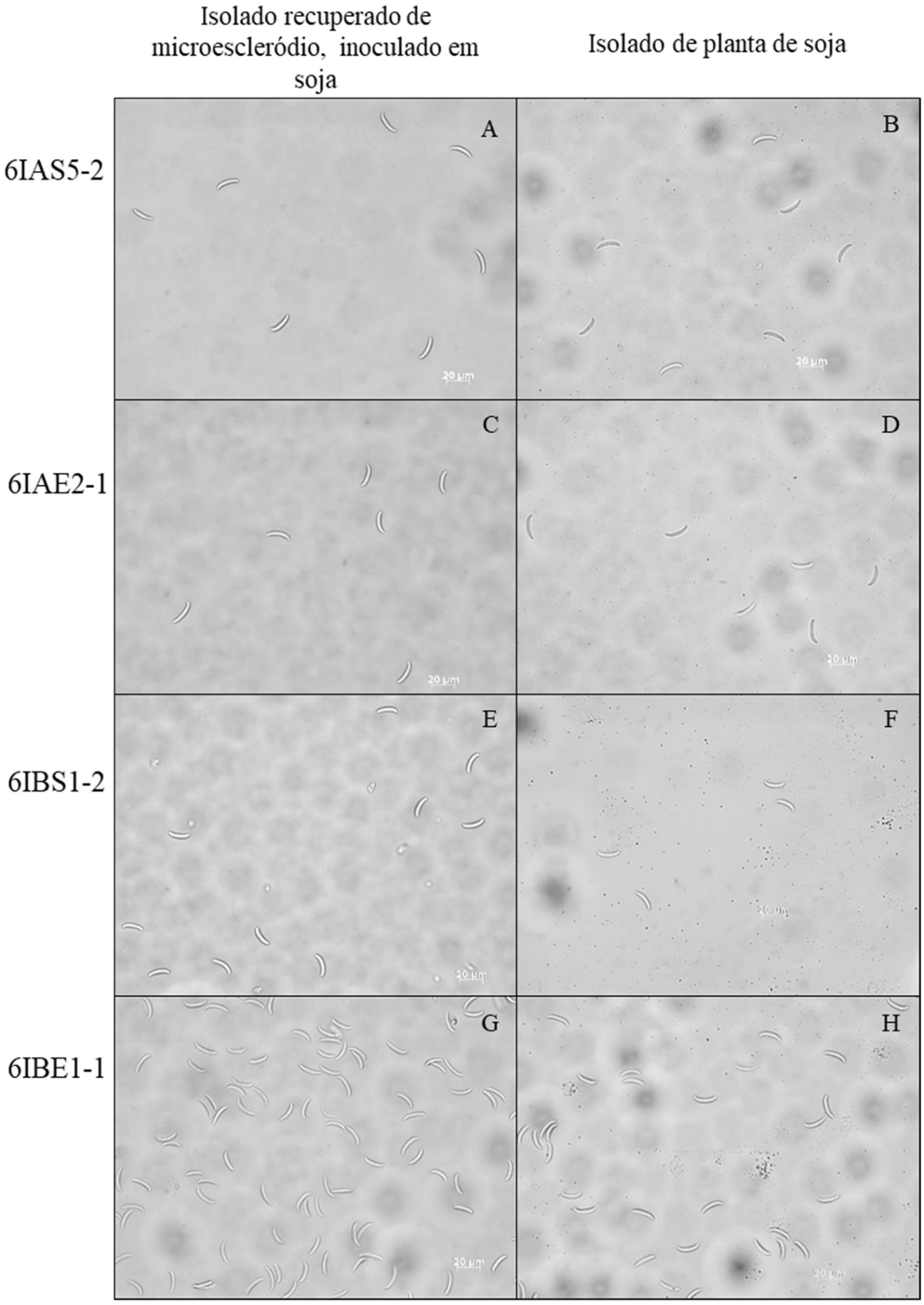

Figura 17. Conídios falcados de isolados de *Colletotrichum truncatum* recuperados de microescleródios e inoculados em soja: 6IAS5-2 (A), 6IAE2-1(C), 6IBS1-2 (E) e 6IBE1-1(G) e dos respectivos isolados das plantas de soja inoculadas (B, D, F e H).

A análise conjunta do tamanho dos fragmentos amplificados para 12 locos microssatélites permitiu verificar perfil genético idêntico entre os isolados 6IAS 5-2, 6IAE2-1, recuperados de microescleródios, e o isolado CMES 1059, a partir do qual foram produzidos os microescleródios, assim como entre os isolados 6IBS1-2, 6IBE1-1

(recuperados de microescleródios), T7R6 (recuperado a partir de planta infectada em solo inoculado com microescleródios 245 dias antes da semeadura) e GO2-12 (utilizado na produção de microescleródios nos tratamentos correspondentes destes experimentos) (Tabela 3). As probabilidades cumulativas de ocorrência ao acaso da coincidência destes perfis, obtida utilizando o programa GenAlex v.6.5, foi próxima de zero, (Tabela 3), indicando que os isolados recuperados nos dois experimentos são exatamente os mesmos utilizados em suas instalações e sobreviveram pelo período de 8 meses na forma de microescleródios.

Tabela 3. Perfil genético para 12 locos microssatélites de isolados de *Colletotrichum truncatum* (CMES 1059 e GO2-12) recuperados a partir de microescleródios mantidos por 246 dias em solo agrícola (6IAS5-2, 6IAE2-1, 6IBS1-2, 6IBE1-1) e recuperado de planta de soja semeada em solo 245 dias após a inoculação com microescleródios (T7R6), e probabilidade cumulativa de ocorrência ao acaso do mesmo genótipo (P).

Isolado	Microssatélite												P
	SSR 01	SSR 05	SSR 10	SSR 17	SSR 29	SSR 34	SSR 42	SSR 44	SSR 53	SSR 55	SSR 56	SSR 59	
6IAS5-2	154	134	155	167	201	172	173	181	136	145	154	167	$1,4 \times 10^{-58}$
6IAE2-1	154	134	155	167	201	172	173	181	136	145	154	167	$1,4 \times 10^{-58}$
CMES 1059	**154**	**134**	**155**	**167**	**201**	**172**	**173**	**181**	**136**	**145**	**154**	**167**	$1,4 \times 10^{-58}$
6IBS1-2	154	134	155	167	201	172	173	179	136	145	154	191	$3,3 \times 10^{-51}$
6IBE1-1	154	134	155	167	201	172	173	179	136	145	154	191	$3,3 \times 10^{-51}$
T7R6i	154	134	155	167	201	172	173	179	136	145	154	191	$3,3 \times 10^{-51}$
GO2-12	**154**	**134**	**155**	**167**	**201**	**172**	**173**	**179**	**136**	**145**	**154**	**191**	$3,3 \times 10^{-51}$

Assim, foi comprovada a sobrevivência de *C. truncatum* na forma de microescleródios durante o período que corresponde à duração da entressafra da soja na principal região de produção da cultura do Brasil.

A hipótese de que três eventos fundadores podem justificar a alta variabilidade em populações de *C. truncatum* neste país (ROGÉRIO et al., 2019) é amparada por este trabalho. Embora não tenha sido estimada a data destes eventos, os autores supõem que o primeiro deles tenha sido com a introdução de germoplasma de soja dos Estados Unidos no Brasil, mas não fazem indagações da época de ocorrência dos outros dois. Na época provável do primeiro evento, não se praticava um período de entressafra de 8 meses para a soja, de modo que o inóculo não necessitaria de mecanismos de sobrevivência que a garantissem por longo tempo para se perpetuar no campo (embora eventualmente pudesse fazê-lo por meio de sementes infectadas que retornassem à mesma área de cultivo na safra seguinte). No entanto, qualquer um dos outros dois eventos poderia ser de ocorrência mais recente, mesmo com o uso de sementes livres dos isolados de *C. truncatum* presentes em uma área e com a duração da entressafra de 8 meses, os isolados já presentes podem permanecer no campo por meio da sobrevivência na forma de microescleródios. Ainda que após o período considerado neste

estudo estas estruturas percam a viabilidade, a perpetuação dos isolados em uma área pode ocorrer pela infecção das plantas de soja da safra que se inicia 8 meses após a colheita da anterior, com posterior nova formação de microescleródios nas plantas de soja infectadas.

2.4. CONCLUSÕES

C. truncatum foi capaz de sobreviver na forma de microescleródios em solo de área de produção comercial de soja em sucessão com milho durante 8 meses. Microescleródios de *C. truncatum* mantiveram-se infectivos após 8 meses de permanência no solo em condições controladas e a análise do perfil genotípico para 12 locos microssatélites dos isolados recuperados após este período dá suporte a estas afirmações. Verificou-se também que isolados recuperados de microescleródios que sobreviveram por 8 meses no campo mantiveram-se patogênicos à soja.

Assim, microescleródios de *C. truncatum* podem atuar como inóculo primário da antracnose da soja na principal região de produção no Brasil, em que a entressafra da soja é de 8 meses.

2.5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Á. M. R. et al. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1231-1238, 2001.

BARBIERI, M. C. G.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; MORAES, S. R. G.; BONALDO, S. M.; ROGÉRIO, F.; LINHARES, R. R.; MASSOLA, N. S. First Report of *Colletotrichum cliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, 2017.

BLAKEMAN, J. P.; HORNBYT, D. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia ad conidia. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, n. 2, p.227-240, 1966.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes.** Brasília. 2009.

BUCHWALDT, L.; MORRALL, A. A.; CHONGO, G.; BERNIER, C. C. Windborne Dispersal of *Colletotrichum truncatum* ans Survival in Infested Lentil Debris. **Phytopathology**, v. 86, p. 1193–1198, 1996.

CHEN, L. S. L. S. C.; CHU, C. C. C.; LIU LIU, C. D. C. D.; CHEN, R. S. R. S. C.; TSAY TSAY, J. G. J. G. PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n.11-12, p. 654662, 2006.

COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p. 65-92, 1971.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: CONAB, 2019. v.6.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, 2003.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1–46, 1 mar. 2019.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, 2016.

DOBSON, A. J.; BARNETT, A. G. **An introduction to Generalized Linear Models.** 3. ed. Nova Iorque: Chapman & Hall, 2008. 307 p.

FORSEILLE, L.; PENG, G.; WEI, Y.; GOSSEN, B. D. Molecular and morphological differentiation of *Colletotrichum truncatum* from scentless chamomile and selected crop species. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 512–524, 2011.

GARDINA, J.; LITTRELL, R. H.; HANLIN, R.T. Anthracnose of Florida Beggarweed (*Desmodium tortuosum*) Caused by *Colletotrichum truncatum*. **Cambridge University Press**, v.36, n.3, p.329-334. 1988

GASPARIM, E. et al. Temperatura no perfil do solo utilizando duas densidades de cobertura e solo nu. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 1, 2005.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V.; Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de Fitopatologia.** v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. cap.67, p. 657-675.

HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; SINCLAIR, J. B. Incidence of *Colletotrichum* spp. on Soybeans and Weeds in Illinois and Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 70, n. 8, p. 780–782, 1986.

JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 879–884, 1995.

KHAN, M.; SINCLAIR, J. B. Effect of Soil Temperature on Infection of Soybean Roots by Sclerotia Forming Isolates of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 75, n. 12, p. 1282–1285, 1991.

MAHMODI, F.; KADIR, J. B.; WONG, M. Y.; NASEHI, A.; PUTEH, A.; SOLEIMANI, N. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 841–841, 2013.

MCLEAN, K. L. et al. Dormancy of *Sclerotium cepivorum* Sclerotia in New Zealand Soils. **New Zealand Plant Protection** v. 58, p. 245-250, 2005.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** v. 28, p.2537-2539, 2012.

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

ROGÉRIO, F.; CAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA JR., N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2. p. 402–415, 2017.

ROGÉRIO, F.; GLADIEUX, P.; MASSOLA JR, N. S.; CAMPI-GUILLARDI, M. Multiple introductions without admixture of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Phytopathology**, v. 109, n. 4. 2019

SCHNEIDER, R. W. et al. *Colletotrichum truncatum* Borne Within the Seedcoat of Soybean. **Phytopathology**, v. 64, p.154-155, 1974.

SHORT, D. P. G.; SANDOYA, G.; VALLAD, G. E.; KOIKE, S. T.; XIAO, C.-L.; WU, B.-M.; GURUNG, S.; HAYES, R. J.; SUBBARAO, K. V. Dynamics of *Verticillium* Species Microsclerotia in Field Soils in Response to Fumigation, Cropping Patterns, and Flooding. **Phytopathology**, v. 105, n. 5, p. 638–645, 2015.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in Soil and in Residue of Soybean. **Phytopathology**, v. 70, p. 13–17, 1980.

SINCLAIR, J. B. Latent Infection of Soybean Plant and Seeds by Fungi. **Plant Disease**, v. 75, n. 3, p. 220-224, 1991.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; DA SILVA MATOS, K.; DE ANDRADE LIMA, G. S.; BESERRA, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

UNITED STATES OF AGRICULTURE - USDA. World Agricultural Production. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2019.

UPPALA, S.; WU, B. M.; ALDERMAN, S. C. Effects of Temperature and Duration of Preconditioning Cold Treatment on Sclerotial Germination of *Claviceps purpurea.* **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2080-2086, 2016.

VIEIRA, B. S.; DIAS, L. V. S. A.; LANGONI, V. D.; LOPES, E. A. Liquid fermentation of *Colletotrichum truncatum* UFU 280, a potential mycoherbicide for beggartick. Australasian **Plant Pathology**, v. 47, p. 277– 283, 2018.

YANG, H.-C.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. **Compendium of soybean diseases and pests.** 5.ed. St. Paul: APS Press, 2016.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First Report of *Colletotrichum chlorophyti* Causing Soybean Anthracnose. **Plant Disease**, v. 96, n. 11, p. 1699–1699, 2012.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. Multiplex Real-time PCR Detection and Differentiation of *Colletotrichum* Species Infecting Soybean. **Plant Disease**, v.99, n. 11, p. 1559–1568, 2015.

WEIDEMANN, G. J.; TEBEEST, D. O.; CARTWRIGHT, R. D. Host Specificity of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* and *C. truncatum* in the Leguminosae. **Phytopathology**, v. 78, p. 986– 990, 1988.

3. SOBREVIVÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DA SOJA, EM *DIGITARIA INSULARIS* E *IPOMOEA* SP.

RESUMO

A soja abastece a indústria de alimentos e a produção pecuária e é uma das principais culturas agrícolas do mundo. O aumento da incidência da antracnose da soja vem preocupando produtores do grão no Brasil, que é o segundo maior produtor mundial de soja. A etiologia desta doença é atribuída a várias espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo *Colletotrichum truncatum* a principal delas. Sua sobrevivência em plantas daninhas de ocorrência comum e difícil controle como *Digitaria insularis* (capim-amargoso), que apresenta resistência a glifosato e *Ipomoea* sp. (corda-de-viola), naturalmente tolerante a este herbicida, pode estar associada ao aumento da importância da doença. Os objetivos deste trabalho foram verificar se *C. truncatum* pode sobreviver em plantas de *D. insularis* por períodos de 30 e 60 dias e verificar se isolados de capim-amargoso e corda-de-viola coletadas em uma área de produção comercial de soja com incidência de antracnose, são patogênicos à soja. Foram realizados dois experimentos em que plantas de *D. insularis* foram inoculadas com suspensão de conídios do isolado de *C. truncatum* GO2-12 e cultivadas em estufa, tentando-se o reisolamento aos 30 e 60 dias após a inoculação. Considerando-se os dois experimentos, colônias típicas de *C. truncatum* foram obtidas de 14 plantas de *D. insularis* aos 30 dias após a inoculação e aos 60 dias, a partir de uma planta. Isolados recuperados nestes ensaios e obtidos de capim-amargoso e corda-de-viola provenientes do campo mostraram-se patogênicos à soja. A genotipagem de 12 locos microssatélites levou à obtenção de perfis genotípicos idênticos entre os isolados recuperados de capim-amargoso inoculado e o utilizado na inoculação (GO2-12), comprovando que correspondem ao mesmo isolado. Características morfológicas e a amplificação do DNA utilizando um iniciador de nucleotídeos espécie-específico indicam que três isolados destas plantas daninhas provenientes do campo são de *C. truncatum*. Concluiu-se que *D. insularis* e *Ipomoea* sp. podem ser fontes de inóculo para a antracnose da soja.

Palavras-chave: Capim-amargoso; Corda-de-viola; Plantas daninhas; Fungo fitopatogênico; *Glycine max;* Resistência a herbicidas

ABSTRACT

Soybean supplies the food industry and livestock and is one of the main crops in the world. Increasing incidence of soybean anthracnose has been worrying producers in Brazil, which is the second largest producer of this crop worldwide. The etiology of this disease is attributed to several species of the genus *Colletotrichum*, being *Colletotrichum truncatum* the main one. Its survival in weeds of common occurrence and difficult to control as *Digitaria insularis* (sourgrass), which presents resistance to glyphosate and *Ipomoea* sp. (morning glory), naturally tolerant to this herbicide, may be associated with the increased importance of the disease. The aims of this work were to verify whether *C. truncatum* can survive in *D. insularis* plants for periods of 30 and 60 days and to verify if isolates of sourgrass and morning glory collected in a commercial soybean production area with incidence of anthracnose, are pathogenic to soybean. Two experiments were carried out in which *D. insularis* plants were inoculated with conidial suspension of the *C. truncatum* (GO2-12 strain) and grown in a greenhouse, trying to be isolated at 30 and 60 days after inoculation. Considering both experiments, typical *C. truncatum* colonies were obtained from 14 *D. insularis* plants at 30 days after inoculation and at 60 days from one plant. Isolates recovered from these trials and isolates obtained from sourgrass and morning glory from the field were

pathogenic to soybean. The genotyping of 12 microsatellite loci led to the obtaining of identical genotypic profiles between the isolates recovered from inoculated sourgrass and the one used for inoculation (GO2-12), proving that they correspond to the same strain. Morphological characteristics and DNA amplification using a specie-specific primer indicate that three field weed isolates are from *C. truncatum*. It was concluded that *D. insularis* and *Ipomoea* sp. may be sources of inoculum for soybean anthracnose.

Keywords: Sourgrass; Morning glory; Weeds; Plant pathogenic fungi; *Glycine max*; Herbicide resistant

3.1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo e seu cultivo tem compromisso com a segurança alimentar, com sua produção destinada, principalmente, à indústria alimentícia e à pecuária. Na safra 2018/2019, da produção mundial de 358,2 milhões de toneladas, mais de 117 milhões foram produzidas no Brasil (USDA, 2019). Na maior região produtora deste país, Centro-Oeste (CONAB, 2019), a antracnose da soja vem ganhando importância com aumentos em incidência, indicando uma ineficácia do controle químico (ROGÉRIO et al., 2019), já observada previamente na região Norte, onde as perdas de produtividade devido à doença foram quantificadas em 90 kg/ha para cada 1% de aumento em incidência (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

A antracnose da soja é causada por diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo que *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore é a de maior importância (YANG; HARTMAN, 2016). *C. truncatum* pode sobreviver em sementes infectadas (SCHNEIDER et al., 1974), restos culturais (ALMEIDA et al., 2001; BUCHWALDT et al., 1996) e plantas daninhas (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986); sua disseminação ocorre por meio de respingos, que carregam conídios a partir de acérvulos com setas pretas, onde são produzidos. Não há relatos de ocorrência de fase sexuada para esta espécie (KATOCH et al., 2017; ROGÉRIO et al., 2019). A infecção ocorre com penetração direta após a germinação do conídio, na presença de água, e formação de apressório, posteriormente o patógeno apresenta uma fase biotrófica e outra necrotrófica na colonização (BHADAURIA et al., 2013). Os sintomas da doença incluem necrose de nervuras e pecíolos, manchas necróticas de formato irregular em hastes, além de retorcimento e abortamento de vagens (GODOY et al., 2016; ROGÉRIO et al., 2017).

Além da soja, é conhecido que este patógeno pode infectar outras leguminosas cultivadas (WEIDEMANN; TEBEEST; CARTWRIGHT, 1988; SOUSA et al., 2018) e diferentes espécies de plantas daninhas (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986;

GARDINA; LITTRELL; HANLIN, 1988; JACKSON; SCHISLER, 1995; HYNES et al., 2010; FORSEILLE et al., 2011; BOYETTE et al., 2012; VIEIRA et al., 2018).

Além do aumento da importância da antracnose, os crescentes relatos de populações de plantas daninhas com resistência a herbicidas também preocupam produtores de soja e são atribuídos, principalmente, ao manejo inadequado de plantas invasoras em culturas resistentes a glifosato. Entre as espécies de daninhas mais frequentemente encontradas nas áreas de produção de soja estão o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), que apresenta resistência a glifosato, e a corda-de-viola (*Ipomoea spp.*), naturalmente tolerante a este herbicida (LUCIO et al., 2019).

D. insularis (L.) Fedde (capim-amargoso) é uma planta herbácea e perene, sua multiplicação pode ser tanto por sementes como por rizomas (LORENZI, 2014) e é uma das espécies que têm a evolução da resistência a herbicidas monitorada pelo Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas (HRAC). Em áreas de produção de soja que apresentam biótipos de capim-amargoso resistentes a glifosato, os custos de controle são, em média, 165% mais elevados quando comparados a áreas sem resistência (ADEGAS et al., 2017). Além da resistência a glifosato (inibidor da EPSP sintetase), esta espécie teve resistência relatada a fenoxaprope-P-etílico e haloxifope-P-metílico (inibidores da ACCase) (HEAP, 2019). Populações de capim-amargoso não controladas pela dose recomendada de cletodim (inibidor da ACCase) também foram identificadas (LICORINI et al., 2015).

A corda-de-viola é uma planta herbácea e anual que se multiplica por sementes (LORENZI, 2014). Suas sementes apresentam dormência e diferentes fluxos de germinação, o que dificulta seu controle (OGUNWENMO; UGBOROGHO, 1999). Por ser uma trepadeira, é comum encontrá-la enrolada em hastes e folhas de plantas de soja em campos de produção. *C. truncatum* já foi isolado de *Ipomoea hederacea* e *I. purpurea* nos Estados Unidos (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986) e o contato íntimo da corda-de-viola com a soja poderia facilitar a disseminação de *C. truncatum* do hospedeiro alternativo para o hospedeiro principal, caso a corda-de-viola esteja infectada.

Assim, não é improvável que a dificuldade de controle de algumas plantas daninhas esteja associada ao aumento da antracnose observado nas áreas de produção de soja, ao constituírem fontes de inóculo desta doença. Embora não haja monocotiledôneas entre as demais espécies de plantas daninhas descritas como hospedeiras de *C. truncatum*, a sobrevivência de outro fitopatógeno do mesmo gênero, *C. abscissum*, antes classificado como *C. acutatum* (CROUS et al., 2015), foi relatada em capim-amargoso (FRARE et al., 2016).

Os objetivos deste trabalho foram verificar se *C. truncatum* pode sobreviver em plantas de capim-amargoso durante 30 e 60 dias, e confirmar a patogenicidade à soja de um isolado de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) e de três isolados de corda-de-viola (*Ipomoea* sp.), oportunamente obtidos a partir de plantas provenientes de uma área de produção comercial de soja.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Sobrevivência de *C. truncatum* em capim-amargoso

3.2.1.1. Obtenção de plantas e inoculação

Foram realizados dois experimentos com a inoculação de plantas de capim-amargoso. Sementes de capim-amargoso (0,25 g), obtidas da empresa Agrocosmos, foram testadas quanto à ausência de *C. truncatum* (BRASIL, 2009) e semeadas em bandejas contendo substrato autoclavado, composto por solo, areia e esterco de curral (1:1:1). As bandejas foram mantidas em estufa com irrigação duas vezes por dia para a produção de mudas. Quando as mudas atingiram cerca de 5 cm de altura, foi realizado o plantio em vasos de 5 L de capacidade, com o mesmo substrado. No primeiro experimento, foram utilizadas duas mudas por vaso, em 11 vasos e, no segundo, uma muda por vaso, em 10 vasos.

Para ambos experimentos, as plantas foram cultivadas em estufa e, quando atingiram um número de folhas de ao menos 10 por vaso, foram levadas a uma sala para a inoculação, em que foi utilizada uma suspensão de conídios de *C. truncatum* do isolado GO2-12, proveniente de uma planta de soja de Goiás (ROGÉRIO et al, 2019). No dia da inoculação do primeiro experimento (29/03/19) e do segundo (18/07/19), a suspensão foi obtida a partir de uma colônia com 3 semanas de idade (cultivada em meio de cultura BDA, a 24°C, com fotofase de 12 h), por meio da adição de água destilada estéril e raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalsky. A suspensão obtida foi filtrada em gaze, teve a concentração de conídios estimada utilizando uma câmara de Neubauer e foi diluída para a concentração de 10^5 conídios/mL.

No primeiro experimento, 4 plantas de capim amargoso foram colocadas na posição horizontal e tiveram suas folhas fixadas em placas de poliestireno expandido (isopor), utilizando fita adesiva e grampos, mantendo-se a face abaxial voltada para cima, e 7 plantas foram mantidas em sua posição normal (Figura 1). As 4 plantas colocadas na posição horizontal e 4 das que ficaram na posição normal foram inoculadas. As 3 que ficaram na

posição normal restantes foram utilizadas como controle, utilizando-se água destilada estéril em vez de suspensão de inóculo. As folhas das plantas tiveram regiões de cerca de 1,5 cm de diâmetro na superfície demarcadas com caneta permanente (na face abaxial das plantas na posição horizontal e adaxial das plantas na posição normal). Posteriormente, foi realizada a desinfestação superficial destas regiões utilizando um algodão embebido em etanol (70%) e, em seguida, outro com hipoclorito de sódio (0,5%), conforme realizado em experimento similar (FRARE et al., 2016), e uma borracha adesiva com centro furado foi fixada sobre as folhas, com o furo coincidindo com as áreas demarcadas, onde foram depositados 70 µL da suspensão de conídios (plantas inoculadas) ou o mesmo volume de água destilada estéril (controle). A inferência da viabilidade dos conídios utilizados foi obtida por meio da contagem de conídios germinados e não germinados em meio de cultura ágar-água, 12 horas após a adição de 4 alíquotas da suspensão sobre sua superfície. As alíquotas foram adicionadas na direção de regiões demarcadas com caneta permanente no verso da placa de Petri, que permaneceu na sala de inoculação, juntamente com as plantas. Decorrido este período, foi utilizada uma gota de lactoglicerol azul para paralisar a germinação. Durante a observação ao microscópio óptico, foram considerados germinados os conídios com tubo germinativo de tamanho no mínimo duas vezes maior que seu comprimento e foram contabilizados 100 conídios por gota.

Figura 1. Inoculação de *Colletotrichum truncatum* em capim-amargoso no primeiro experimento com plantas na posição horizontal (A a E) e vertical (G e H). Desinfestação superficial (A), local de inoculação demarcado com caneta permanente (B), borracha adesiva fixada sobre folha, com furo delimitando a área de inoculação (C), folhas de capim-amargoso preparadas para a inoculação (D), folhas inoculadas com áreas de inoculação cobertas por fita crepe (E), inoculação em folha de planta que permaneceu na posição vertical (F) e fechamento da região de inoculação com fita crepe (G).

No segundo experimento, as dez plantas utilizadas foram colocadas na posição horizontal e tiveram as folhas fixadas em placas de poliestireno expandido com a face abaxial

voltada para cima (Figura 2). Todas as folhas fixadas foram envolvidas por um anel de fita adesiva amarela, para facilitar a identificação das folhas inoculadas posteriormente. Assim como no primeiro experimento, foi realizada a demarcação das regiões das folhas para a deposição da suspensão de inóculo. Sete plantas foram inoculadas e três foram utilizadas como controle, sobre as quais foi utilizada água destilada estéril. A inoculação foi realizada depositando-se 70 µL da suspensão de conídios diretamente sobre a superfície foliar, sem prévia desinfestação, para o caso de a desinfestação romper alguma barreira que eventualmente poderia conferir resistência do capim-amargoso à infecção, e sem a fixação de borracha adesiva, de uso anteriormente constatado desnecessário para a inoculação de plantas na posição horizontal. A estimativa da viabilidade de conídios foi realizada da mesma maneira que no primeiro experimento.

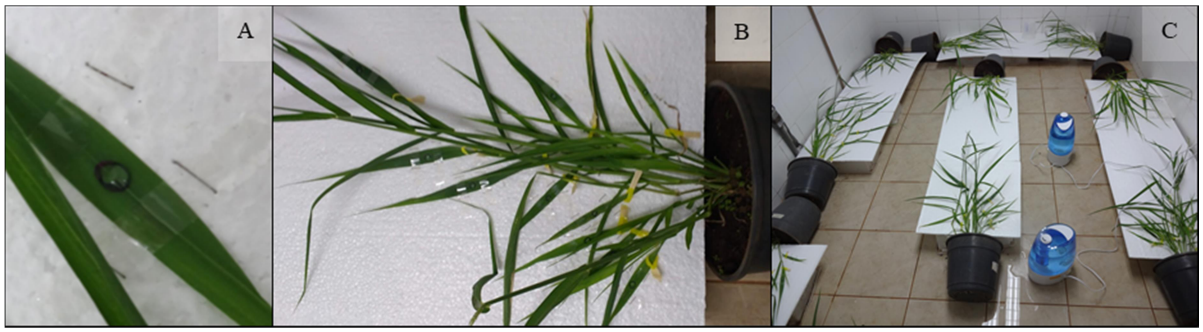

Figura 2. Inoculação de *Colletotrichum truncatum* em capim-amargoso no segundo experimento: Suspensão de conídios depositada sobre área da folha demarcada (A), planta na posição horizontal com folhas inoculadas identificadas com fita amarela (B) e sala de inoculação durante o uso (C).

Para ambos experimentos, as plantas inoculadas foram mantidas por 36 horas em câmara úmida após a inoculação, com um umidificador na sala. Em seguida, as borrachas adesivas utilizadas no primeiro experimento foram removidas, assim como as fitas adesivas e grampos utilizados nos dois experimentos. Posteriormente, as plantas foram levadas a uma estufa, onde foram dispostas de forma aleatorizada e cultivadas por 2 meses. No segundo experimento, durante o cultivo, a demarcação das folhas foi reforçada com caneta permanente a cada 15 dias.

Para ambos experimentos, realizou-se a condução das plantas para evitar que as folhas encostassem no chão ou em plantas vizinhas e fragmentos demarcados de todas as plantas (em que foi possível a identificação da demarcação) foram coletados aos 30 e 60 dias após a inoculação. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente em etanol (70%) por 1 min e hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 min e colocados em placas de Petri contendo meio de Martin com estreptomicina (0,03 g/L), mantidas a 24ºC com fotofase de 12 h por até 7

dias. As placas foram observadas ao estereomicroscópio e acérvulos típicos de *C. truncatum*, quando presentes, foram transferidos para meio de cultura BDA. Colônias características de *C. truncatum* obtidas foram conservadas pelo método de Castellani (ALFENAS; MAFIA, 2016).

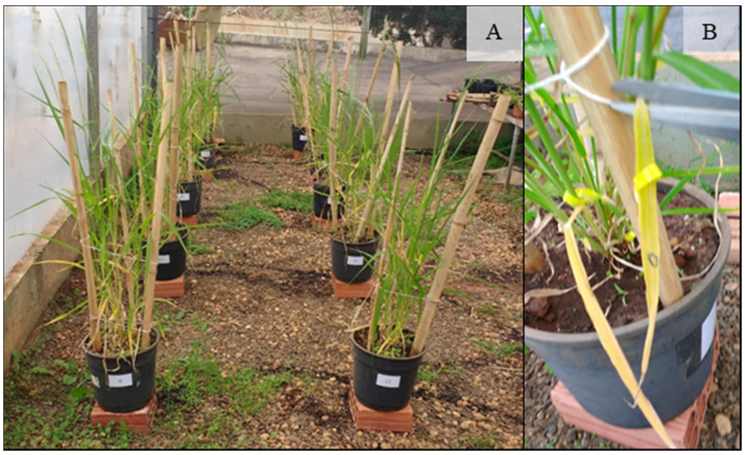

Figura 3. Plantas de capim-amargoso do segundo experimento em estufa (A), coleta de folha um mês após a inoculação (B).

3.2.2. Isolamento de *C. truncatum* em *Digitaria insularis* e *Ipomoea* sp.

Em março e maio de 2019, coletou-se uma folha de planta de *D. insularis* com lesões necróticas e partes de três plantas de *Ipomoea* sp., assintomáticas, em uma área de produção comercial de soja (23°07'34.4"S, 47°19'39.4"W) com incidência de antracnose. Fragmentos de áreas com lesão de folha do capim-amargoso e fragmentos do caule das plantas de corda-de-viola foram desinfestados superficialmente por meio da imersão em etanol (70%) por 1 min e em hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 min e incubados em câmara úmida sobre meio de cultura BDA com estreptomicina (0,03 g/L). Acérvulos típicos de *Colletotrichum* spp. formados em todas estas plantas foram transferidos ao estereomicroscópio para meio de cultura BDA. As colônias obtidas foram utilizadas para obtenção de isolados monospóricos, após o preparo de uma suspensão de esporos, deposição sobre meio de cultura ágar-água e corte da região do meio de cultura contendo apenas um esporo ao microscópio óptico, com posterior transferência para meio BDA. Os isolados monospóricos foram conservados em papel filtro, armazenado em microtubos com sílica a -80°C e nomeados como 1.1, proveniente de *D. insularis* (preparado a partir de um conídio), e CFV, 4.1 e 4.2, provenientes cada um de uma planta de *Ipomoea* sp. (CVF e 4.1 preparados a partir de um conídio cada e 4.2 a partir de um ascósporo).

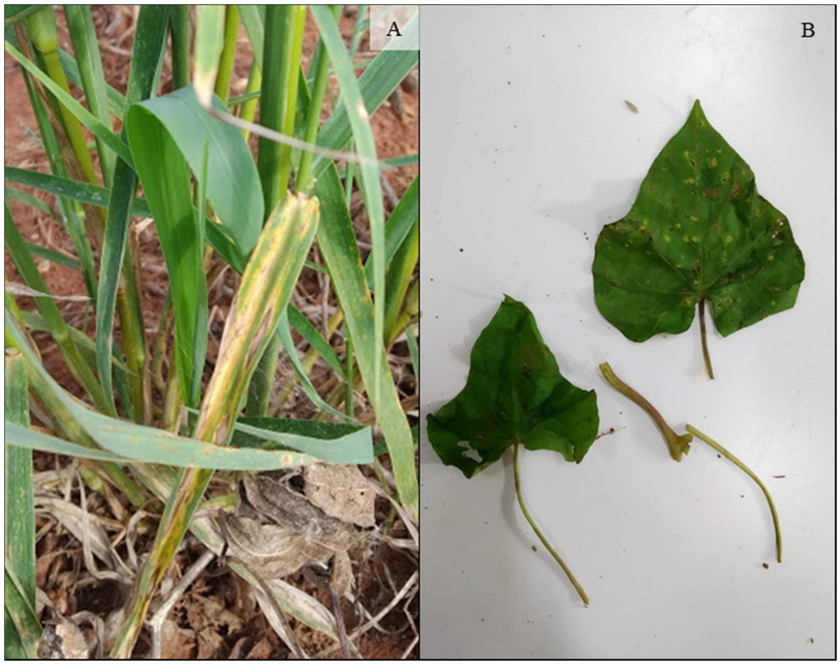

Figura 4. Planta de *Digitaria insularis* com folha com lesões necróticas (A) e partes de uma das plantas de *Ipomoea* sp. (B), de onde foram obtidos isolados de *Colletotrichum* sp.

3.2.3. Observação de conídios germinados de *C. truncatum* em folhas de capim-amargoso

Preparou-se uma suspensão de conídios de C. *truncatum* do isolado GO2-12, a partir de uma colônia de 28 dias de idade cultivada em meio BDA, de acordo com a metodologia já descrita (item 3.2.1.1). Fragmentos de folhas de *D. insularis* de plantas não inoculadas foram coletados e colocados no interior de placas de Petri com a extremidade da folha que ficava mais próxima da bainha na planta em contato com um algodão embebido em água destilada. Foram preparadas três placas com um fragmento de folha em cada. Um círculo de cerca de 6 mm de diâmetro foi demarcado sobre a superfície adaxial com caneta permanente e 30 µL da suspensão de conídios (10^5 conídios/ mL) foram depositados sobre a área delimitada. De forma análoga, foram preparadas outras três placas em que o mesmo volume de água destilada estéril foi depositado na região delimitada de cada folha como controle. As placas foram fechadas com um filme plástico e incubadas a 24°C durante 14 horas no escuro. Para inferir a viabilidade dos conídios utilizados na inoculação, 3 alíquotas de 30 µL da mesma suspensão foram depositadas sobre meio de cultura ágar-água, sobre regiões demarcadas com caneta permanente no verso das placas de Petri e mantidas sob as mesmas condições que as folhas inoculadas. Após 14 horas, adicionou-se uma gota de lactoglicerol azul para paralisar a germinação sobre o ágar-água e foram contados os conídios germinados e não germinados, até o total de 100 por alíquota, considerando conídios germinados aqueles com tubo

germinativo pelo menos duas vezes maior que o comprimento do conídio. Os fragmentos vegetais das áreas demarcadas foram cortados e fixados em Karnovsky modificado, composto por glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 1%, tampão cacodilato 0,2 M e CaCl2 0,1 M (KRAUS; ARDUIN, 1997), em seguida, foram lavados em tampão cacodilato (0,25 M) por meio da adição de 500 µL do tampão, permanência durante 10 minutos e descarte do tampão, por três vezes. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, permanecendo por 10 min em cada concentração (30%, 50%, 70% e 90%) e por três vezes em acetona pura (100%), com este mesmo tempo de permanência por vez. Realizou-se a secagem das amostras ao ponto crítico (Leica EM CPD 300), colagem em suportes metálicos (stubs) utilizando fita de carbono e cobertura com uma fina camada de ouro em metalizador (Baltec SCD 050). As amostras foram visualizadas e as imagens registradas ao microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP).

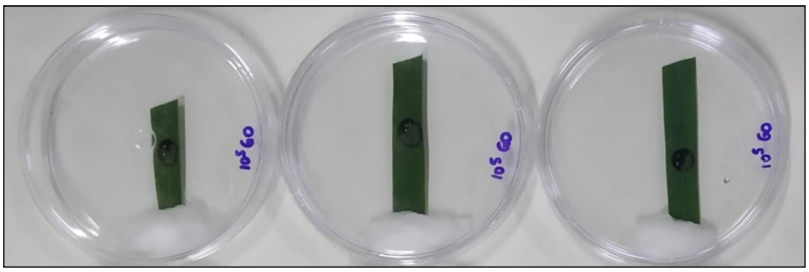

Figura 5. Fragmentos de folhas de capim-amargoso inoculados com conídios de *Colletotrichum truncatum* para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura.

3.2.4. Confirmação da identidade de isolados

Os isolados 8D, i1 e i52, provenientes de capim-amargoso dos dois experimentos (item 3.2.1.1) e os isolados 1.1, 4.1, 4.2 e CVF, obtidos de plantas daninhas de uma área agrícola (item 3.2.2), tiveram a morfologia de seus conídios observada ao microscópio óptico, quando presentes, para verificar se apresentavam formato falcado, como um indicativo de serem da espécie *C. truncatum*. Os isolados 8D, i52, 1.1 e CVF também foram submetidos à extração de DNA com a maceração do micélio com areia estéril em cadinho também estéril, utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA genômico destes isolados foi submetido a reações de amplificação com um par de iniciadores espécie-específicos ColtF/ ColtR (RAMIRO, 2015). Foram utilizados 20 ng de DNA molde, 1,0 mM de cada iniciador e 6,3 µL de GoTaq Colorless Master Mix (Promega) em um volume final de 12,5 µL. As condições de reação foram: desnaturação a 95°C por 5 min, 40 ciclos com as temperaturas de 95°C , 60°C e 75°C por 30s

em cada, e extensão final a 75°C por 5 min. A amplificação constituiu um indicativo dos isolados serem da espécie *C. truncatum* e foi verificada após eletroforese em gel de agarose (2,5%) em tampão TBE 0,5X (Tris-Ácido bórico-EDTA), corado com SYBR Safe (Invitrogen) e posterior observação em transluminador, sob luz ultravioleta.

Em seguida, as mesmas amostras de DNA foram submetidas a reações de amplificação e genotipagem para 12 locos microssatélites (SSR 01, SSR 05, SSR 10, SSR 17, SSR 29, SSR 34, SSR 42, SSR 44, SSR 53, SSR 55, SSR 56 e SSR 59), para posterior comparação do genótipo dos isolados recuperados do capim-amargoso, 8D e i52 com o do isolado inoculado, GO2-12, previamente caracterizado utilizando esta metodologia (ROGÉRIO et al., 2019), e para a caracterização do perfil genético dos isolados 1.1 e CVF, para os mesmos locos microssatélites. Iniciadores diretos marcados com fluorescências (6-FAM, VIC®, PET® e NED®) foram utilizados em conjunto com os iniciadores reversos correspondentes não marcados. As reações foram realizadas em volume final de 15 µL, com 20 ng de DNA, 0,8 mM de cada iniciador, 0,15 µM de dNTP, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,5 U de Taq DNA polimerase, com desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de: 95°C por 1 min, anelamento a 55,1°C (SSR 01, SSR 10, SSR 29, SSR 55, SSR 59), 56,2°C (SSR 17, SSR 44, SSR 53, SSR 56) ou a 53,8°C (SSR 05, SSR 34 SSR 42) por 30 s e 72°C por 1 min, seguidos de extensão final a 72°C durante 10 min, em termociclador (Bio-Rad). Um marcador molecular com fluorescência diferente das já utilizadas, GS600 LIZ (Applied Biosystems), foi adicionado aos produtos de PCR, que foram submetidos à genotipagem em sequenciador capilar ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) na Universidade Estadual de Campinas. O tamanho dos fragmentos amplificados foi obtido utilizando o programa Genemarker v.1.191 (SoftGenetics), com base na fluorescência emitida pelo marcador. Em seguida, foi obtida a probabilidade de identidade ou de surgimento ao acaso de isolados com o mesmo perfil genotípico que os caracterizados, utilizando o programa GenAlex v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Esta análise considerou o tamanho dos fragmentos para os mesmos 12 locos de 166 isolados de 10 populações brasileiras de *C. truncatum*, fornecido pelos autores do estudo que contém a caracterização do isolado GO2-12 (ROGÉRIO et al., 2019).

3.2.5. Testes de patogenicidade à soja

Sementes de soja da cultivar AMS Tibagi não tratadas com fungicidas, de suscetibilidade ao isolado GO2-12 previamente confirmada, mas desconhecida aos isolados 1.1, CVF, 4.1 e 4.2, foram submetidas à desinfestação superficial em hipoclorito de sódio

(1%) por 3 min e colocadas sobre tolhas de papel durante 24 h para secagem à temperatura ambiente. Estas sementes foram previamente testadas quanto à ausência de *C. truncatum*, pelo método do papel filtro (BRASIL, 2009).

Colônias de isolados recuperados de folhas de capim-amargoso coletadas 30 dias após a inoculação (nomeados 8D, do primeiro experimento e i1, do segundo) e colônias dos isolados de plantas daninhas provenientes da área de produção de soja, foram cultivadas em BDA com manitol (-1,0 MPa) em BOD a 24°C com fotofase de 12 h, e as sementes secas foram colocadas sobre a superfície de colônias, com 20 dias de idade, para inoculação pelo método da restrição hídrica (COSTA et al., 2003). Sementes desinfestadas também foram dispostas em placas sobre o mesmo meio de cultura (não inoculado) para constituir o tratamento controle. As placas com as sementes foram fechadas com filme plástico e permaneceram em BOD, sob as mesmas condições de incubação durante 48 horas, para posterior semeadura de 10 sementes por vaso, contendo substrato autoclavado (solo, areia e esterco de curral, 1:1:1). O ensaio se deu em delineamento inteiramente aleatorizado, com 9 tratamentos: 1 controle, 6 compostos pelos isolados citados e 4 por isolados de outro estudo (Capítulo 2, item 2.2.1.3), com 4 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por um vaso. Os vasos foram mantidos em estufa e, decorridos 10 dias desde a semeadura, 2 plantas de cada um foram coletadas para a separação de fragmentos contendo região de transição entre tecido sintomático e assintomático, que foram desinfestados superficialmente em etanol (70%) por 1 min e hipoclorito de sódio (1%) por 2 min. Em seguida, os fragmentos foram colocados sobre meio de cultura BDA com estreptomicina (0,03 g/L). Depois de 4 dias de incubação, realizou-se a transferência das colônias obtidas a partir destes fragmentos para meio de cultura BDA.

Posteriormente, novo teste de patogenicidade com a inoculação de sementes foi realizado para o isolado recuperado de folha de capim-amargoso dois meses após a inoculação no segundo experimento, nomeado i52. A inoculação foi realizada da mesma forma que no ensaio descrito anteriormente, com a diferença de que a colônia utilizada possuía 10 dias de idade. Neste ensaio, sete vasos constituíram as parcelas experimentais do tratamento inoculado com um único isolado (i52) e sete vasos constituíram as parcelas do tratamento controle.

Adicionalmente, plantas de soja foram obtidas de sementes desinfestadas conforme descrito e cultivadas (com duas plantas por vaso) até o estádio fenológico R2 (florescimento pleno) para a inoculação por aspersão de suspensões de conídios dos isolados 8D, i52, 1.1 e

CVF com o uso de borrifadores manuais. Além destes isolados, outros quatro de outro estudo foram utilizados (Capítulo 2, item 2.2.1.3). Uma colônia de cada isolado foi cultivada durante 21 dias em meio de cultura BDA (24°C, fotofase de 12 h) até a obtenção de conídios, que foram recolhidos em água destilada para o preparo de suspensões, após a adição de água destilada estéril sobre as colônias e raspagem dos conídios utilizando alça de Drigalsky. As suspensões foram filtradas em gaze e a concentração de conídios estimada por contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, as suspensões foram diluídas até a concentração de 10^5 conídios/mL. Este experimento foi composto por nove tratamentos (um controle e cada um dos demais composto por um isolado), sendo utilizada água destilada estéril em vez de suspensão de conídios no tratamento controle, e quatro repetições, em que cada vaso constituiu uma parcela experimental. Após a inoculação, as plantas foram mantidas durante 48 horas em câmara úmida no escuro, e posteriormente cultivadas em estufa, com observação diária, visando constatar o desenvolvimento de sintomas característicos de antracnose.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Sobrevivência de *C. truncatum* em capim-amargoso

A viabilidade média de conídios inferida para a suspensão utilizada no primeiro experimento foi de 97,2% e de 88,8% no segundo. Esta diferença provavelmente foi devida à idade das colônias utilizadas, 5 dias mais velha no segundo experimento. Ainda assim, a viabilidade menor no segundo caso não representou prejuízo ao alcance do objetivo do ensaio.

Em ambos experimentos foi possível obter colônias características de *C. truncatum*, a partir dos acérvulos também típicos da espécie (Figura 6), formados nos fragmentos foliares de capim-amargoso em câmara úmida, um mês após a inoculação (Tabela 4). O maior número de repetições de que se obteve êxito no reisolamento de plantas inoculadas na face abaxial, na posição horizontal no primeiro experimento, levou à escolha da inoculação de plantas apenas desta maneira no segundo, mesmo que esta diferença possa ser decorrente do acaso e não da metodologia.

No segundo experimento, houve formação de acérvulos nas folhas coletadas um mês após a inoculação para todas as repetições do tratamento inoculado, no entanto, não se obteve êxito no isolamento para uma das sete repetições (Tabela 4). Nenhuma das folhas de plantas do tratamento controle apresentou a formação de acérvulos, em ambos experimentos.

Figura 6. Acérvulos característicos de *Colletotrichum truncatum* em fragmentos de folhas de capim-amargoso coletadas um mês após a inoculação com conídios no primeiro experimento (A) e no segundo (B).

Tabela 4. Número de repetições em que se obteve o reisolamento de *Colletotrichum truncatum* (Reisolamentos) e repetições avaliadas (Total) após um e dois meses decorridos desde a inoculação de folhas de *Digitaria insularis* com suspensão de conídios, para dois experimentos.

Experimento	Face da folha inoculada	Tempo entre a inoculação e a avaliação			
		1 mês		2 meses	
		Reisolamentos	Total	Reisolamentos	Total
1	Abaxial	4	4	0	4
	Adaxial	3	4	0	4
2	Abaxial	6	7	1	7

A ocorrência de apenas um reisolamento aos dois meses após a inoculação provavelmente está relacionada à dificuldade que *C. truncatum* pode ter em sobreviver em competição com microrganismos saprófitas, presentes em maior quantidade nas folhas secas há mais tempo. Embora todas as folhas coletadas aos 30 dias após a inoculação no primeiro experimento já estivessem completamente secas, para este período, a colonização da folha por outros microrganismos não impediu o isolamento. A evidência da sobrevivência de *C. truncatum* aos dois meses após a inoculação ter ocorrido no segundo experimento e não no primeiro, mesmo que em uma única repetição, pode ter relação com a dificuldade de identificar as marcações de caneta nas folhas no primeiro experimento, que não foram refeitas durante a permanência das plantas na estufa e pode ser ainda resultado do metabolismo mais

acelerado do capim-amargoso sob temperaturas mais elevadas durante o primeiro experimento (de inoculação em 29/03/19) em relação ao segundo (inoculação em 18/07/19), já que as folhas mais velhas se desprendem da planta, após algum tempo depois de secas. Enquanto as folhas coletadas um mês após a inoculação estavam completamente secas no primeiro experimento, as folhas da coleta correspondente no segundo experimento ainda estavam em senescência.

3.3.2. Observação de conídios germinados de *C. truncatum* em folhas de capim-amargoso

A viabilidade média de conídios foi estimada em 71%, satisfatória para a procura por conídios germinados sobre o material vegetal inoculado ao microscópio eletrônico de varredura. Foi constatada a germinação de conídios com formação de apressórios sobre a superfície de folhas inoculadas e ausência de conídios ou qualquer estrutura semelhante no controle, não inoculado. Os apressórios indicam que o fungo provavelmente penetra as folhas de forma direta.

Não foi observado crescimento direcionado do tubo germinativo em direção a estômatos. Verificou-se a formação de apressórios nas proximidades de um estômato e sobre uma célula-guarda, mas sem qualquer indício de penetração por meio do ostíolo (Figura 7B). Os aspectos ultraestruturais observados permitem notar que o fungo se comporta da mesma maneira que em folhas de soja, em que a penetração direta de células epidérmicas após a formação de apressórios foi relatada como a forma mais comum de entrada do patógeno na planta (MANANDHAR et al., 1985).

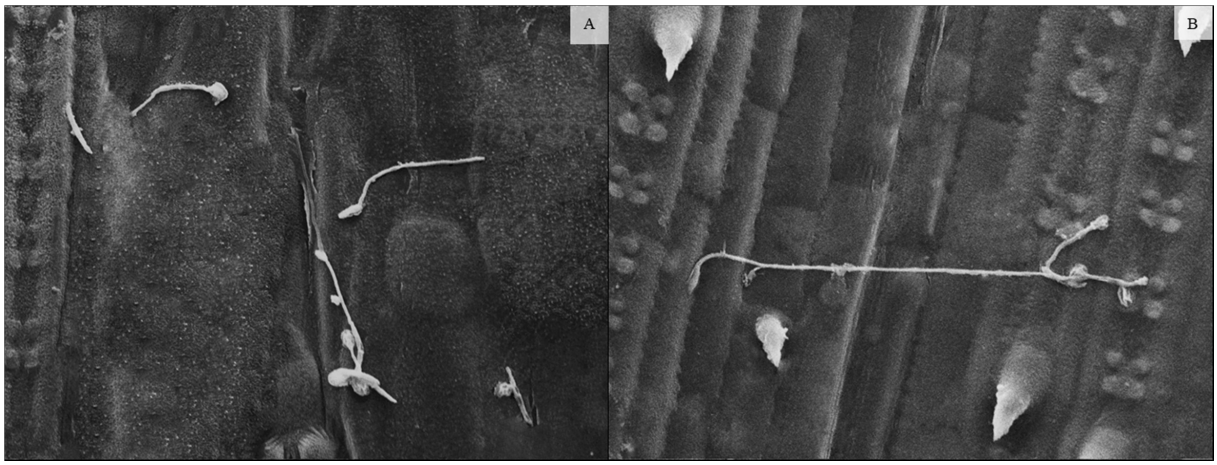

Figura 7. Fotomicrografias de conídios de *Colletotrichum truncatum* germinados com formação de apressórios sobre folhas de *Digitaria insularis* (A e B), apressórios formados nas proximidades de estômatos sem indícios de penetração por ostíolo (B).

3.3.3. Confirmação da identidade de isolados

Os isolados 8D, i1 e i52, de capim-amargoso inoculado (item 3.2.1.1) e os isolados 1.1, 4.1, 4.2 e CVF, de plantas daninhas da área agrícola (item 3.2.2), apresentaram conídios de formato falcado (Figura 9). O DNA dos isolados 8D, i52, 1.1 e CVF teve amplificação com os iniciadores espécie-específicos utilizados e estes são indicativos de que são de *C. truncatum.*

A genotipagem para os 12 locos microssatélites revelou que os isolados 8D e i52 apresentam o mesmo perfil genotípico do isolado GO2-12, já caracterizado anteriormente por esta metodologia (ROGÉRIO et al., 2019), com probabilidade de surgimento ao acaso de isolados com o mesmo perfil genotípico (P) próxima de zero. Assim, estes isolados correspondem ao isolado de *C. truncatum* previamente inoculado. Os perfis genotípicos dos isolados 1.1 e CVF, para os mesmos locos microssatélites também foram obtidos e poderão ser utilizados em trabalhos futuros (Tabela 5).

A probabilidade de surgimento ao acaso do isolado 8D foi diferente das obtidas para os isolados i52 e GO2-12 devido à falha na genotipagem de um dos locos, ainda assim, a análise dos 11 locos restantes foi suficiente para verificar sua identidade (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil genético para 12 locos microssatélites de isolados de *Colletotrichum truncatum* (GO2-12) recuperados de plantas de *Digitaria insularis* aos 30 dias (8D) e aos 60 dias (i52) após a inoculação com suspensão de conídios e de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de *D. insularis* (1.1) e de *Ipomoea* sp. (CVF) de uma área de produção de soja, e probabilidade cumulativa de ocorrência ao acaso do mesmo genótipo (P).

Isolado	Microssatélite												P
	SSR 01	SSR 05	SSR 10	SSR 17	SSR 29	SSR 34	SSR 42	SSR 44	SSR 53	SSR 55	SSR 56	SSR 59	
1.1	122	138	127	151	203	174	175	175	134	139	148	131	$8,9 \times 10^{-150}$
CVF	122	138	127	153	203	172	175	175	134	139	148	125	$2,3 \times 10^{-140}$
8D	154	134	155	167	201	172	173	179	136	-	154	191	$3,7 \times 10^{-47}$
i52	154	134	155	167	201	172	173	179	136	145	154	191	$3,3 \times 10^{-51}$
GO2-12	**154**	**134**	**155**	**167**	**201**	**172**	**173**	**179**	**136**	**145**	**154**	**191**	$3,3 \times 10^{-51}$

3.3.4. Testes de patogenicidade à soja

Todos os isolados mostraram-se patogênicos à soja. No primeiro ensaio que teve inoculação pelo método da restrição hídrica (COSTA et al., 2003) foram obtidas colônias características dos isolados inoculados 8D, i1, 4.1, 4.2 e CVF, a partir das plântulas das quatro repetições avaliadas. Para o isolado 1.1, colônias típicas foram obtidas em 3 das 4 repetições. No segundo teste de patogenicidade com este método de inoculação, apenas com o isolado i52, colônias típicas foram obtidas nas 7 repetições avaliadas. Não houve crescimento fúngico

a partir das plântulas dos tratamentos utilizados como controle nestes ensaios. Os conídios dos isolados 8D, i1, i52, 1.1, 4.1 e CVF que foram inoculados em sementes de soja e dos respectivos isolados recuperados das plântulas apresentaram as mesmas características morfológicas (Figura 9). Para o isolado 4.2, que não produziu conídios, a morfologia das colônias recuperadas das plântulas foi a mesma do isolado inoculado (Figura 10).

No teste de patogenicidade com a inoculação utilizando suspensões de conídios, todos os isolados do ensaio mostraram-se patogênicos à soja, com o desenvolvimento de sintomas característicos de antracnose em todas as repetições para os isolados 8D, i52, 1.1 e CVF (Figura 8). Neste ensaio, optou-se por não incluir o isolado i1, já que o isolado i52 testado foi proveniente do mesmo experimento, sendo recuperado aos 60 dias após a inoculação do capim-amargoso, enquanto o isolado i1 foi obtido de folha coletada aos 30 dias após a inoculação. Quanto aos isolados 4.1 e 4.2, sua patogenicidade utilizando este método de inoculação, que se aproxima das condições que ocorreriam naturalmente, ainda não foi avaliada.

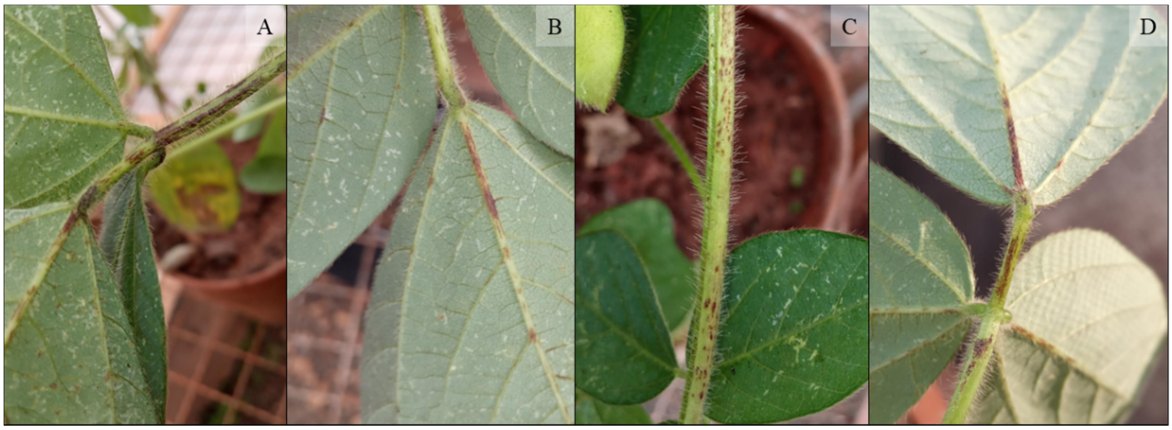

Figura 8. Sintomas típicos de antracnose em plantas de soja inoculadas com suspensões de conídios de isolados de *Colletotrichum truncatum* recuperados de capim-amargoso um mês após a inoculação, 8D (A) e i52 (B) e de *Colletotrichum* sp. obtidos de capim-amargoso, 1.1 (C) e corda-de-viola, CVF (D), coletados em área de produção de soja.

Apesar dos indicativos de que os isolados 1.1, CFV e 4.1 são da espécie *C. truncatum* (item 3.3.3), a confirmação de sua identidade será obtida por meio da análise filogenética considerando cinco genes (ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3) e a região ITS do DNA ribossomal, que é a metodologia mais aceita para este fim (DAMM et al., 2009). A mesma metodologia também permitirá definir a espécie do isolado 4.2. As evidências da patogenicidade destes quatro isolados à soja tornam válidos os esforços futuros na identificação das espécies às quais pertencem. Posteriormente, a genotipagem de

microssatélites também será empregada para confirmar se os isolados recuperados das plantas de soja no teste de patogenicidade são de fato os mesmos utilizados na inoculação.

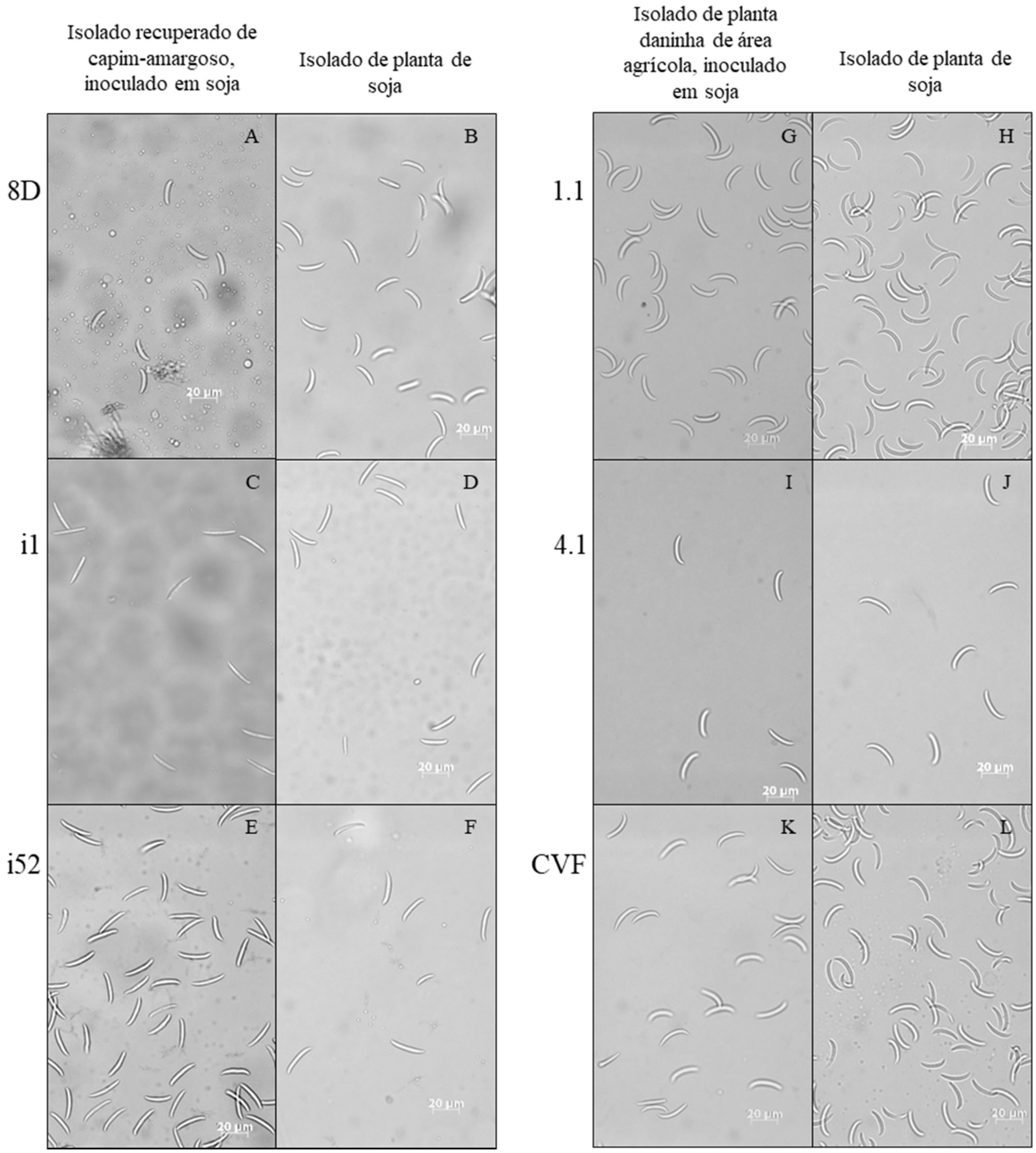

Figura 9. Características morfológicas de conídios de isolados de *Colletotrichum truncatum* recuperados de plantas de capim-amargoso um mês (8D e i1) e dois meses (i52) após a inoculação utilizados para inocular sementes de soja (A, C e E), e dos isolados obtidos das plântulas de soja correspondentes (B, D e F) e de *Colletotrichum* spp. obtidos de capim-amargoso (1.1) e de corda-de-viola (4.1 e CVF) utilizados para inoculação de sementes de soja (G, I e K) e dos respectivos isolados recuperados das plântulas de soja (H, J e L).

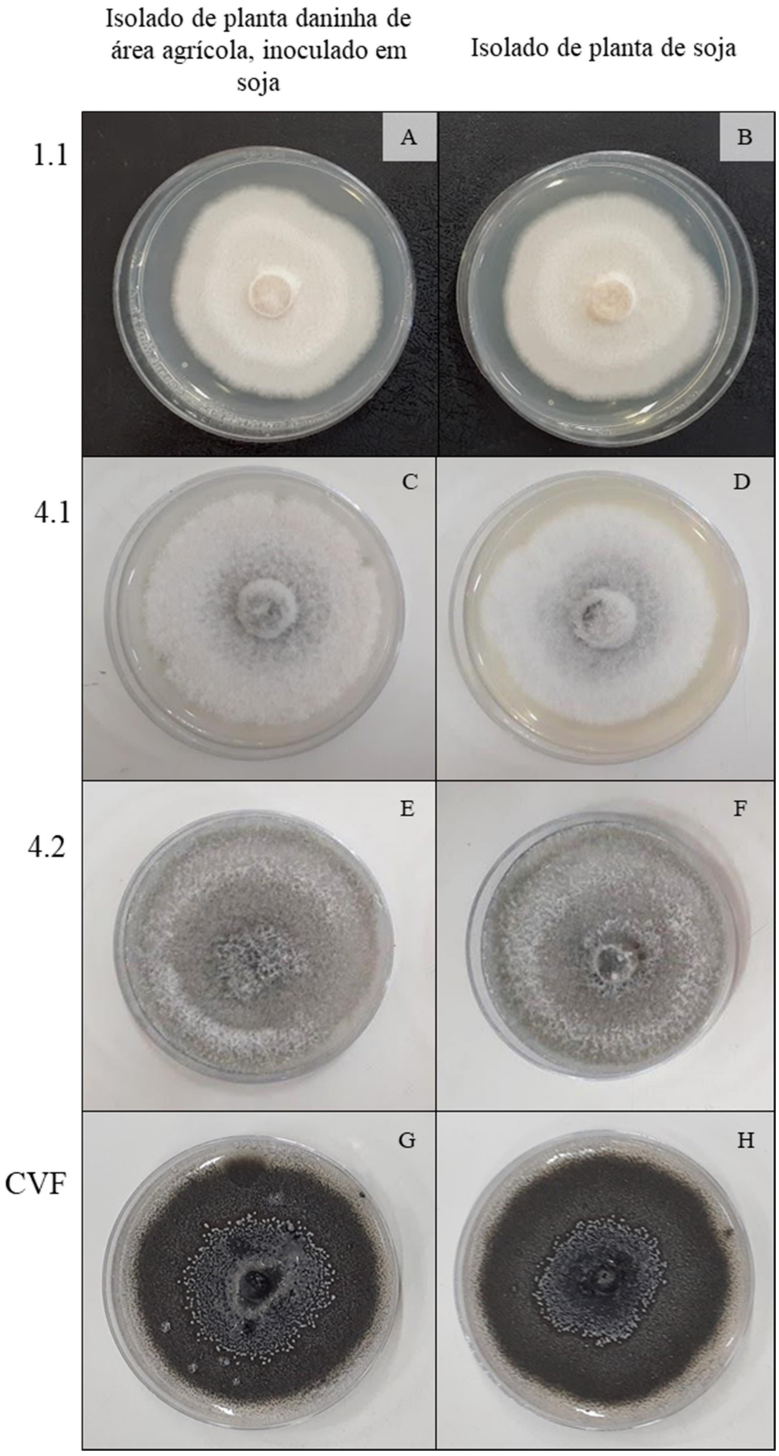

Figura 10. Características morfológicas dos isolados de *Colletotrichum* spp., provenientes de plantas de capim-amargoso (1.1) e de corda-de-viola (4.1, 4.2 e CVF) de área agrícola, inoculados em sementes de soja (A, C, E e G) e dos respectivos isolados recuperados de plântulas de soja (B, D, F e H).

A sobrevivência de *C. truncatum* em plantas daninhas pode viabilizar sua sobrevivência enquanto plantas de soja são ausentes no campo. Ainda que o período que este fungo pode permanecer em *D. insularis* verificado neste estudo seja curto em relação aos 8 meses de entressafra da cultura, uma possível disseminação entre os hospedeiros alternativos

presentes poderia mantê-lo na área de cultivo. Esta pode ser uma das formas de sobrevivência que permite que genótipos de *C. truncatum* se acumulem em uma mesma área com o passar dos anos, como proposto em estudo da estrutura populacional deste patógeno no Brasil (ROGÉRIO et al., 2019).

Uma constatação dos autores deste estudo populacional foi de que um dos prováveis eventos fundadores das populações brasileiras de *C. truncatum* está associado a um grupo genotípico de maior variabilidade em relação aos demais e contém indivíduos associados a plantas daninhas e à soja. Assim, é possível que esta introdução tenha ocorrido mais recentemente e que os isolados deste grupo populacional sejam mais agressivos que os dos outros grupos, o que seria coerente com sua maior variabilidade, e este evento fundador pode estar associado ao aumento da importância da antracnose observado no campo, que seria agravado pela dificuldade de controle de plantas daninhas hospedeiras.

É possível ainda que os relatos de aumento da importância da antracnose estejam relacionados a mudanças no manejo da ferrugem asiática da soja pois o uso de cultivares com maior resistência a esta doença pode ter levado produtores a reduzirem as aplicações de fungicidas na cultura. Como vários dos fungicidas empregados no controle da ferrugem têm efeito contra *Colletotrichum* spp. (AGROFIT, 2019), a redução das aplicações pode ter resultado em um menor controle da antracnose.

Assim, são diversos os motivos que podem ter contribuído para o cenário atual da antracnose da soja no Brasil e o melhor entendimento deste patossistema com o conhecimento dos hospedeiros alternativos de seu agente causal pode direcionar as estratégias de manejo da doença.

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A confirmação de que isolados recuperados de plantas de *D. insularis* aos 30 e 60 dias após a inoculação correspondem ao isolado previamente inoculado comprova a sobrevivência de *C. truncatum* nesta planta daninha. Tal fato, associado à dificuldade de controle desta invasora nas áreas de produção demonstra sua provável atuação como fonte de inóculo da antracnose da soja. A obtenção de isolados de *Colletotrichum* sp. a partir de plantas de capim-amargoso e de corda-de-viola, provenientes de uma área agrícola e patogênicos à soja, indica que, além do capim-amargoso, *Ipomoea* sp., que também é de difícil controle, pode ser fonte de inóculo neste patossistema. Assim, o manejo adequado

destas plantas daninhas, mesmo que dispendioso, é fundamental para reduzir o inóculo inicial da antracnose da soja e pode representar contribuição significativa em seu controle.

3.5. REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S., L. VARGAS, D.L.P. GAZZIERO; D. KARAM. **Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil.** Londrina: Embrapa Soja, 2017. 12p.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 dez. 2019.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2016. 516p.

ALMEIDA, Á. M. R. et al. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1231-1238, 2001.

BOYETTE, C.; BRYSON, C.; HOAGLAND, R.; WEAVER, M. Effects of Simulated Rainfall on Disease Development and Weed Control of the Bioherbicidal Fungi *Alternaria cassiae* and *Colletotrichum truncatum*. **Weed Technology,** v.*26, n.*1, p.117-121. 2012.

BHADAURIA, V. et al. Overexpression of a Novel Biotrophy-Specific *Colletotrichum truncatum* Effector, CtNUDIX, in Hemibiotrophic Fungal Phytopathogens Causes Incompatibility with Their Host Plants. **Eukaryitic Cell,** v. 12, n 1, jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes.** Brasília. 2009.

BUCHWALDT, L.; MORRALL, A. A.; CHONGO, G.; BERNIER, C. C. Windborne Dispersal of *Colletotrichum truncatum* ans Survival in Infested Lentil Debris. **Phytopathology**, v. 86, p. 1193–1198, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: CONAB, 2019. v.6.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 320-370. **Persoonia**, v. 34, p. 167–266, 2015. Disponível em: <www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimjhttp://dx.doi.org/10.3767/003158515X688433>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DAMM, et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, 2016.

FORSEILLE, L.; PENG, G.; WEI, Y.; GOSSEN, B. D. Molecular and morphological differentiation of *Colletotrichum truncatum* from scentless chamomile and selected crop species. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 512–524, 2011.

FRARE, G. F; COUTO, H. T. Z.; CIAMPI-GUILLARDI, M; AMORIM, L. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum,* can survive on weeds. **Australasian Plant Pathology,** Amsterdam, v. 45, n. 4, p. 339-346, 2016.

GARDINA, J.; LITTRELL, R. H.; HANLIN, R.T. Anthracnose of Florida Beggarweed (*Desmodium tortuosum*) Caused by *Colletotrichum truncatum*. **Cambridge University Press**, v.36, n.3, p.329-334. 1988

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V.; Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de Fitopatologia.** v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. cap.67, p. 657-675.

HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; SINCLAIR, J. B. Incidence of *Colletotrichum* spp. on Soybeans and Weeds in Illinois and Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 70, n. 8, p. 780–782, 1986.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 2 dez. 2019.

HYNES, R.; CHUMALA, P.; HUPKA, D.; PENG, G. A complex coacervate formulation for delivery of *Colletotrichum truncatum* 00-003B1. **Weed Technology,** v.24, n.2, p. 185-192. 2010.

JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 879–884, 1995.

KATOCH, A. et al. Population Structure of *Colletotrinchum truncatum* in Himachal Pradesh and Identification of Broad-Spectrum Resistant Sources in Capsicum. **Agricultural Research**, v. 6, 2017.

LICORINI, L. R. et al. Identificação e controle de biótipos resistentes de *Digitaria insularis* (L.) Fedde ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.14, n.3, p.141-147, jul./set. 2015.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional.** 7.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 383 p.

LUCIO, F. et al. Dispersal and Frequency of Glyphosate-Resistant and Glyphosate-Tolerant Weeds in Soybean-producing Edaphoclimatic Microregions in Brazil. **Weed Technology**, v. 33, n. 1, p. 217-231, 2019.

MANANDHAR, J. B. Penetration and Infection of Soybean Leaf Tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines.* **Phytopathology**, v. 75, p. 704-708, 1985.

OGUNWENMO, K.; UGBOROGHO, R. E. Effects of chemical and mechanical scarification on seed germination of five species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 69, p. 147-162, 1999.

RAMIRO, J. **Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 88. 2015.

ROGÉRIO, F.; CAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA JR., N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2. p. 402–415, 2017.

ROGÉRIO, F.; GLADIEUX, P.; MASSOLA JR, N. S.; CAMPI-GUILLARDI, M. Multiple introductions without admixture of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Phytopathology**, v. 109, n. 4. 2019

SCHNEIDER, R. W. et al. *Colletotrichum truncatum* Borne Within the Seedcoat of Soybean. **Phytopathology**, v. 64, p.154-155, 1974.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; DA SILVA MATOS, K.; DE ANDRADE LIMA, G. S.; BESERRA, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

UNITED STATES OF AGRICULTURE - USDA. World Agricultural Production. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2019.

VIEIRA, B. S.; DIAS, L. V. S. A.; LANGONI, V. D.; LOPES, E. A. Liquid fermentation of *Colletotrichum truncatum* UFU 280, a potential mycoherbicide for beggartick. Australasian **Plant Pathology**, v. 47, p. 277– 283, 2018.

YANG, H.-C.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. **Compendium of soybean diseases and pests.** 5.ed. St. Paul: APS Press, 2016.

WEIDEMANN, G. J.; TEBEEST, D. O.; CARTWRIGHT, R. D. Host Specificity of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* and *C. truncatum* in the Leguminosae. **Phytopathology**, v. 78, p. 986– 990, 1988.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu verificar que microescleródios de *Colletotrichum truncatum* podem permanecer viáveis e infectivos por ao menos oito meses no solo e estas estruturas provavelmente apresentam dormência constitutiva. Constatou-se também que *C. truncatum* pode sobreviver por até dois meses em plantas de *Digitaria insularis*.

Quatro isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de plantas daninhas (*D. insularis* e *Ipomoea* sp.) de uma área agrícola foram patogênicos à soja e a comparação dos perfis genotípicos dos isolados inoculados em soja e dos recuperados, não contemplada neste trabalho, ainda será realizada. Apesar dos indícios de que três destes isolados (um de capim-amargoso e dois de corda-de-viola) sejam de *C. truncatum*, a confirmação da espécie está em andamento. O quarto isolado mencionado, de corda-de-viola, também terá sua identidade verificada.

Este é a primeira descrição da sobrevivência de *Colletotrichum truncatum* na forma de microescleródios no solo e em plantas de capim-amargoso.