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

Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivares da soja ao patógeno

Wesler Luiz Marcelino

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

Piracicaba
2019

Wesler Luiz Marcelino
Engenheiro Agrônomo

Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivares da soja ao patógeno

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

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

Piracicaba
2019

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

Marcelino, Wesler Luiz

Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivares da soja ao patógeno / Wesler Luiz Marcelino. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

74 p.

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

1. Antracnose da soja 2. *Glycine max* 3. Controle alternativo 4. *Streptomyces scabies* I. Título

Aos meus pais, Valcira e Luiz,

que sempre estiveram comigo em todos os momentos, principalmente me incentivando a continuar na pesquisa.

As minhas irmãs, Gislayne e Cryslaine Por todo carinho, força e incentivo.

Familia, sem vocês, este sonho jamais seria realizado!

Obrigado. Dedico

A Deus, todo poderoso, que sempre está comigo, em todos os momentos de minha vida

A Nossa senhora, que me ilumina e é minha intercessora

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar sempre comigo em todos os momentos, me protegendo e iluminando meu caminho. Obrigado Deus. Também agradeço a Maria, por passar na frente de todas as minhas dificuldades e me ajudar durante esse período!

Deixo aqui minha gratidão ao meu orientador, Sergio Florentino Pascholati, um grande profissional, amigo e ser humano. Te agradeço pela excelente orientação e colaboração nesse trabalho. Obrigado professor Sergio!

Agradeço a minha família, Luiz Carlos Marcelino, Valcira Antônia da Silva Marcelino, Gislâine da Silva Marcelino e Cryslâine da Silva Marcelino, por estarem sempre comigo e me apoiando em todos os momentos, bons e ruins, dessa minha trajetória. Sem vocês essa história seria diferente. Obrigado Familia, amo vocês!

Agradeço em especial minha Avó Florinda Melo e meu Avô Antônio Patricio e minha tia Nelma Patrício, por sempre me apoiar em meu mestrado. Obrigado, amo vocês!

Agradeço aos meus amigos, Milene, Katle, Jacson, Joel, Dhiogo, Suzani, Kelly, Tainara, Isa, Evelyn, Pamela e Renata, pela amizade, conselhos e por estarem comigo em todos os momentos. Sou eternamente grato!

Agradeço em especial a Sabrina Holz, uma amizade verdadeira que a vida me deu. Obrigado por todo o suporte, você sempre estará no meu coração.

Agradeço a todos meus colegas e amigos do laboratório de Fisiologia e Bioquímica fitopatológica. Em especial a Sabrina, Samuel, Suzani, Tainara, Francine, Victor, Dayson, Angelica, Larisse, entre outros. Obrigado por me auxiliarem e me ensinarem tantas coisas.

Agradeço a pesquisadora da EMBRAPA: Drª Claudia Vieira Godoy, professor/pesquisador da UFLA: Drº Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, professora/pesquisado do IFSULDEMINAS: Drª Dalilla Carvalho Rezende, pesquisadora do IAC: Drª Patricia Cia e professor/pesquisado da ESALQ: Drº Nelson Sidnei Massola Júnior por aceitarem participar da banca e contribuir para a melhoria desse trabalho.

Agradeço em especial, a Professora/pesquisadora da UFPR: Drª Vivian Carré Missio, por aceitar em participar da minha banca, e por ter sido a primeira a enxergar meu potencial para chegar até aqui. Você é meu espelho profissional, agradeço a sua participação. Obrigado!

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia. Obrigado pela paciência e suporte durante esses dois anos.

Agradeço ao professor Drº Milton do IFGoiano, o qual me auxiliou em ideias para este projeto. Obrigado!

Por fim, agradeço ao CNPq por financiar meu mestrado e acreditar na pesquisa brasileira. Obrigado.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
1. INTRODUÇÃO 11
2. DESENVOLVIMENTO 15
2.1. Revisão bibliográfica 15
3. MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1. Análise Estatística 25
4. RESULTADOS 37
4.1. Testes *in vitro* 37
4.2. Testes bioquímicos 47
5. DISCUSSÃO 51
5.1. Testes *in vitro* 51
5.2. Testes *in vivo* 52
5.3. Análises bioquímicas 56
6. CONCLUSÕES 59
REFERÊNCIAS 61

RESUMO

Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivar de soja ao patógeno

A antracnose da soja é uma doença que causa danos na cultura, principalmente na fase vegetativa. Devido aos danos causados pela doença, métodos de controle integrado estão sendo estudados. Um desses métodos é o controle biológico, no qual agentes bióticos ou seus metabólitos são usados para controlar o patógeno. Esses agentes podem atuar diretamente no patógeno ou como indutores de resistência nas plantas e, assim, contribuir para o desenvolvimento de produtos biológicos. A bactéria *Streptomyces scabies* produz uma toxina que pode induzir resistência em plantas, a taxtomina A. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos diretos e indiretos da taxtomina parcialmente purificada (TPP) no controle de *Colletotrichum truncatum* (*C. truncatum*). O efeito direto da TPP na germinação de esporos e no crescimento micelial do fungo foi testado *in vitro*. Nos testes *in vivo* foram realizados a padronização do método de inoculação de *C. truncatum*, a escolha da cultivar a partir da reação de cultivares e o efeito de indutores na resistência sistêmica e local. Análises bioquímicas da atividade da peroxidase (POX) e teor de fenóis livres e ligados também foram conduzidos. Como resultado, observou-se que a TPP autoclavada ou não teve efeito inibitório na germinação de esporos de *C. truncatum*. Por outro lado, a TPP não afetou o crescimento micelial do patógeno. O melhor método para inoculação de *C. truncatum* em soja foi via micelial, com 72 h de umidade foliar e utilizando-se o isolado CMES 1059. No teste de reação das cultivares, a DS5916IPRO foi uma das cultivares mais suscetíveis dentre as 16 testadas. No tocante a indução de resistência local, as cultivares tratadas com TPP, Bion (Acibenzolar - S – Metil) e o fungicida Priori Xtra® (azostrobina+citroconazol) apresentaram a menor severidade entre os tratamentos testados. Na avaliação da indução de resistência sistêmica, os tratamentos não diferiram ($p > 0,05$) do controle. As análises bioquímicas também não diferiram. Assim, pode-se concluir que a TPP na dose de 100 µg equivalentes de taxtomina/L é termoestável e tem efeito direto sob a germinação de conídios de *C. truncatum*. Além disso, a TPP e o ASM têm o potencial de induzir resistência local em plantas de soja contra o patógeno.

Palavras-chave: Antracnose da soja; *Glycine max*; Controle alternative; *Streptomyces scabies*

ABSTRACT

Potencial of parcially purifief thaxtomin in the control of *C. truncatum* and test reaction of soybean cultivars to the pathogen.

The anthracnose of soybean is a disease that causes severe damages in the crop, mainly in the vegetative phase. Due to disease damage, methods of integrated control has been studied. One of these methods is the biological control, in which a biotic agent or its metabolites are used to control a pathogen. These agents can act directly on the pathogen and/or act as resistance inducers in plants and thus contribute to the development of biological products. The bacterium *Streptomyces scabies* produces a toxin called thaxtomin that can induce resistance in plants. The objective of this research was to evaluate the effects of the partially purified thaxtomin (TPP) on the activation of biochemical defense mechanism in the soybean plants. Thus, the direct effect of TPP on spore germination and mycelial growth was tested *in vitro*. The *in vivo* test included standardization of inoculation of *C. truncatum*, cultivars reaction and the effect of inducers in the systemic and local resistance. Biochemical analyzes of peroxidase activity (POX) and content of free and bound phenols were also performed. It was observed that autoclaved or non-autoclaved TPP exhibited inhibitory effects on the germination of *C. truncatum*. On the other hand, TPP did not affect the mycelial growth of the pathogen. The best method for inoculation of *C. truncatum* was by using mycelium, with 72 h of leaf wetness and with the isolate CMES 1059. In the cultivar reaction test, it was determinate that the cultivar DS5916RR was the most susceptible out among the 16 cultivars tested. Regarding local induction resistance, the cultivars treated with TPP, Acibenzolar – S – Methyl (ASM) and fungicide Priori Xtra® exhibited the lowest severity among the treatments tested. In the evaluation of systemic resistance induction, the treatments didn't differ (p>0.05) of the control. The biochemical analyses also didn't differ among then. Thus, it can be concluded that TPP is thermostable and has direct effect on conidium germination of *C. truncatum*. Besides that, the TPP and ASM have the potential to induce local resistance in soybean plants against the pathogen.

Keywords: Anthracnose of soybean; *Glycine max*; Alternative control; *Streptomyces scabies*

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja corresponde cerca de 35 milhões de ha no Brasil, tratando-se da cultura que mais cresceu nas últimas três décadas, com uma estimativa de aumento de taxa de crescimento de 2,6% ao ano de 2017 a 2026 (OECD 2017; IBGE 2018). Esse aumento está associado com os avanços tecnológicos ao manejo e eficiência dos produtos. Contudo, alguns fatores interferem no desenvolvimento e produção da cultura, por exemplo, as pragas, plantas invasoras e as doenças (MAPA 2016).

As doenças fúngicas na cultura da soja ocorrem em maiores proporções, quando comparadas com outros organismos causadores de doenças. A antracnose é um exemplo de doença fúngica, que causa perdas em regiões de cultivo de soja em todo o mundo, sendo um dos principais problemas no cerrado brasileiro (Sant'anna et al. 2010; Godoy et al. 2016)

Para o controle da antracnose são utilizados diversos métodos, principalmente o químico para o tratamento de sementes e cultural para a parte aérea. Devido ao excesso de utilização desses agrotóxicos há uma preocupação com a preservação do meio ambiente e a saúde humana, o que tem aumentado a busca por controles alternativos como o controle biológico e o genético, através da indução de resistência nas plantas. O controle genético ainda é um método pouco explorado para a antracnose da soja, poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se determinar a reação de cultivares comerciais de soja ao patógeno. Esse estudo é necessário para que exista um conhecimento dos genes envolvidos como uma estratégia para o desenvolvimento de novos cultivares com genes que conferem resistência a doença (Brammer et al., 2004)

Tratamentos com diversos agentes indutores, incluindo fragmentos de células, extratos de plantas ou compostos químicos, podem induzir resistência nas plantas, contra um subsequente ataque de um patógeno, seja essa resistência local ou sistêmico (Walters et al. 2008).

A indução de resistência ocorre devido a ativação de genes de defesas, que por sua vez, expressam a síntese de proteínas de defesas presente nas plantas, como, polifenoloxidades (PFO), fenilalanina-amônia-liase (FAL), as proteínas (RP) (por exemplo, peroxidase, quitinase e β 1-3 glucanase), o acúmulo de compostos fenólicos, bem como acúmulo de lignina no local de penetração do patógeno (Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F.; Romeiro 2005). Além disso, a planta pode entrar em estado de "priming", uma estratégia adaptativa que melhora a capacidade de defesa das plantas, resultando em um menor tempo de resposta e maior resistência (Goellner and Conrath 2008; Mauch-Mani et al. 2017). É bem

provável, que o fenômeno de indução de resistência seja baseado em uma combinação de indução direta e estado de “priming” (Ahmad et al. 2010).

A demanda por produtos biológicos fez crescer os estudos para a descoberta de agentes que poderão ser utilizados como indutores de resistência. O primeiro ativador químico de resistência, probenazole, foi registrado no Japão como oryzemate em 1975. Desde então, muitos ativadores químicos e biológicos vêm sendo descobertos, incluindo acibenzolar-S-metíl (ASM), registrado como Bion® (Syngenta), além do Elexa® e Messenger® (Axiom) (Walters et al. 2013).

Algumas bactérias são conhecidas por agirem como indutores utilizando suas fitotoxinas, as quais são importantes na colonização pelo patógeno (Goyer et al. 1998; Agrios 2005). O genêro *Streptomyces* é um exemplo, sendo actinobactérias gram-positivas que habitam o solo e são conhecidas principalmente pela sua capacidade em produzir compostos secundários biologicamente ativos (Goodfellow et al. 1988; Loria et al. 1997). As Streptomyces causam a sarna da batata, sendo conhecidas as espécies de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*. Essas bactérias, por sua vez, podem produzir uma toxina chamada de taxtomina A (TA), responsável pela causa dessa doença de importância mundial (Loria et al. 1997, 2006; Molesworth et al. 2010).

O grupo de fitotoxina chamadas de taxtomina foi descoberto em 1989 por Roland Thaxter, onde a partir disso, foi definida a sua estrutura como sendo uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2-5-dioxopiperazina, sendo um dipeptídeo derivado da fenilalanina e um aminoácido triptofano com radical nitrato, possuindo uma massa molecular de 438.44 g/mol (King et al. 1989). A taxtomina pode interferir no crescimento e desenvolvimento em diferentes espécies vegetais, pois é considerada uma toxina de amplo espectro e não específica (Leiner 1996).

Por sua vez, Pascholati et al. (2009) demonstraram o potencial da toxina taxtomina, produzida por S. scabies, na indução de resistência em sorgo contra *Colletotrichum lageenarium* (sin. *orbiculare*), fumo contra o TMV e pepineiro contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Garcia 2008). Esses resultados levaram ao pedido de patente PI0802664-5 A2, com depósito efetuado em 2008, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior.

Neste contexto, este trabalho busca informações para se demonstrar o uso em potencial dessa toxina na indução de resistência e entender aspectos bioquímicos da interação de *C. truncatum* x Glycine max, na busca pelo desenvolvimento de produtos alternativos aos

agrotóxicos. Essas informações contribuirão para desenvolver estudos posteriores em condições de campo, buscando o manejo integrado desta e outras doenças da cultura da soja.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Revisão bibliográfica

2.1.1. Importância econômica da cultura da soja

A soja é uma leguminosa, pertencente à família das fabaceae, originária da Ásia. Os grãos são utilizados para a alimentação humana e animal, principalmente através do consumo in natura, extração de óleo e produção de farelo. Essa cultura é cultivada em muitos países do mundo, sendo os principais produtores os Estados Unidos, Brasil e a Argentina, que, juntos, são responsáveis por 82% da produção mundial (CONAB 2017).

A cultura da soja é o cultivo agrícola que mais vem se expandindo no Brasil, caracterizando-se como a cultura vegetal de maior destaque na agricultura nacional e na balança comercial. Correspondendo a 49% da área agrícola plantada, o Brasil possui um papel relevante na oferta e demanda de produtos do complexo agroindustrial da soja a nível mundial, o que tem colaborado para o desenvolvimento de diversas regiões brasileiras, com destaque ao centro oeste e sul do Brasil (Lazzarotto and Hirakuri 2010; Gazola et al. 2012).

De acordo com dados da CONAB 2017, o Brasil alcançou em 2017 o desempenho recorde da safra de soja, com o crescimento de 1,9% na área plantada, obtendo-se uma produção de 113,9 milhões de toneladas. O excelente desenvolvimento da oleaginosa é devido ao clima favorável em praticamente todas as regiões do país. Entretanto, muitos são os fatores que estão limitando e interferindo na exploração deste potencial da cultura, o que traz constantes desafios para as diversas áreas da pesquisa agronômica. Integrando estes fatores limitantes estão as doenças que afetam a cultura (Fundação MT 2016).

2.1.2. Antracnose da soja

A antracnose da soja é uma doença fúngica que ocorre em todas as áreas de cultivo de soja do mundo, sendo as plantas, infectadas em qualquer estádio de desenvolvimento (Hartman et al. 2008). A espécie mais frequente associada com antracnose da soja é o *C. truncatum* (schw.) Andrus e Moore (= *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grov (= *C. dematium* var. *truncatum* (Schw.) V. Arx), (Manandhar 1985; Forseille 2007), (Fase teleomórfica:

Glomerella truncata) (Armstrong-Cho and Banniza 2006). Entretanto, outras espécies de *Colletotrichum* também podem estar envolvidas, como *C. coccodes*, *C. destructivum*, *C. gloesporioides*, *C. graminicola* e *C. cliviae* (Barbieri et al. 2017). Recentemente duas espécies, *C. chlorophyti* e *C. incanum*, foram descritas como causadoras da antracnose em soja nos Estados Unidos (Yang et al. 2013, 2014).

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

A antracnose da soja causa perdas de até 100% em cultivos no Brasil e na Índia, reduzindo estandes de plantas, qualidade de sementes e a produção final. Nos Estados Unidos as perdas podem chegar a 26% ou mais. Na Tailândia, foram relatadas perdas de 20-50% (Sinclair and Backman 1989).

Os principais sintomas causados pelo patógeno é necrose dos pecíolos, manchas nas folhas, hastes, vagens e morte de plântulas. O fungo, geralmente no interior das sementes ou através de inoculo proveniente de restos de cultura, desenvolve-se de forma latente, podendo ou não, expressar-se até o final do ciclo. O desenvolvimento dos sintomas dependerá das condições climáticas, fertilidade, densidade de semeadura e a presença de cultivares suscetíveis ou resistentes. As vagens infectadas adquirem coloração castanho-escuro à negra, e ficam retorcidas com o aumento da severidade. Nas vagens quando em granação, as lesões são observadas por estrias de anasarca, inicialmente, e evoluem para manchas negra. Entretanto, se houver ambiente favorável as partes infectadas, ficam cobertas por estruturas de frutificação do fungo. As plântulas, originadas de sementes infectadas, apresentam necrose dos cotilédones, podendo causar tombamento. As sementes infectadas apresentam manchas deprimidas, de coloração castanho-escuro (Godoy et al. 2016).

O micélio de *C. truncatum* é hialino, septado e ramificado. O acérvulo é de coloração negra, com pequenas setas espalhadas, uniformemente, sobre a superfície das partes afetadas. Os conídios medem 19,5 a 24 x 2 – 2,5 mm, curvado e fusiformes. Os apressórios são abundantes, com variação de 8,0 a 11,5 × 6,5 a 8 µm, clavados ou circulares (Hyde 2009).

O ciclo da doença se inicia com a infecção, onde as hifas penetram diretamente nos tecidos da semente, haste e pecíolo. Após a infecção, são formadas numerosas lesões

pequenas e profundas nos cotilédones. Com o aumento da severidade, as plântulas são atingidas causando morte pós- emergência. Alternativamente, o fungo pode se estabelecer em mudas infectadas sem o desenvolvimento de sintomas, estabelecendo uma infecção latente, ou seja, sem a presença de qualquer sintoma visível a olho nu (Chattopadhyay et al. 2015). Esse comportamento se dá até que as plantas sejam submetidas a condições favoráveis. A infecção nas vagens pode ocorrer quando ainda verdes, mas permanecem quiescentes até o amadurecimento das mesmas, geralmente no estádio R5.2, como observado em cultivos no Brasil (Klingelfuss and Yorinori 2001). Nessas condições, os conídios, produzidos em acérvulos, são disseminados através da água, vento e sementes, onde iniciam a infecção secundária produzindo apressório após a germinação (Kuo et al. 1999; Goulart 2009).

O principal meio de transmissão e sobrevivência é a semente, entretanto, o patógeno sobrevive como saprófita em restos culturais ou em hospedeiros alternativos (Manandhar; Hartman, 2008). No Brasil, a maior incidência e severidade da antracnose se destaca na região do Cerrado, isso se deve, as condições climáticas favoráveis (Godoy et al. 2016). Wong et al., (1983) relataram que a temperatura ótima para o crescimento e esporulação de *C. truncatum* foi 25 e 20ºC, respectivamente. A severidade da doença aumenta quando as temperaturas médias permanecem em torno de 28,4ºC, com umidade relativa média de 76% e precipitação média de 92,5 mm (Chattopadhyay et al. 2015).

2.1.3. Medidas de controle

Na tentativa de minimizar os danos causados pela antracnose, métodos de controle são incorporados, antes ou durante a presença da cultura na área, com o intuito de impedir a entrada do patógeno ou diminuir o inóculo. O manejo integrado é a melhor alternativa para minimizar os danos causados pela antracnose. Práticas como adubação equilibrada, espaçamento adequado, aquisição de sementes de alta qualidade, tratamento de semente com fungicidas, evitar adensamento, rotação de cultura e plantio de variedades resistentes, são recomendados (Dias 2014).

O controle químico é um dos métodos mais recomendados para o manejo da doença (Subedi et al. 2016). O AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do MAPA - possui na sua base, 51 produtos registrados para o controle da antracnose, seja através do tratamento de sementes ou aplicação foliar (Agrofit 2018).

O tratamento de sementes é indispensável para o desenvolvimento da cultura. A ação combinada de fungicidas sistêmicos com protetores tem sido uma estratégia das mais eficazes no controle desse patógeno. O método apresenta um custo relativamente baixo e resulta em reflexos altamente positivos para a sustentabilidade da cultura. Os principais fungicidas utilizados no tratamento de sementes são: carbendazin + thiram, vitavax-thiram, fludioxonil + mefenoxan, thiram, captan e tolylfluanid (Goulart 2009).

Utilizar-se de práticas culturais é o método preventivo mais adequado para o controle da antracnose. Através de práticas de manejo do solo, manejo da cultura e evitando-se microclima favorável, o inóculo do patógeno pode ser reduzido na área. Entre as práticas de manejo do solo, é recomendado o revolvimento dos restos culturais, utilizando então, o preparo convencional, diminuindo a incidência da doença (Khare and Chacko 1983). Porém, com uma visão holística do sistema de produção, o mais adequado é a implantação do sistema de plantio direto. Nesse caso, deve-se utilizar a rotação de cultura, com plantas que não são hospedeiros do patógeno, diminuindo o inóculo na área.

Outro método é o controle genético, porém ainda é um método pouco explorado para o controle desta doença. Geralmente, não são realizados testes de reações de cultivares à antracnose da soja em empresas de melhoramento. Quando realizados, geralmente, utilizam-se de plântulas, pois neste estádio a planta se encontra mais vulnerável ao ataque do patógeno.

Inoculações realizadas em estádio V1/V2 mostram-se diferentes em sua reação genética, quando comparadas com inoculações realizadas em V5/V6. Costa et al. (2009), determinaram a reação de cultivares de soja em estádio V1/V2, como: Tabarana e EMGOPA 316, suscetíveis; Anta 82 e Msoy 8400 resistente. Da mesma forma, o experimento foi realizado, porém, em estádio V5/V6. Como resultado os pesquisadores obtiveram: Tabarana, Intermediário; EMGOPA 316, Anta 82 e Msoy 8400, resistentes. O aumento da resistência é devido aos mecanismos de resistência/defesa da planta adulta. Há evidências de que, o acúmulo de fenóis e a atividade de enzimas oxidantes incrementa a resistência de cultivares de soja (Chattopadhyay et al. 2015)

Apesar da crescente importância da doença no Brasil, há poucos estudos de métodos de controle alternativo, como controle biológico e indução de resistência (Eliza et al. 2008).

2.1.4. Controle alternativo

Devido aos problemas relacionados à toxidade dos fungicidas, desenvolvimento de resistência a fungicidas por agentes patogênicos e aos efeitos potenciais sobre o meio ambiente e a saúde humana, bem como a necessidade de reduzir as perdas, foram propostas novas estratégias de controle (El-Ghaouth 1997; Jijakli et al. 2001). Medidas de controle alternativo, como controle biológico e a indução de resistência podem afetar diretamente os agentes patogênicos ou induzir mecanismos de resistência nas plantas (Stevens et al.; Wisniewski et al. 1991).

O controle biológico tem sido pesquisado principalmente nas áreas da entomologia e fitopatologia. Em fitopatologia, o termo aplica-se ao uso de microrganismos antagonistas para diminuir o inóculo na área. Em ambas as áreas, os organismos que agem sobre a praga ou patógeno é referido como agente de controle biológico. Mais amplamente, o termo controle biológico tem sido também aplicado no uso de extratos de produtos naturais ou fermentados proveniente de várias fontes. Mais estritamente, o controle biológico refere-se à utilização de organismos vivos, introduzidos ou residentes na área, com a função de diminuir as populações de um ou mais patógenos das plantas (Pal and McSpadden Gardener 2006).

O controle utilizando microrganismos de controle biológico tem sido testado em sementes contra antracnose da soja. Shovan et al. (2008) relataram efeito significativo de Trichoderma harzianum, apresentando efeito antagônico sobre o crescimento micelial *in vitro* de *C. truncatum*, inibindo em 89,4% o crescimento. *Bacillus subtilis* (isolados AP-3 e PRBS-1), oriundos de solos do estado do Paraná, Brasil, tem-se mostrado eficiente na inibição de patógenos de sementes, incluindo *C. truncatum*. Além disso, o crescimento da bactéria promove incremento no crescimento da soja (isolado AP-3) e estimula o desenvolvimento das raízes laterais (isolado PRBS-1), (Araújo et al. 2005).

2.1.5. Controle de patógenos através da indução de resistência

“Na natureza, resistência é a regra, e a doença é a exceção! ” (Tomiyama 1963; Agrios 2005). Isto se deve a capacidade da planta em evitar ou atrasar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno. Todas as plantas em seu ambiente natural, se desenvolvem sob ameaça de seus inimigos, sejam estes insetos herbívoros ou microrganismos

patogênicos. Evolutivamente, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa capaz de barrar o ataque desses patógenos. Essas barreiras denominadas de defesas constitutivas são representadas por estruturas, como: fibras vasculares, adaptações em estômatos, ceras, tricomas, cutículas e parede celular espessa. Além disso, as plantas também possuem defesas bioquímicas pré-formadas, como: enzimas hidrolíticas, glicosídios, fototoxinas, fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, fenólicos, cianogênicos e inibidores protéicos. Por outro lado, existem mecanismos de defesas que são sintetizados durante ataque do agressor, seja ele biótico ou abiótico. Os mecanismos envolvidos são: a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, deposição de goma e formação de tiloses, além de compostos como as proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP), fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio Agrios 2005; Pascholati 2018).

Plantas, quando submetidas à agentes bióticos ou abióticos, podem exibir resistência a patógenos de interesses. Nesses casos, após a indução, a resistência é aumentada, ou seja, compostos pós-formados são sintetizados, deixando a planta preparada, contra posteriores invasões (Deverall and Dann 1995).

A primeira linha de imunidade inata em plantas é o reconhecimento do agente indutor (Heil and Bostock 2002). Nestes casos, as plantas possuem mecanismos de defesas inatos de reconhecimento para se defenderem dos ataques por patógenos. Por certo, essa defesa se dá de duas maneiras. A resistência específica de hospedeiras, também chamada de "*effector-triggered immunity*" (ETI), e resistência de não-hospedeiras ou defesa basal, conhecida como "PAMP-*triggered immunity*" (PTI) (Cui et al. 2009).

A ativação do sistema imune das plantas gera uma cascata de sinalizações via quinases, a qual esses sinais amplificam, através das vias sinalizadoras: ácido salicílico (AS), ácido jasmônico e o etileno. Esses eventos resultam na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e, subsequentemente, na resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida. Durante esses eventos, alterações de níveis de cálcio no citoplasma e produção de espécies reativas de oxigênio ocorrem simultaneamente (De Souza et al. 2008; Grant and Lamb 2006).

A resistência sistêmica adquirida é a resistência induzida por microrganismos patogênicos, onde a principal via sinalizadora é o AS, expressando principalmente as proteínas-RP. Por outro lado, a resistência sistêmica induzida é induzida por rizobactérias promotoras de crescimento, cujos principais sinalizadores são ácido jasmônico e etileno (Mauch-Mani and Métraux 1998; Pieterse et al. 2001; Bostock 2005). Nesse contexto, SAR e

ISR são entendidas praticamente como sinônimos. Devido a isso, muitos autores preferem o uso do termo geral, indução de resistência (Hammerschmidt et al. 2001).

A SAR, apresentando uma resistência de amplo espectro, tem a potencialidade de reduzir perdas na cultura da soja, causadas por diversos patógenos. Wrather (1990) efetuou o primeiro relato de SAR em plantas de soja, sendo induzidas após a infecção por *C. truncatum*. O gene *GmPR1* (gene relacionado a patogênese) é induzido após o tratamento de plantas de soja com o indutor ácido 2,6-dicloroisonicotinico. Hajimorad and Hill (2001), relataram a indução do gene GmPR1, tanto após o tratamento com AS quanto após a infecção de folhas de soja por *Soybean mosaic vírus* (SMV). O aumento da atividade enzimática após a infeção do fungo em sementes pode resultar em maiores níveis de proteínas totais (Farag et al. 1985).

Após o reconhecimento pela planta, uma das primeiras defesas a serem sintetizadas são espécies reativas de oxigênio, as quais criam uma condição chamada de estresse oxidativo, o que pode danificar alguns componentes celulares (Apel and Hirt 2004). As plantas evolutivamente desenvolveram um eficiente sistema antioxidante para se protegerem (Mittler et al. 2004), neutralizando os efeitos tóxicos das ROS com neutralizadores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Ahmad et al. 2008). Essas espécies químicas influenciam diversos genes que estão diretamente envolvidos no metabolismo e em vias de transdução de sinais, agindo, portanto, como “mensageiros secundários” ou “moléculas sinalizadoras” (Barbosa et al. 2014). Além disso, elas podem se acumular no início do processo infeccioso das interações patógeno-hospedeiro, sendo compatível ou incompatível, processo conhecido como explosão oxidativa, em resposta a infecção por fungos e bactérias (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008).

As plantas também possuem mecanismos de defesa que envolve alterações metabólicas, diretamente ligadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário, como a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008).

A enzima peroxidase é amplamente distribuída na natureza, e pode ser encontrada em animais, microrganismos e plantas. Essa enzima pode ser ativada através de danos na membrana plasmática da célula, causada pela ação de enzimas proteolíticas ou ruptura mecânica (Reimmann et al. 1992). Tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tornando-o inofensivo. O H_2O_2 é um agente oxidante forte, podendo ser tóxico se acumulado. Assim, as peroxidases eliminam o excesso do H_2O_2, seja em condições normais ou de estresse (Bania and Mahanta 2012). Por sua vez, as peroxidases catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico, que, quando presente o

peróxido de hidrogênio, origina-se a lignina. A lignina é um polímero, que juntamente com outros polissacarídeos, formam uma barreira física à penetração fúngica, ocorrendo a lignificação, a qual pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais

A fenilalanina amônia-liase (FAL) possui grande importância no metabolismo secundário das plantas (Kuhn 2007). Sua função é catalisar a eliminação não oxidativa da amônia da L-fenilalatina, transformando em ácido trans-cinâmico, o qual é o primeiro produto formando na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (Jones 1984; Ritter and Schulz 2004). Segundo Chakraborty et al. (2001), a atividade da fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, sendo considerada por muitos autores como “proteína do estresse”, relacionando-se com desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas.

Por fim, as plantas também sintetizam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP), as quais são responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteínas solúvel durante as respostas de defesa (Stintzi et al. 1993). Estas proteínas foram detectadas pela primeira vez em 1970, exibindo reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico (TMV) (Pascholati 2018). As proteínas RP são induzíveis no hospedeiro em resposta a infecção por um estímulo biótico ou abiótico, podendo estar relacionadas com a resistência não especifica do hospedeiro ao patógeno (Stangarlin et al. 2011). Segundo Pascholati (2018), existem 11 famílias das PR-proteínas. A família PR-2 é representada pelas proteínas com atividades de β-1,3-glucanase e a PR-3 pelas proteínas com atividades de quitinase (Bertoldo and Miguel Mazaro 2018). Essas enzimas líticas hidrolisam a quitina (quitinase) e as β-1,3-glucanas (β-1,3-glucanases) e são encontradas nas plantas e podem estar envolvidas na defesa contra fungos, já que os polímeros (quitina e β-1,3-glucanas), são os principais componentes da parede celular fúngica. Plantas quando submetidas a estresses sintetizam essas proteínas aumentando sua resistência contra fitopátogenos, visto que essa estratégia garante a presença dessas proteínas em níveis ideais de resistência antes da chegada do patógeno (Pascholati 2018).

2.1.6. Streptomyces

Membros dos gêneros *Streptomyces*, também conhecidas coloquialmente como Streptomycetes, compreende um grupo de organismos grande e diverso. São bactérias gram-positivas que pertencem ao filo das Actinobacterias e apresentam um desenvolvimento

morfológico complexo, como a formação de esporos em cadeias e pseudomicélio filamentoso (Padilla-Reynaud et al. 2015). Embora a maioria das espécies de *Streptomyces* sejam habitante do solo, algumas, são patógenos importantes de plantas, como as Streptomyces scabies (Thaxt.) (Loria et al. 1997).

Essas bactérias produzem uma grande diversidade de moléculas bioativas, incluindo antibióticos e antifúngicos, sendo que devido a isso, são de grande interesse industrial (Leclerc et al. 2017).

Streptomyces scabies é um dos principais agentes da sarna comum da batata. Os principais sintomas nos tubérculos causados por este patógeno são lesões corticosas, superficiais ou profundas, reduzindo o valor comercial das batatas, especialmente aquelas destinadas ao comércio in natura (Hill and Lazarovits 2005; Souza Dias and Iamauti 2016). A severidade da doença aumenta a partir do aumento da síntese de fitotoxinas, liberadas pelo patógeno, dentro delas a taxtomina (Goyer et al. 1998; Healy et al. 2000).

2.1.7. Taxtomina

A Taxtomina é uma fitotoxina que inibe a biossíntese e a deposição de celulose em células das plantas (Scheible et al. 2003). Essas fitotoxinas são moléculas de baixa massa molecular (<1000 daltons) e, em baixas concentrações fisiológicas, se tornam ativas (10-6 – 10-8 M) (Goodman et al. 1986). Além disso, essas moléculas podem estar relacionadas a agressividade dos patógenos ou serem vistas como fatores de patogenicidade (Pascholati et al. 2008; Möbius and Hertweck 2009).

A estrutura e a fitotoxicidade da taxtomina foram originalmente descritas por Lawrence, King e colaboradores (King et al. 1989; Lawrence 1990). A taxtomina foi caracterizada como sendo uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina, um dipeptídeo derivado da fenilalanina e um aminoácido triptofano com radical nitrato (King et al. 1989). Essa fitotoxina é o principal determinante de virulência produzido pelas Streptomyces (Jourdan et al. 2017).

A taxtomina vem sendo muito estudada pelo fato de estimular eventos de sinalizações das células vegetais. O fluxo de íons em resposta ao tratamento de taxtomina foi estudado através da membrana plasmática de raízes e tubos de pólen das plantas arabdopsis e tomate. O estudo foi feito utilizando a técnica seletiva de íons, conhecida como *microelectrode ion flux estimation* (MIFE) (Tegg et al. 2005). Após um minuto da aplicação

da toxina, foi observado nas raízes um fluxo de Ca^{2+} de curta duração. A taxtomina também afetou significativamente os perfis de fluxo de íons dos tubos de pólen que estavam em crescimento. Foi observado que a resposta do fluxo de Ca^{2+} nos tecidos que estavam em processo de elongação foi maior do que nos tecidos que não estavam se expandindo (Loria et al. 2006).

Estudos realizados por Duval et al. (2005), mostraram que a taxtomina A induziu morte programada de células em Arabidopsis em uma cultura de suspensão de células. A morte celular requer a expressão de genes ativos e a síntese de novas proteínas, além de envolver a fragmentação do DNA nuclear.

Por sua vez, Pascholati et al. (2009), com recursos financeiros parciais da FAPESP, demonstraram o potencial da toxina taxtomina, produzida por *Streptomyces scabies*, na indução de resistência em sorgo contra *Colletotrichum lagenarium* (sin. *orbiculare*), fumo contra o TMV e pepineiro contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Garcia et al. 2008). Esses resultados levaram ao pedido de patente PI0802664-5 A2, com depósito efetuado em 2008, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior.

Neste contexto, o projeto buscou informações importantes para se entender a bioquímica da interação de *C. truncatum* x *Glycine max*, na busca pelo desenvolvimento de produtos alternativos aos agrotóxicos, pelo uso das preparações de taxtomina. Finalmente essas informações contribuirão para a condução de estudos posteriores em larga escala em condições de campo, buscando o manejo integrado desta e outras doenças da cultura da soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise Estatística

3.1.1. Obtenção, cultivo e manutenção dos isolados de *C. truncatum*

Os isolados de *C. truncatum* foram obtidos junto ao Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ – USP: isolado CMES 1034, coletado em 2006 na cidade de Primavera do Leste – MT; isolado CMES 1059, coletado em 2004 na cidade de Londrina – PR e isolado CMES 1080, coletado em 2004 na cidade de Boa Vista – RO, todos os isolados foram identificados através de primers específicos (Rogério, 2017). Os fungos foram cultivados em meio de BDA (batata 20% + dextrose 2% + ágar 1,8% + 1000 mL de água destilada), sob fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro) e temperatura de 23oC, durante 7 dias em câmara tipo B.O.D.

3.1.2. Preparo da suspensão de conídios de *C. truncatum*

As suspensões de esporos de *C. truncatum* foram obtidas utilizando-se colônias dos fungos com 14 dias de crescimento em meio BDA. Foram adicionados 10 ml de água deionizada autoclavada sobre as colônias, e com o auxílio de uma alça de Drigalski, procedeu-se a liberação dos esporos. Utilizando-se um hemacitômetro, ajustou-se a concentração para 1 x 105 conídios/ml. Foram utilizados três isolados (CMES1059; CMES1080 e CMES1034) e duas placas de cada isolado, com 14 dias de crescimento, para o preparo da suspensão.

3.1.3. Preparo da suspensão de micélios de *C. truncatum*

Para o preparo das suspensões miceliais, após 14 dias de crescimento, seis discos de meio contendo micélio de cada isolado (4 mm de diâmetro) foram transferidos para fracos de Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionado 50 mL de meio batata dextrose (BD). Os frascos foram transferidos para mesa de agitação à 100 rpm e incubados por 5 dias, sob

temperatura de 24ºC. Após, a suspensão micelial foi transferida para tubos de 50 ml e centrifugada à 1.225 g, 4OC, por 20 min. Os "*pellets*" foram coletados, passados em gaze (para extrair o liquido resultante) e a massa do resíduo foi quantificada em balança analítica. Em seguida, foi adicionada água deionizada autoclavada (para uma concentração final de 40 mg/ml), sendo o material triturado com o auxílio de um liquidificador (duas vezes por 30 seg. em velocidade máxima). Foram utilizados três isolados (CMES1059; CMES1080 e CMES1034) e uma placa de cada isolado para o preparo da suspensão.

3.1.4. Obtenção dos isolados de *S. scabies*

O isolado de S. scabies foi obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), em Campinas, SP, sendo cultivado em meio de cultivo aveia-ágar, mantendo as placas em condições de escuro à 28 ºC por 20 dias.

3.1.5. Obtenção das plantas

No total foram avaliadas 16 cultivares cedidas pelas cooperativas C. Vale, Coodetec e TMG – Tropical Melhoramento e Genética. As sementes foram semeadas em vasos de 3L contendo o substrato "*Base plant*". As plantas foram mantidas em ambiente controlado a 25ºC em casa de vegetação. Com 15 - 20 dias de crescimento (estádios V1/V2), as plantas foram utilizadas para os testes nos diferentes bioensaios.

3.1.6. Obtenção dos tratamentos

3.1.6.1. Produção e extração da taxtomina parcialmente purificada (TPP)

O método utilizado para a produção e extração da TPP, foi o proposto por Garcia (2008), com algumas modificações. Por sua vez, o meio de aveia líquido (40 g de aveia em 1 L de água, batidos em liquidificador) foi utilizado para a produção da fitotoxina, sendo utilizados Erlenmeyers de 250 mL, sendo que cada um recebeu 100 mL do meio.

Das colônias de *Streptomyces scabies* cultivadas no meio sólido aveia-ágar, foram retirados 3 discos, obtidos com furador de rolha, retirados de regiões uniformes, e colocados em cada Erlenmeyer acima mencionado. O material foi mantido a 28 ºC e 150 rpm, por quatro dias, luz ambiente. Em seguida, o conteúdo foi coado com auxílio de gaze, para remover os discos do meio de cultivo.

Para realizar a extração parcial da toxina, o filtrado foi transferido para um funil de separação, adicionando-se 25 mL de acetato de etila para 15 mL do filtrado, na proporção de 5:3 (v/v), e coletando posteriormente a fração referente ao acetado de etila, a qual apresentava coloração amarela. O acetado de etila foi desidratado com sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado em capela. Posteriormente, o pó resultante deste procedimento foi suspenso em metanol P.A., e o filtrado armazenado em congelador (-20 ºC). O volume necessário para o experimento foi retirado e submetido a evaporação do metanol em capela. Para a preparação da concentração desejada da toxina foi adicionado água deionizada esterilizada.

3.1.6.2. Produção e extração do filtrado e células de S. scabies

Para a produção do filtrado e das células de S.scabies foi utilizada parcialmente a metodologia para a produção da TPP. Após cinco dias em agitação, o material foi triturado no liquidificar com adição de água na proporção 2:1 (água/células; (m/v)) para a produção das células. Para a obtenção do filtrado, foi centrifugado o material que estava em agitação (10.000 rpm por 20 min à 4 ºC) e com o auxílio de filtro tipo Millipore (0,25 µm) foi realizada a filtragem, obtendo-se o filtrado.

3.1.6.3. Acibenzolar - S - Metil e Fungicida

Foram utilizados o ativador de defesa acibenzolar - S - metil (Bion® 0,05 g p.c./ mL, Syngenta) e o fungicida foliar azoxistrobina + ciproconazole 60 + 24 g i.a./ 100L (Priori Xtra® 0,30 L p.c./ 100 L, Syngenta).

3.1.7. Bioensaios *in vitro*

3.1.7.1. Efeito da taxtomina parcialmente purificada sobre o desenvolvimento micelial *in vitro* de *C. truncatum*.

Para a condução do experimento *in vitro*, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata dextrose ágar), e adicionado a taxtomina parcialmente purificada (ressuspensa em água) na concentração de 100 µg equivalentes de taxtomina/mL. Para o controle foram utilizadas placas de Petri somente com o meio de cultivo BDA. Por sua vez, depositou-se no centro da placa um disco de meio contendo micélio do patógeno, e nas laterais da placa, com auxílio de um cortador, fez-se 4 furos no meio de cultivo com 1 cm de diâmetro cada, onde foram depositados 100µL de TPP em cada orifício (Fig 3), em seguida, as placas foram incubadas em câmara tipo B.O.D sob temperatura 24ºC ± 1, e fotoperiodo 12h/12h (escuro/luz). As avaliações foram realizadas após 6 dias de crescimento. Entretanto, foram realizadas avaliações do desenvolvimento micelial a cada dois dias e calculado o percentual de inibição do crescimento micelial e a taxa de crescimento do patógeno. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado , com dez repetições, onde cada placa de Petri representava uma repetição. As análises estatísticas foram realizadas submetendo os dados a Análise de Variância - ANOVA e para identificar tratamentos com efeitos semelhantes foi utilizado o teste T a 5%, com o programa Sisvar.

3.1.7.2. Efeito da TPP na germinação de conídios de *C. truncatum*

Para o teste de germinação dos esporos utilizou-se placas de Petri de poliestireno. Os tratamentos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos e concentrações utilizadas no teste de germinação dos conídios de *C. truncatum*

Tratamentos	Concentrações
TPP	100 µg equivalentes de taxtomina/ mL
TPP autoclavada	100 µg equivalentes de taxtomina/ mL
Fungicida Priori Xtra	1,5 mL/L
Filtrado de *S. scabies*	Diluição água:filtrado (2:1;v:v)
Filtrado autoclavado de *S. scabies*	Diluição água:filtrado (2:1;v:v)
Água deionizada	_

Em placas de Petri de poliestireno foram pipetados 50 µL de cada tratamento (concentração inicial: TPP 200 µg/mL, TPP autoclavada 200 µg/mL, fungicida Priori Xtra 3 mL/L) e 50 µL da suspensão de esporos (concentração de 2x105 esposos/mL), formando uma gota de 100 µL. O experimento foi inteiramente casualizado, contendo sete repetições, em que cada repetição consistiu de seis gotas na mesma placa. As placas foram incubadas em câmara de incubação tipo B.O.D à 24ºC, fotoperiodo de 12/12. Após 12 horas foi avaliada a germinação de 100 esporos ao acaso por repetição e medidos 30 tubos germinativos ao acaso por tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem de germinação. As análises estatísticas foram submetidas a Análise de Variância - ANOVA e para identificar tratamentos com efeitos semelhantes foi utilizado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey a 5%, com o programa Sisvar.

3.1.8. Bioensaio *in vivo*

3.1.8.1. Padronização da inoculação do *C. truncatum*

Sementes da cultivar CD 254RR (obtidas junto a COODETEC) foram utilizadas nesse experimento. Com 15 dias de crescimento (estádios V1/V2, primeiro e segundo nó, primeiro trifólio expandido (FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. IOWA State University. Special report 80, March, 1977.)), as plantas foram inoculadas com os diferentes isolados do patógeno, utilizando-se a preparações de inóculo as quais eram agitadas periodicamente até o ponto de escorrimento. Em seguida, foram transferidas para câmara úmida, fotoperiodo 12/12, sob condições de umidade relativa (acima de 90%) e temperatura de 25ºC, por 24, 48 e 72h

após a inoculação, respectivamente. A severidade da doença foi avaliada 10 dias após a inoculação.

A severidade da doença foi avaliada com base em observação visual das plantas inoculadas, utilizando-se uma escala de notas variando de 0 – 4 (fig. 1), (Yang and Hartman, 2013).

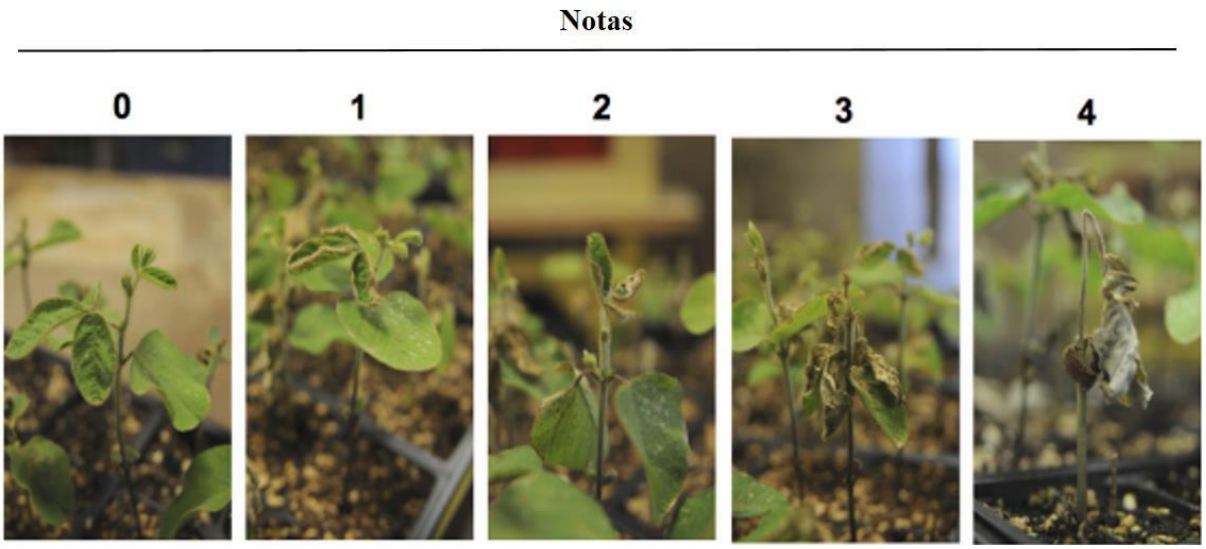

Figura 1. Escala de notas desenvolvida para avaliação de reação de plantas de soja à *C. truncatum*. Notas de 0 – 4 correspondem: 0 – sem sintomas; 1 – Necrose nas veias das folhas; 2 – Lesões nos folhas e pecíolos; 3 – Lesões nas folhas, pecíolos e hastes e 4 – Plantas mortas. Modificado de Yang and Hartman, 2013.

O delineamento foi em blocos casualizados em esquema fatorial 6 x 2, sendo que o 6 é a combinação dos fatores Tipo de inóculo e isolado (3 x 2). Os mesmos foram submetidos a análise de variância, visto que apresentaram resíduos normais e variâncias homocedasticas. Após identificar diferenças significativas aplicou-se o teste de LSD a 5% de significância para comparações múltiplas entre as médias. Todas as análises de dados foram realizadas utilizando-se o ambiente R (R Core Team 2017) de computação estatística.

3.1.8.2. Reação das cultivares de soja a *C. truncatum*

Para definição da cultivar a ser utilizada nos testes de indução de resistência foi realizada uma avaliação prévia de diferentes cultivares. Foram utilizadas 16 cultivares cedidas pela cooperativa C. Vale, Coodetec e TMG - Tropical Melhoramento e Genética. Foi realizado teste de sanidade de sementes para evitar a utilização de sementes infectadas com *C.*

truncatum. Seis sementes das cultivares foram semeadas em vasos de 4L contendo o substrato "*Base plant*". O delineamento foi inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com 6 plantas. A suspensão micelial foi preparada de acordo com item 2.2.3, e inoculada nas plantas no estádio de desenvolvimento V1/V2 (Fehr and Caviness 1977). Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida com 90% de UR por 72 h., no escuro por 3 dias e em seguida, submetidas a U.R. de 70% sob fotoperiodo 12h/12h (luz/escuro), até completar dez dias. Após dez dias, foi realizada a avaliação da reação dos cultivares. A severidade da antracnose na soja foi avaliada de acordo com a escala de notas (fig. 1).

Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey a 5%.

3.1.8.3. Efeito dos indutores de resistência em plantas infectadas com *C. truncatum*

Neste experimento foi utilizado a cultivar DS 5916 IPRO no estádio fenológio V1/V2 (Fehr & Caviness 1977), As sementes foram semeadas em vasos de 1 L contendo substrato (*Base plant*). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 18 tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com 3 plantas. A aplicação dos indutores de resistência (preparações) e água (tab. 2), foram realizadas com intervalo de 3 dias antecedendo à inoculação de *C. truncatum* ou água. Deste modo, a aspersão dos tratamentos foi realizada com auxílio de um borrifador até o ponto de escorrimento. Da mesma forma, foi aspergida a suspensão de micélio após o período determinado. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas após a inoculação. A avaliação foi realizada durante dez dias após a inoculação, com base na presença ou ausência de sintomas, através de escala de notas (Fig. 1). As médias dos valores de severidade de cada tratamento foram utilizadas para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Campbell and Madden 1990). Com base nos resultados obtidos, foram conduzidas as análises bioquímicas dos tratamentos que apresentaram os melhores resultados.

Tabela 2. Tratamentos utilizados nas plantas de soja, cultivar DS 5916IPR, no estádio V1/V2 (Fehr & Caviness 1977), e inoculadas com micélio de *C. truncatum* 3 dias após o tratamento, para avaliação de indução de resistência.

Estádio de inoculação	Tratamentos
V1/V2	Com água e sem o patógeno
	Com água e com o patógeno
	Com TPP e com o patógeno
	Com TPP e sem o patógeno
	Com meio aveia e sem o patógeno
	Com meio aveia e com o patógeno
	Com células de *S. scabies* e com o patógeno
	Com células de *S. scabies* e sem o patógeno
	Com filtrado de *S. scabies* e com o patógeno
	Com filtrado de *S. scabies* e sem o patógeno
	Com fungicida e com o patógeno
	Com fungicida e sem o patógeno
	Com células autoclavadas de *S. scabies* e com o patógeno
	Com células autoclavadas de *S. scabies* e sem o patógeno
	Com filtrado autoclavado de *S. scabies* e com o patógeno
	Com filtrado autoclavado de *S. scabies* e sem o patógeno
	Com bion e com o patógeno
	Com bion e sem o patógeno

*Indutores aplicados 3 dias antes da inoculação do patógeno

3.1.8.4. Avaliação de resistência sistêmica adquirida

Plantas em estádio vegetativo V4 (terceiro trifólio expandido) foram utilizadas para avaliar a resistência sistêmica dos seguintes tratamentos: 1) acibenzolar – S – metil (Bion® 0,05 g p.c./ mL, Syngenta) ; 2) TPP 100 µg equivalentes de taxtomina/mL e 3) Água destilada (testemunha). Os indutores foram aplicados no segundo trifólio da planta e após três dias foi inoculado a suspensão micelial no trifólio acima (3º trifólio) (fig.2). O experimento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições. Para a avaliação, foi selecionado o trifólio subsequente ao que recebeu os indutores. A avaliação, utilizando-se a escala de nota da fig.1, foi realizada durante dez dias e calculada a AACPD. Através do programa "Quant", foi estimada a severidade dos trifólios no último dia de avaliação. Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey a 5%.

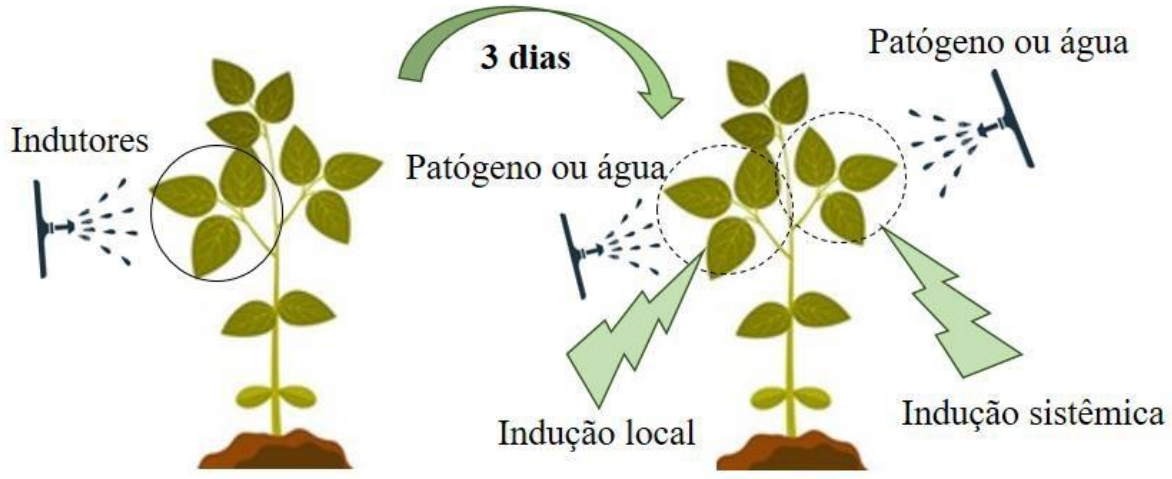

Figura 2. Esquema da aplicação dos tratamentos indutores e inoculação local e sistêmica de *C. truncatum*.

3.1.9. Análises bioquímicas

3.1.9.1. Aplicação dos tratamentos, obtenção e armazenamento do tecido foliar

Plantas da cultivar DS5916IPRO, em estádio V3 (segundo trifólio expandido), foram utilizadas neste experimento. Para cada planta foram marcados dois trifólios (primeiro trifólio completamente expandido ou segundo nó e segundo trifólio completamente expandido ou terceiro nó). Os tratamentos utilizados foram TPP 100 µg equivalentes de taxtomina/mL, ASM (Bion® 0,05 g p.c./ mL, Syngenta) e água deionizada como controle, e foram avaliadas a resistência local (1º trifólio) e sistêmica (2º trifólio). O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, onde cada planta representa uma repetição. Os tratamentos indutores foram aspergidos somente no primeiro trifólio, e três dias após, foi realizado a inoculação, utilizando-se suspensão micelial de *C. truncatum*, e após ambos os trifólios foram inoculados com o patógeno. O tratamento controle constitui de plantas tratadas com água deionizada, sem a presença do patógeno.

As coletas foram realizadas 0h, 72h e 142h após a aplicação dos indutores de resistência. Folhas completamente expandidas de cada planta nos diferentes tratamentos foram pesadas, embaladas em papel alumínio e acondicionadas em isopor contendo nitrogênio

líquido e imediatamente levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em ultra freezer à -80ºC para as análises.

3.1.9.2. Quantificação de compostos fenólicos totais

Amostras de folhas (0-3 a 0,5 g) de tecido doente ou sadio foram coletadas, e homogeneizadas mecanicamente, com auxílio de um almofariz, utilizando-se nitrogênio líquido. No pó resultante, foi adicionado 4 mL de metanol 50%, e o material incubado por 1,5h a 80ºC. Em seguida, com as amostras resfriadas, o homogenato foi centrifugado (20.000 g/ 15 min a 4 ºC), e o sobrenadante foi utilizado para a determinação dos fenóis livres pela reação de Folin-Ciocalteau e o precipitado para determinação dos fenóis ligados. Foi adicionado ao precipitado 2 mL de NaOH 0,5 M para saponificação de fenóis ligados à parede celular. Após 24 h, neutralizou a mistura com a adição de 9,5 mL de HCl 2M e centrifugou a 20.000 g/ 15min. O sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação dos fenóis ligados usando-se o regente Folin-Ciocalteau.

Para o teste de Folin-Ciocalteau, foi adicionado 3 mL de Na_2CO_3 (2%) a 150 µL do extrato aquoso de cada amostra, e o material mantido por 5 min. Em seguida, adicionou-se 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído em água na proporção 1:1 (v/v), e o material mantido por 20 min. Por fim, foi realizado a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm.

3.1.9.3. Obtenção dos extratos proteicos e análises enzimáticas

Amostras de folhas (0,3 - 0,5 g) foram coletadas e homogeneizadas mecanicamente com auxílio de um almofariz, utilizando-se 4 mL de tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,0). O homogenato foi centrifugado (20.000 g/ 25 min a 4 ºC), e em seguida coletou-se o sobrenadante (extrato enzimático), com o auxílio de pipeta tipo Pasteur e transferido para Eppendorf. O extrato foi mantido resfriado em gelo durante todo processo.

3.1.9.4. Atividade de guaiacol peroxidases

A atividade da peroxidase foi determinada através de espectrofotometria direta, sendo determinada a 30 ºC, com tempo de leitura de 1 min e 10 segundos, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Lusso and Pascholati 1999). Usou-se na cubeta de referência (branco) 2,9 mL de solução A (306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 250 µL de guaiacol) mais 100 µL do tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,0). A reação continha 0,10 mL do extrato enzimático e 2,9 mL da solução A. A atividade da peroxidase foi expressa em unidades de absorbância.min-1/mg proteína.

3.1.9.5. Quantificação de proteínas

Para o estabelecimento da curva padrão de proteína, foram numerados 15 Eppendorfs de 1,5 mL cada. Preparou-se 14 diluições a partir de uma solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) 25 µg/mL (Diluído 0,05 g BSA em 50 mL de H20 e diluído essa solução 40 x (100 µL + 3,9 mL H20)). Em seguida, foi adicionado 200 µL do reagente Bradford concentrado, agitando-se manualmente. Após 5 min, realizou-se a leitura da amostra em absorbância a 535 nm.

Em tubos de ensaios, adicionou-se 10 µL do extrato e completou-se o volume com H20 até 800 µL. Em seguida, adicionou-se 200 µL de Bradford e agitou-se cuidadosamente, evitando-se a formação de bolhas. Após 5 minutos, realizou-se a medida da absorbância 535 nanômetros. Por fim, determinou-se a concentração comparando-se a absorbância com a curva padrão, os resultados foram expressos em equivalente de mg de BSA g^{-1} de amostra, sendo essa concentração determinada com base em curva padrão de BSA.

4. RESULTADOS

4.1. Testes *in vitro*

4.1.1. Efeito das preparações da taxtomina parcialmente purificada sobre o desenvolvimento micelial *in vitro* de *C. truncatum*

Após a adição da TPP na concentração de 100 µg equivalente de taxtomina/mL ao meio de cultivo, não foram observadas diferenças estatísticas com base no teste de Tukey a 5% em comparação com o controle (água deionizada) (fig 3; tab 3).

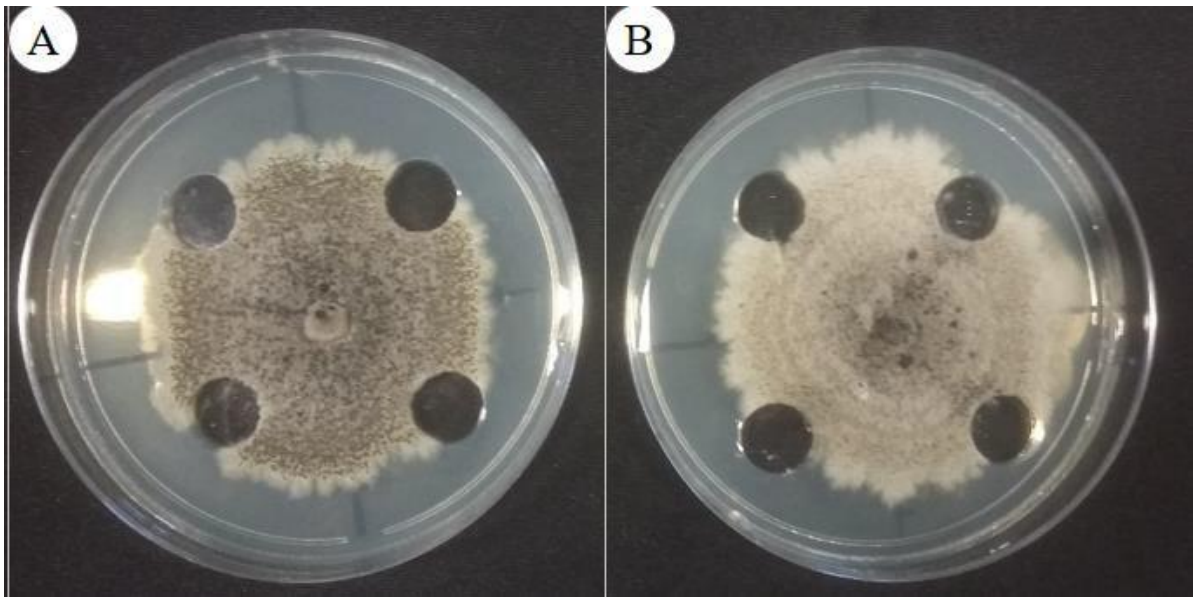

Figura 3. Crescimento micelial de *C. truncatum* após 6 dias de crescimento em meio BDA com taxtomina parcialmente purificada (A) e sem(B).

Tabela 3. Crescimento micelial *in vitro*, taxa de crescimento e porcentagem de inibição de crescimento - PIC do isolado 1059.

Tratamentos	Média de crescimento (mm)	Taxa de crescimento (mm/dia)	PIC %
Testemunha	71,19 a	6,01 a	_
TPP	70,49 a	6,01a	
CV (%)	2,22		0,98

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

4.1.2. Germinação dos conídios de *C. truncatum*

A taxtomina parcialmente purificada autoclavada e não autoclavada, na concentração de 100 µg equivalentes de taxtomina/mL, inibiu a germinação dos conídios de *C. truncatum*, (tab. 4; fig. 4), não diferindo do fungicida azoxistrobina + ciprocoanzole, indicado para o controle da doença pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. A taxtomina parcialmente purificada quando autoclavada não perdeu sua atividade biológica na inibição da germinação dos esporos.

O filtrado não autoclavado ou autoclavado não apresentaram efeitos na inibição da germinação dos conídios. Ao contrário, a germinação foi estimulada na presença desses tratamentos, evidenciando-se uma germinação maior do que o controle.

Tabela 4. Germinação *in vitro* dos conídios de Colletotrichum truncatum em placas de poliestireno, submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Germinação (%)	Inibição em relação a testemunha (%)
Filtrado	99,2 a**	-
Filtrado autoclavado	99,4 a	-
Agua deionizada	96,3 a	-
TPP*	3,7 b	97,3
TPP autoclavada*	0,8 b	99,2
Priori Xtra	0,0 b	100
CV%	8,87	-

**Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 1% de probabilidade.

* 100 µg equivalentes de taxtomina / mL.

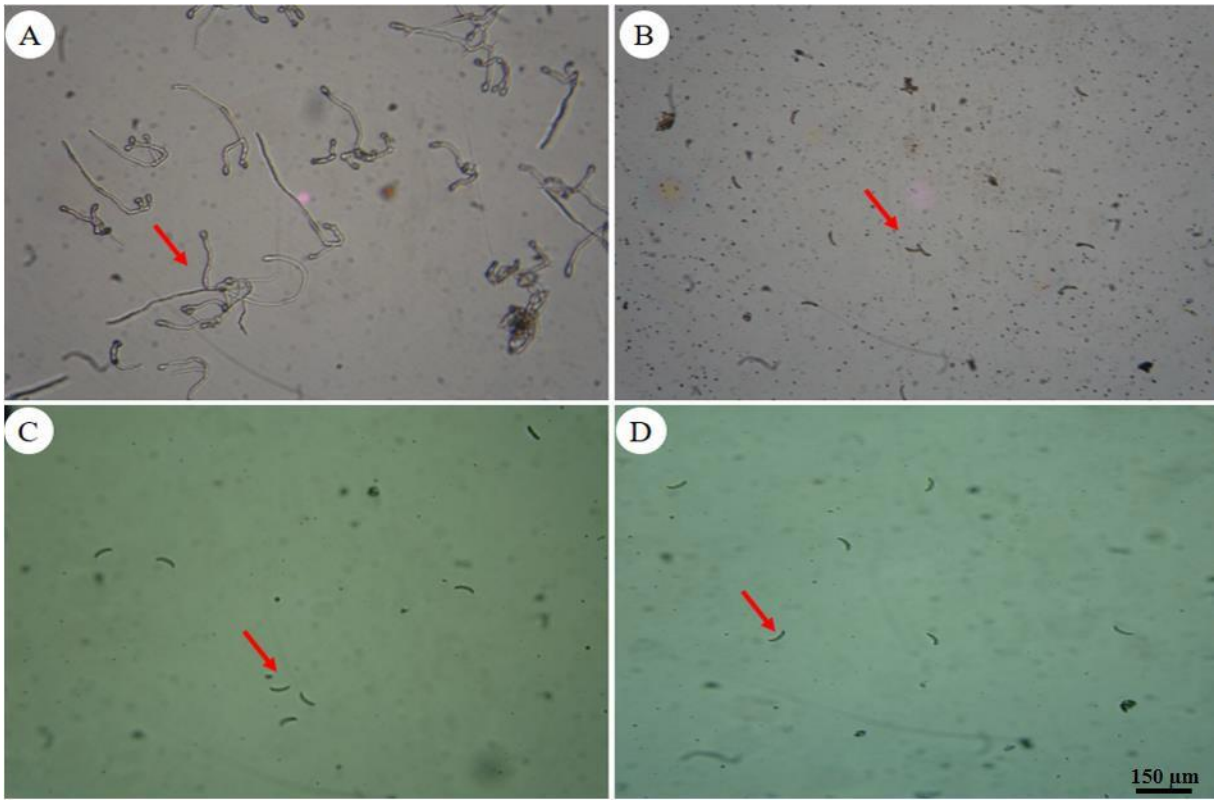

Figura 4. Germinação *in vitro* dos conídios de *C. truncatum* após 12 horas (setas vermelhas). A) Controle (Água deionizada); B) Fungicida Priori Xtra; C) TPP (100µg equivalentes de taxtomina/mL); D) TPP autoclavada (100µg equivalentes de taxtomina/mL).

4.1.3. Bioensaio *in vivo*

4.1.3.1. Padronização da inoculação do patógeno

Todos os isolados foram patogênicos em plântulas de soja (fig. 6), sendo que os resultados mostram (tab. 5) que houve diferença na agressividade dos isolados, em função do tempo de molhamento e tipo de inóculo. A tabela 5 mostra que no intervalo de 24h os isolados CMES 1034 e CMES 1059, inoculados na forma de suspensão de conídios, causaram maior severidade da doença, e não diferiram entre si, entretanto diferiram dos demais tratamentos. Com 48 h, somente o tratamento “Micelial CMES 1034” diferiu dos demais tratamentos, o qual exibiu a menor nota. As 72h após a inoculação, os isolados CMES 1059 e CMES 1080, inóculo do tipo micelial, apresentaram as maiores notas, diferindo dos demais tratamentos. Foi observado que o isolado CMES 1059 apresentou maior agressividade nos

tempos de molhamento 48 e 72h. O isolado CMES 1080, apresentou agressividade semelhante ao isolado CMES 1059 quando a inoculação foi realizada através de suspensão de micélio, diferenciando-se na suspensão de conídios. Na figura 5 pode-se observar o desenvolvimento da doença, através de notas, dos diferentes tratamentos. É observado maior diferença na suspensão micelial, onde as notas aumentam significativamente a partir do tempo de molhamento.

Na figura 6, a diferença na agressividade dos isolados foi observada, quando submetidos a um tempo de molhamento de 72 h.

Tabela 5. Comparações múltiplas entre médias de 2 tipos de inóculo de *C. truncatum* em 3 isolados avaliados em 3 tempos de molhamento, testados em plantas de soja. Resultados expresso através da escala de notas.

Tratamentos		Tempo de molhamento		
Tipo de inóculo	Isolado	24	48	72
Conídio	1034	2.8 aA	2.6 aAB	2.2 cB
Conídio	1059	3 aA	2.9 aA	2.3 cB
Conídio	1080	2.1 bB	2.8 aA	2.9 abA
Micelial	1034	2.2 bA	1.3 bB	2.6 bcA
Micelial	1059	2.2 bB	3.1 aA	3.3 aA
Micelial	1080	1.1 cB	2.7 aA	3 abA
Valor - p			<0.001	
Valor - p Isolado:Tipo de inóculo*Tempo de molhamento			<0.001	
CV (%)			25.4	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de significância.

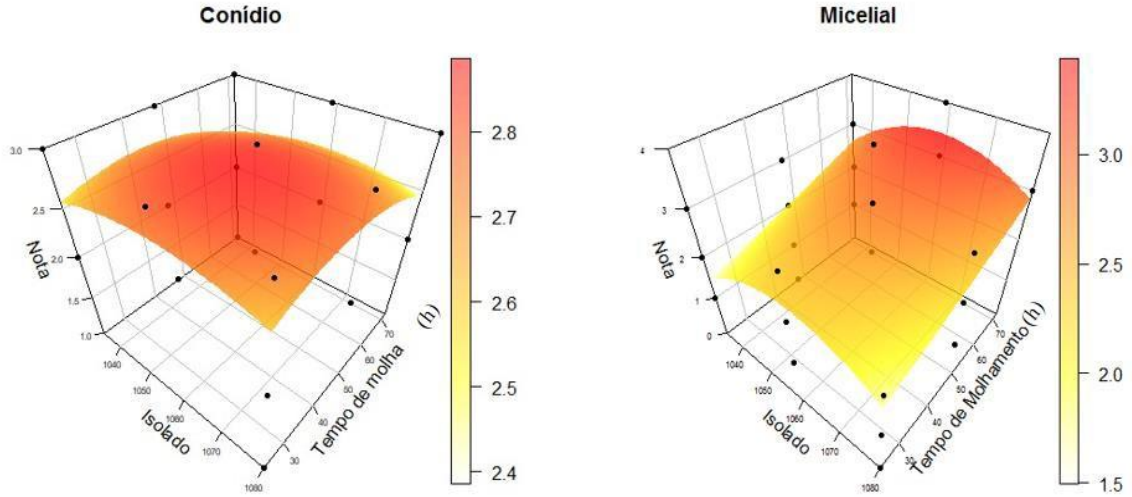

Figura 5. Superfície de resposta 3D para 2 tipos de inóculo em função de 3 de tipos de isolados de *C. truncatum* avaliados em 3 épocas de molhamento em plantas de soja.

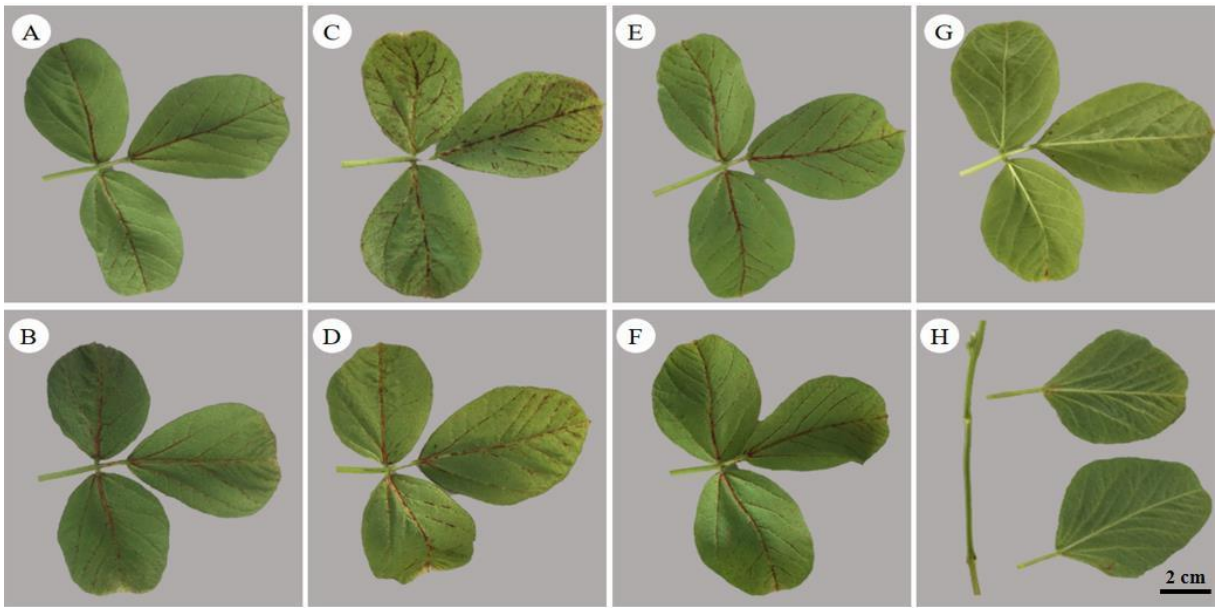

Figura 6. Plantas de soja avaliadas 10 dias após a inoculação de *C. truncatum* e submetidas a 72 horas de molhamento. A) Isolado CMES 1034, suspensão micelial. B) Isolado CMES 1034, suspensão de esporos. C) Isolado CMES 1059, suspensão micelial. D) Isolado CMES 1059, suspensão de esporos. E) Isolado CMES 1080, suspensão micelial. F) Isolado CMES 1080, suspensão de esporos. G) Testemunha inoculada com água (trifólios). H) Testemunha inoculada com água (folhas unifoliadas e haste).

4.1.3.2. Reação de cultivares à *C. truncatum*

Na tabela 6 podem-se observar as notas referentes a cada cultivar, em uma escala de 0 – 4, onde 0 é imune, 1 altamente resistente, 2 resistente, 3 moderadamente resistente e 4 suscetíveis. A cultivar SYN1059 RR foi o único a apresentar reação de resistência ao patógeno, e o cultivar DS5916IPRO apresentou-se suscetível ao desenvolvimento doença (Fig. 8).

Tabela 5. Teste de reação de cultivares de soja à *C. truncatum*

Cultivares	Grupo de maturação	Notas
SYN1059RR	5.9	2,83 a
M6410IPRO	6.4	3,04 ab
M6210IPRO	6.2	3,04 ab
63I64RSF IPRO	6.3	3,04 ab
M8372 IPRO	8.3	3,04 ab
TMG132RR	8.5	3,08 ab
TMG1180RR	8.0	3,12 ab
NA 5909 RG	5.9	3,12 abc
CD 254RR	8.0	3,25 bc
BS 2606 IPRO	6.0	3,25 bc
SYN 1561 IPRO	6.1	3,29 bc
M5917 IPRO	5.9	3,33 bc
TMG2185IPRO	8.5	3,51 cd
TMG7063IPRO	6.3	3,75 ef
TMG 7062 IPRO	6.2	3,79 ef
DS5916IPRO	5.9	4 f
CV %		11,44

* De acordo com o Registro Nacional de Cultivares – MAPA. Tukey 5%

Os resultados do teste de reação corroboram com a massa seca das plantas (fig. 7). Pode-se observar que os cultivares mais suscetíveis apresentaram menor peso das plantas, enquanto os cultivares mais resistentes apresentaram maior peso das plantas. Isso pode ser observado na figura 8, onde o cultivar DS5916IPRO exibiu menor massa e o cultivar SYN 1059 RR a maior massa.

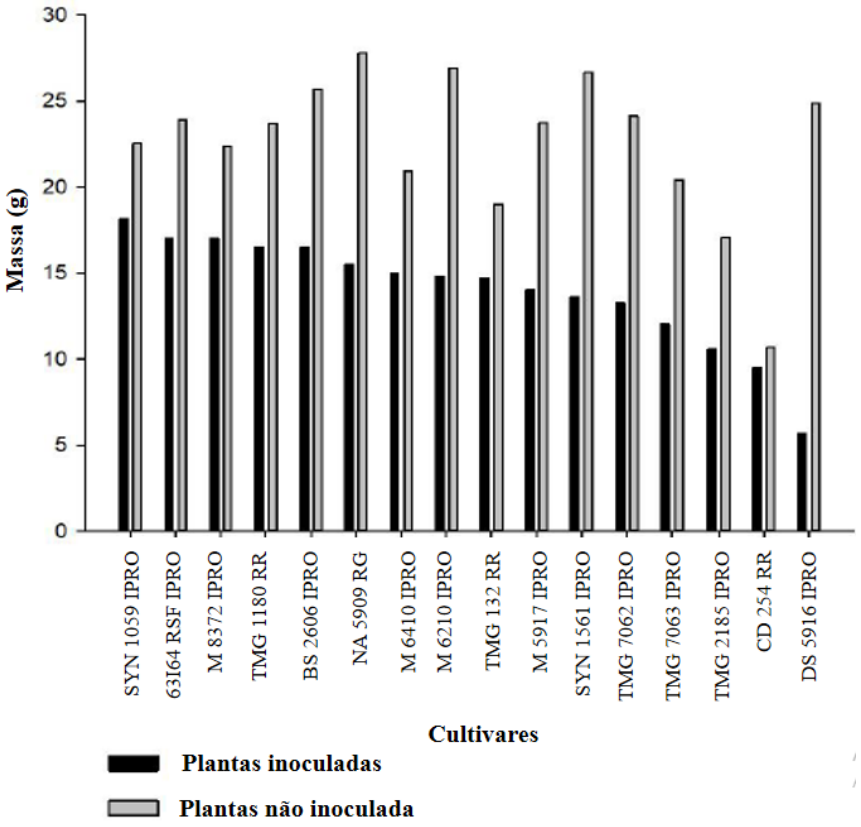

Figura 7. Massa das plantas de soja de 16 cultivares inoculados ou não inoculados com *C. truncatum* após 10 dias da inoculação.

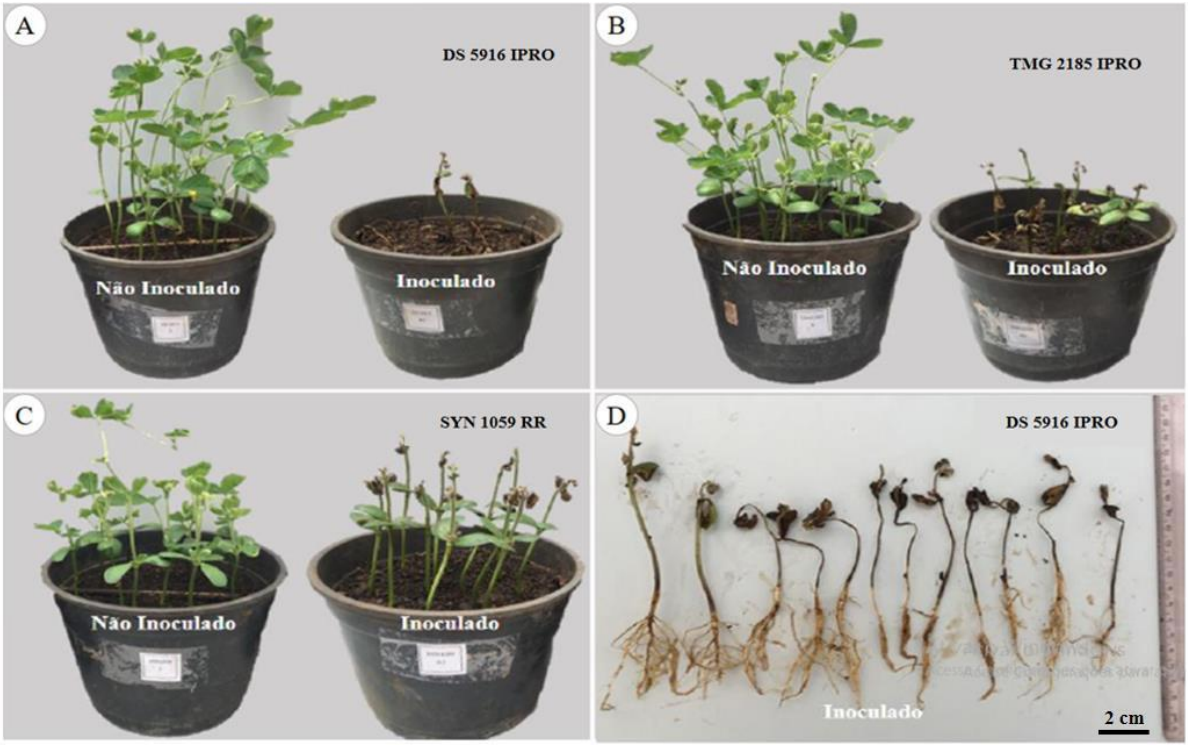

Figura 8. Cultivares de soja após 10 dias da inoculação com *C. truncatum*. A) Cultivar altamente suscetível, inoculado ou não inoculado (DS5916IPRO); B) Cultivar suscetível, inoculado e não inoculado (TMG2185IPRO); C) Cultivar resistente, inoculado ou não inoculado (SYN1059IPRO); D) Desenvolvimento do cultivar DS5916IPRO inoculado.

4.1.3.3. Efeito dos indutores de resistência no desenvolvimento da doença

As plantas de soja foram avaliadas durante dez dias após a inoculação do patógeno. Os resultados obtidos (tab. 7) mostram que os tratamentos acibenzolar - S - metil, azoxistrobina + ciproconazole, e taxtomina parcialmente purificada controlaram parcialmente a doença, quando comparados com a testemunha, a qual apresentou uma AACPD alta em relação a maioria dos tratamentos. Os tratamentos não inoculados não apresentaram sintomas.

Tabela 7. Área abaixo da curva do progresso da antracnose, após a inoculação de *C. truncatum* com 3 dias após a aplicação dos indutores em plantas de soja no estádio vegetativo V1/V2.

Tratamentos	AACPD
Filtrado de *Streptomyces scabies* / patógeno	16,62 a
Filtrado autoclavado de *Streptomyces scabies* / patógeno	16,30 a
Testemunha (água destilada) / patógeno	15,80 a
Células de *Streptomyces scabies* / patógeno	14,90 a
Células autoclavadas de *Streptomyces scabies* / patógeno	10,52 b
Meio aveia / patógeno	9,45 b
TPP / patógeno	7,16 c
Fungicida Priori Xtra / patógeno	2,75 d
Bion / patógeno	2,70 d

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente entre sí.

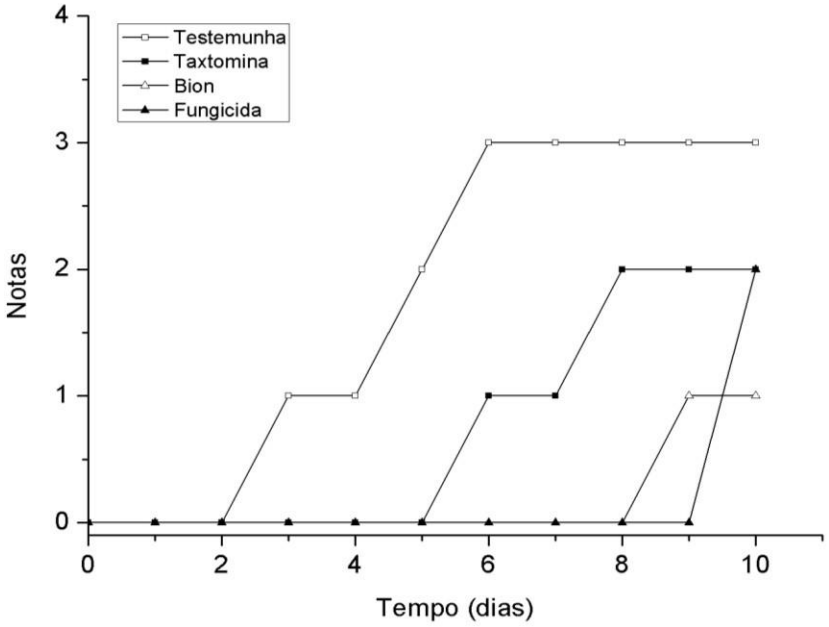

Figura 9. Curva do progresso da doença para os tratamentos com taxtomina, acibenzolar - S – metil, azoxistrobina + ciproconazole no controle de *C. truncatum*, na cultivar DS5916IPRO, inoculada aos 10 dias.

A figura 9 mostra o resultado do progresso da antracnose em dias. No tratamento controle o período de incubação da doença foi apenas 1 dia após a inoculação da suspensão micelial. Os outros tratamentos, indicados no gráfico, necessitaram de um período maior de tempo para o desenvolvimento dos sintomas, os quais foram observados somente em folhas e pecíolos, indicando que houve um atraso no progresso da doença em relação ao tempo quando comparado os tratamentos com a testemunha.

Na figura 10 são apresentadas imagens de plantas de soja após 10 dias da inoculação de *C. truncatum*. Na figura 10 (Letras B.H.I), representada pela TPP, ASM e fungicida

azostrobina + cicopronazole respectivamente, as plantas apresentaram sintomas somente nas nervuras principais das folhas, com poucas plantas apresentando sintomas nos pecíolos. As demais plantas tratadas apresentaram altos índices de severidade, com sintomas nas folhas, pecíolos e haste, não se diferenciando do controle água.

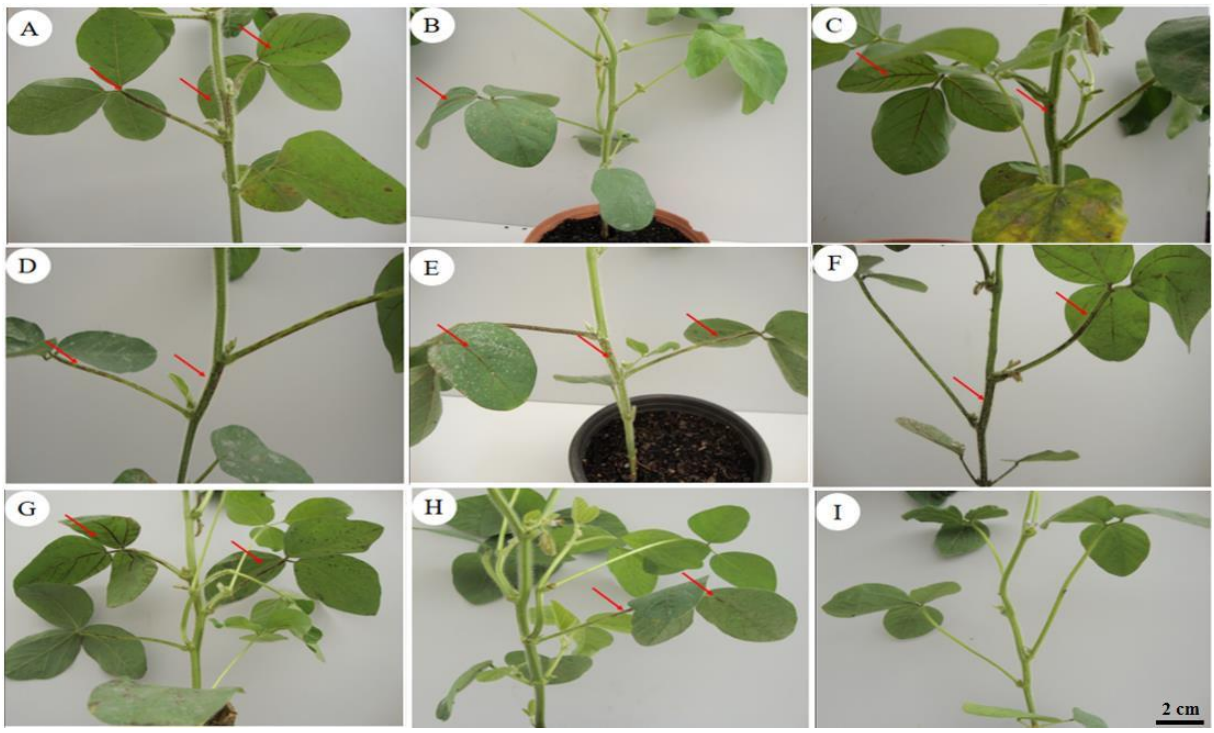

Figura 10. Sintomas em plantas de soja com 10 dias após a inoculação com *C. truncatum*. Os indutores foram aplicados 3 dias antes da inoculação do patógeno. (A) Controle; (B) TPP; (C) filtrado autoclavado; (D) Filtrado não autoclavado; (E) Células autoclavada; (F) Células não autoclavada; (G) Meio aveia; (H) Acibenzolar – S - Metílico e (I) Fungicida azostrobina + ciproconazole.

4.1.3.4. Avaliação de resistência sistêmica adquirida

Na tabela 8 observa-se que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, podendo-se afirmar que não ocorreu efeito sistêmico dos indutores. Na figura 11, as folhas após 10 dias da inoculação, foram fotografadas e a severidade analisada com o programa Quant, através da área lesionada (tab. 8). Pode-se observar que nos trifólios que receberam o indutor TPP, houve pouco desenvolvimento dos sintomas, sendo que a doença se expressou mais no pecíolo.

Tabela 8. Porcentagem de área foliar lesionada e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no trifólio superior em função de diferentes tratamentos aplicados no trifólio inferior. Trifólio superior inoculado com micélio de *C. truncatum* três dias após os tratamentos.

Indutores	Área lesionada (%)	AACPD
TPP	0,67 a	25,9 a
Acibenzolar- S – Metil	0,8 a	22 a
Controle	0,94 a	24,3 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente entre sí. Teste de tukey 5%.

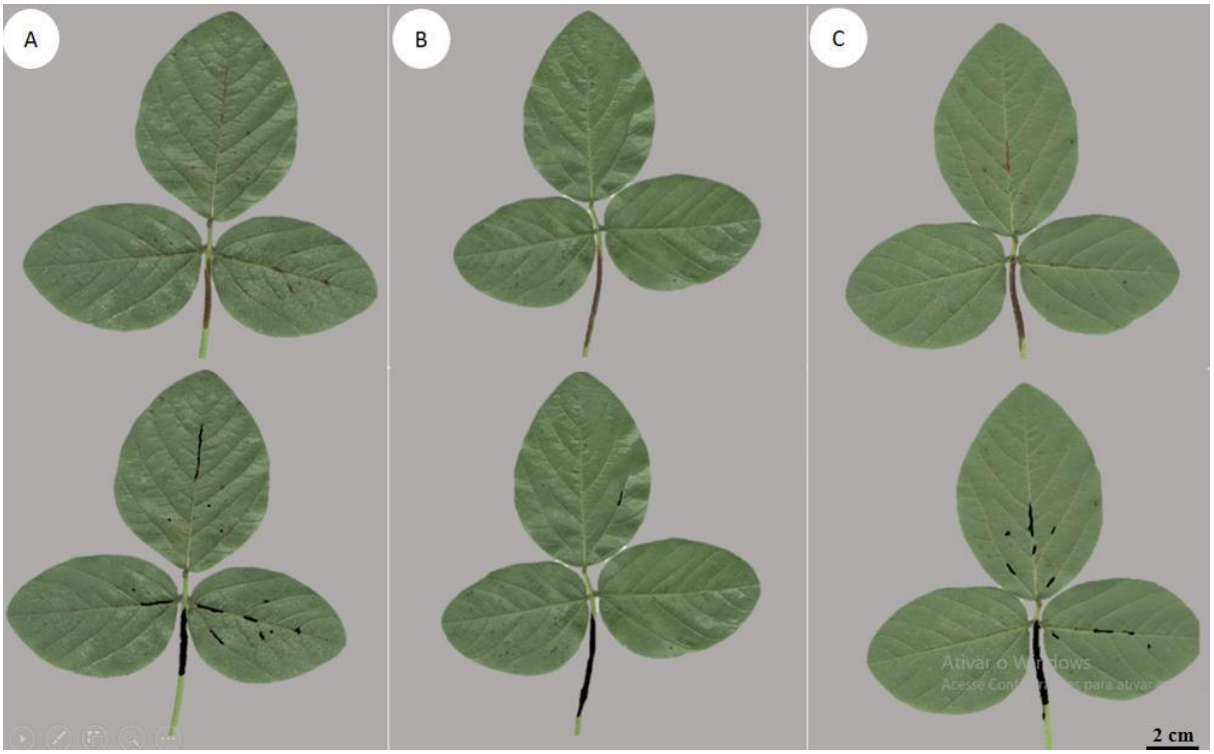

Figura 11. Bioensaio de resistência sistêmica induzida em soja contra *C. truncatum* com 10 dias após a avaliação. A) Testemunha; (água deionizada); B) TPP e C) Acibenzolar – S- metil.

4.2. Testes bioquímicos

4.2.1. Atividade de guaiacol peroxidases

A atividade local da enzima guaicol peroxidase (POX), nas plantas de soja tratadas com os diferentes indutores de resistência Acibenzolar-S-Metil e TPP, está representada na figura 12. Não houve diferença estatística nos tratamentos utilizados

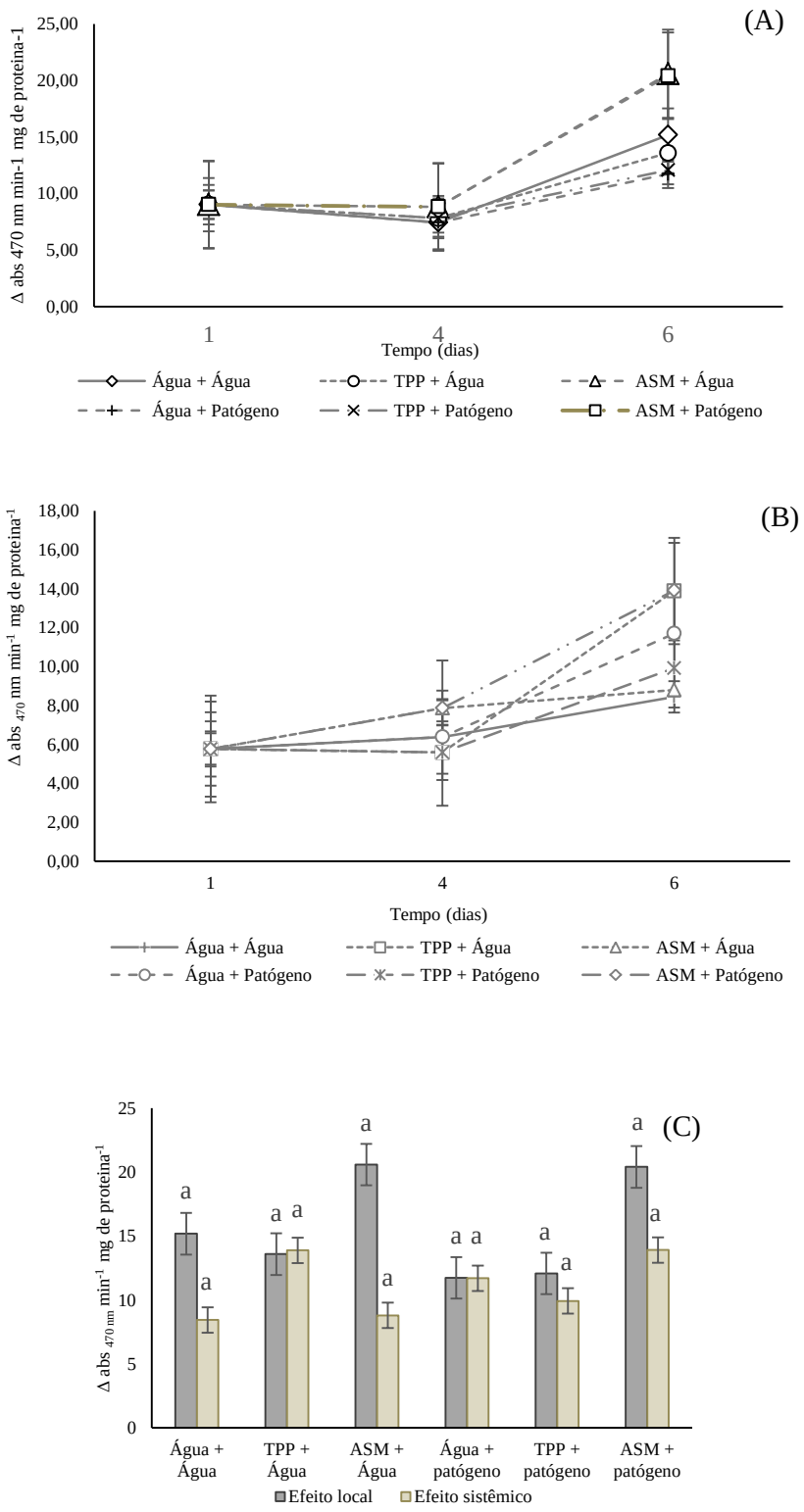

Figura 12. Atividade da enzima guaicol-peroxidase (POX) (Δ abs 470 nm min-1 mg de proteina-1), em soja, cultivar DS 5916 IPRO, tratadas com TPP ou acibenzolar-S-Metil e, posteriormente, inoculadas com o fungo *C. truncatum*. (A) Atividade local da enzima guaicol-peroxidase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Atividade sistêmica da guaicol – peroxidase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coletas (C) Contraste sistêmico e local da atividade da guaicol- peroxidase no sexto dia após inoculação.

4.2.2. Fenóis

O conteúdo de fenóis livres e ligados nas plantas tratadas com TPP ou ASM está representado na figura 13. (A e B), respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados.

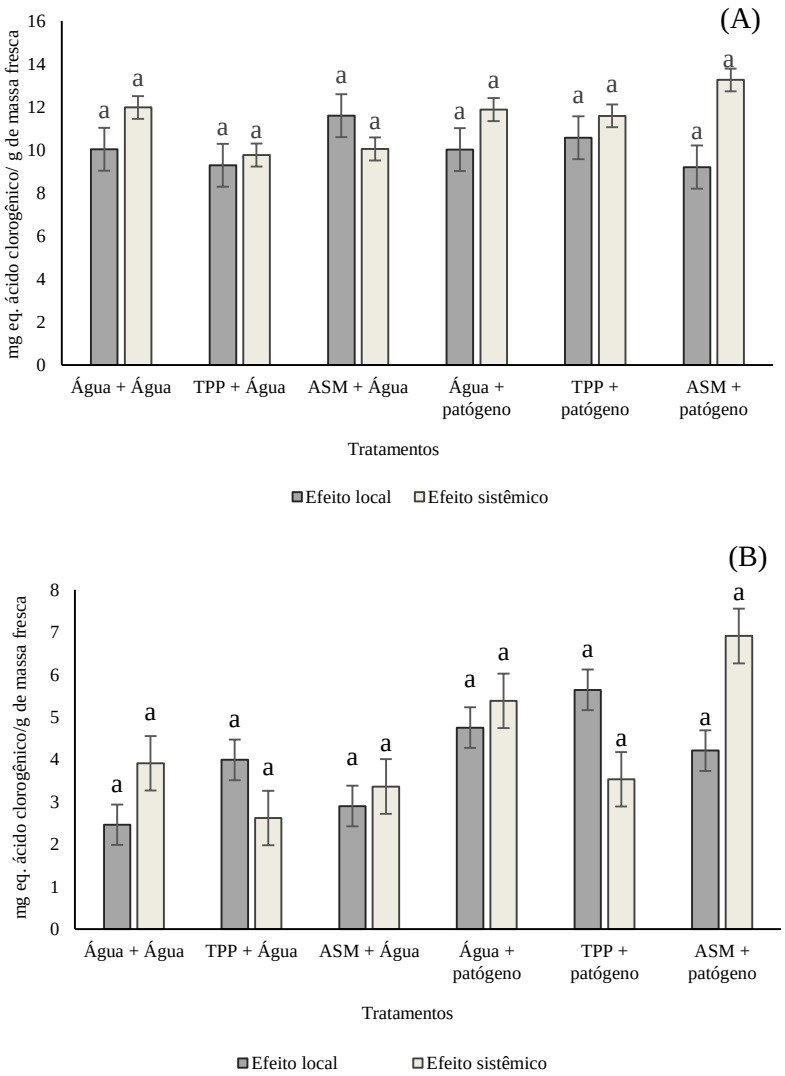

Figura 13. Conteúdo de compostos fenólicos em soja, cultivar DS 5916 RR, tratadas com TPP e ASM e, posteriormente, inoculadas com o fungo *C. truncatum*. Avaliação realizada com 6 dias após a aplicação dos tratamentos indutores (A) Conteúdo de fenóis livres. (B) Conteúdo de fenóis ligados.

5. DISCUSSÃO

5.1. Testes *in vitro*

As fitotoxinas possuem ação direta ou indireta sob o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Quase todas as espécies de fungos e bactérias produzem metabólitos fitotóxicos (Tringali and Tringali 1994; Singh et al. 2006). A Taxtomina A, é um exemplo de fitotoxina, a qual representa o principal fator de virulência de algumas espécies do gênero Streptomyces (Loria et al. 2006). Nos resultados dos testes *in vitro* apresentados, a TPP inibiu completamente a germinação de conídios de *C. truncatum*. A inibição pode estar envolvida aos processos fisiológicos na membrana plasmática dos conídios, relacionadas ao aumento transitório do nível de Ca^{2+} citosólico, assim como ocorre na membrana plasmática das células das plantas. Alguns relatos mostram que em *Phyllosticta ampelicida* e *Colletotrichum gloeosporioides*, a sinalização de cálcio mostrou-se necessária para o processo de germinação (Kim et al. 1998; Shaw and Hoch 2000). No entanto, com a presença da TPP pode-se haver um grande influxo de cálcio para dentro do citosol, desregulando e impedindo o processo de germinação. Estudos realizados por Warwar and Dickman (1996) demonstraram a importância do cálcio e da proteína primária de ligação ao cálcio, calmodulina (CaM), na regulação do processo de diferenciação (desenvolvimento do apressório) de *Colletotrichum trifolli*. Além disso, Ca^{2+} medeia o encistamento e a germinação dos zoósporos em *Phytophthora* spp (Irvingan and Bruce 1984) e *Pythium* spp (Deacon and Donaldson 1993). Diante do exposto, surge a hipótese da TPP estar envolvida na permeabilidade seletiva da membrana plasmática das células fúngicas, impedindo a germinação dos conídios de *C. truncatum*.

Além disso, foi observado que a TPP é termoestável, ou seja, não apresenta alteração em sua molécula após o período de autoclavagem (121ºC / 20min). De acordo com Leclerc et al. (2017), a maioria das toxinas produzidas por *Streptomyces* spp. são termoestáveis, em especial a Taxtomina A.

Ao contrário da TPP, o filtrado de S. scabies estimulou a germinação dos conídios, apresentando uma maior germinação em relação à testemunha. Esse efeito é explicado pelo fato da composição do meio aveia, utilizado para a produção do filtrado, possuir fontes de nitrogênio, carbono e nutrientes necessários para o crescimento fúngico (Pfaller et al. 2015).

Por sua vez, o fungicida azoxistrobina + ciproconazole inibiu a germinação total dos conídios. Azoxistrobina + ciproconazole é um fungicida da classe dos fungicidas sistêmicos e do grupo químico das estrobilurinas e triazóis. A atividade fungicida das estrobilurina resulta da sua capacidade para inibir a respiração mitocondrial por ligação no local denominado Q0 do citocromo b. Localizado na membrana mitocondrial interna de fungos e outros eucariotos, o citocromo c faz parte do complexo citocromo bc. Quando uma das inibições se liga, bloqueia a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c, que, por sua vez, interrompe o ciclo de energia dentro do fungo interrompendo a produção de ATP, impedindo a germinação dos conídios (Bartlett et al. 2002).

5.2. Testes *in vivo*

5.2.1. Padronização da inoculação de *C. truncatum*

No bioensaio, para se determinar a cultivar mais suscetível, foi necessário padronizar a inoculação do patógeno. Por sua vez, o melhor método para inoculação foi a suspensão de micélio, com o isolado CMES1059 e umidade relativa acima de 90% por 72 horas.

De acordo com Yang and Hartman (2015), a técnica de se utilizar a suspensão micelial proporciona várias vantagens em relação a suspensão de esporos, como a agressividade do isolado e a facilidade de preparo em grandes quantidades em culturas líquidas. Outros experimentos mostraram benefícios em se utilizar suspensão micelial, incluindo a infecção por *Micosphaerella fijiensis* em bananeiras (Donzelli and Churchill 2007).

Embora não fosse parte deste estudo, presume-se que o aumento da duração da umidade beneficiou o fungo diretamente, permitindo um período mais longo de condições ideais para seu crescimento, ou indiretamente, aumentando a susceptibilidade das plantas ao patógeno com o aumento da suculência dos tecidos das plantas (Agrios 2005).

Em relação aos isolados, o CMES 1059 se mostrou o mais agressivo, tanto com o uso da suspensão de conídios ou micélios. A agressividade é um componente quantitativo que está relacionada as caraterísticas elementares do ciclo de vida do patógeno, tais como tamanho da lesão, período infeccioso, eficiência de infecção, taxa de esporulação e período latente. Além disso, em isolados mais agressivos, a capacidade de produção de toxinas geralmente é maior (Pariaud et al. 2009).

Por sua vez, Rogério et al., (2017) avaliaram a patogenicidade dos isolados CMES 1080, CMES 1059 e CMES 1034, inoculando o patógeno diretamente na semente, e como resultado o isolado CMES 1059 apresentou a maior agressividade, seguido pelo CMES 1080 e CMS 1034, o que corrobora com os resultados deste trabalho.

O período de incubação e a umidade são componentes importantes para muitos agentes patogênicos foliares, incluindo *Colletotrichum* spp. (Hong and Hwang 1998). Os tempos de molhamento apresentaram diferenças significativas ($P < 0.0001$) na severidade da doença em resposta a todos os tratamentos, com a maior média de notas nas plantas inoculadas com a suspensão micelial e incubadas a 48 ou 72 horas. Por sua vez, o tipo de inóculo micelial mostrou-se mais agressivo em praticamente todos os tratamentos, destacando-se no tempo de molhamento de 72 horas.

Em testes realizados por Yang and Hartman (2015), a utilização da suspensão micelial foi mais eficiente no desenvolvimento de sintomas comparado com suspensão de esporos. Além disso, os melhores tempos de molhamento foram 48 e 72 horas após a inoculação, com maior severidade quando submetido à 72 horas de molhamento e com umidade relativa acima de 90%.

5.2.2. Reação de cultivares de soja à *C. truncatum*

Na natureza as plantas estão em constante defesa contra patógenos através de seus mecanismos estruturais e bioquímicos. A resistência nas plantas pode ser dividida em resistência de hospedeiro ou resistência de não-hospedeiro (Heath 2000). As alterações bioquímicas que ocorrem durante a infecção são similares nas plantas em ambos tipos de resistência (Somssich and Hahlbrock 1998).

Uma alternativa para a proteção de plantas são os indutores de resistência, de origem biótica ou abiótica, que podem induzir resistência local ou sistêmica em plantas suscetíveis, as quais tornam-se resistentes para infecções subsequentes (Thakur and Sohal 2013). No teste de reação de cultivares, foi determinada a cultivar DS5916IPRO como sendo a mais suscetível. Os genótipos que apresentaram menores notas não apresentaram reação imune ao patógeno, nestes casos, a reação foi quantitativa.

O peso das plantas corroborou com os resultados encontrados na reação dos cultivares, onde, os cultivares mais suscetíveis apresentaram menor massa fresca. A figura 7 apresenta a média da massa fresca dos cultivares inoculados ou não inoculados (testemunha).

Quando observamos o cultivar SYN 1059 IPRO, pode-se afirmar que a planta utilizou energia para ativar seus mecanismos de defesa contra o patógeno, a qual a mesma apresentou sucesso na interação, mostrando- se resistente. A diferença entre o peso do cultivar inoculado e não inoculado seria o gasto de energia que a planta utilizou, o que indiretamente interferiu em sua massa. Já os cultivares suscetíveis a planta não conseguiu se defender com sucesso, nesse caso o patógeno conseguiu infectar a planta e coloniza- la, destruindo os tecidos da planta e assim, deteriorando a massa fresca. O hemibiotrofismo característico de muitas espécies de *Colletotrichum* combina uma fase biotrófica curta inicial, seguida por um desenvolvimento necrotrófico altamente destrutivo, caracterizado por áreas extensas de tecido hospedeiro morto (Münch et al. 2008). Portanto, isso explica o fato das plantas mais suscetíveis apresentarem menores tamanhos e pesos.

5.2.3. Efeito dos indutores de resistência no controle de *C. truncatum*

Após a determinação do cultivar suscetível, foi realizado o teste com indutores de resistência com o intuito de ativar os mecanismos de defesas da planta tornando-a resistente a infecções subsequentes. Os resultados mostraram que as plantas tratadas com ASM, o fungicida azoxistrobina + ciproconazole e a taxtomina parcialmente purificada, apresentaram menores graus de severidades comparados com a testemunha. Assim, surge a hipótese dos possíveis indutores ASM e taxtomina atuarem como ativadores de mecanismos de defesa da cultivar utilizada.

Alguns trabalhos têm mostrado efeito positivo da TPP no controle de doenças de plantas. De acordo com Brand (2016), a TPP em plântulas de citros nas concentrações de 50 e 100 µg apresentou um potencial indutor na proteção contra podridão radicular em citros causada por Phytophthora nicotianae. Ainda, Pinto (2014) mostrou que a TPP controla em 100% a incidência do Cucumber mosaic vírus - CMV em plantas de abobrinha. A taxtomina vem sendo estudado como um possível indutor de resistência, já que nas plantas, a sinalização de cálcio tem sido relatada em resposta a moléculas patogênicas, levando a um aumento transitório do nível de Ca^{2+} citosólico, o que é crucial para a indução de uma explosão oxidativa e indução de defesas das plantas (Kurusu et al. 2005).

O ASM é definido como um indutor da resistência sistêmica adquirida – SAR, que aumenta a resistência das plantas à doenças ativando o sistema de defesa das plantas, com função semelhante as do ácido salicílico (Kessmann et al. 1994; Lawton et al. 1996). O ASM

mostrou-se eficaz no controle de doenças que afetam a soja, como murcha de Fusarium, podridão da raiz de Rhizoctonia, podridão do caule de Sclerotinia e podridão parda (Dann et al. 1998; Nafie and Mazen 2008; Faessel et al. 2008; Abdel-Monaim et al. 2011; Han et al. 2013; Sugano et al. 2013). Plantas tratadas com ASM têm aumentado as atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e perosidases (Baysal et al. 2003; Deepak et al. 2006).

O meio aveia e as células autoclavadas de *Streptomyces scabies* reduziram o desenvolvimento dos sintomas em plantas de soja. As plantas de aveia possuem galacturonases o qual podem ser reconhecidos por receptores de outras plantas. Alterações das pectinas de parede, seja em seu conteúdo total, seu grau de acetilação ou metilação ativam respostas de defesas específicas, como aquelas reguladas por JA ou AS, e assim desencadeiam respostas de PTI, provavelmente mediadas por padrões moleculares associados a danos, como oligogalacturonídeos (OGs). Os OGs são percebidos por *Arabidopsis* através de quinases associadas à parede celular, o qual funciona como um PR-P que provoca respostas imunes às plantas (Reymond et al. 2013). Diante disso, surge a hipótese das plantas reconhecerem os compostos galacturonases presentes no meio de aveia e induzir mecanismos de defesa.

5.2.4. Avaliação da resistência sistêmica adquirida

A resistência sistêmica melhor caracterizada é a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (Buonaurio et al. 2002). A SAR resulta no desenvolvimento de uma via duradoura, de amplo espectro e sistêmica em plantas (Sze-Chung and Nicholson 2008). Em diversos casos, a SAR depende do ácido salicílico (SA) sintetizado endogenamente (Sticher et al. 1997), sendo que o mesmo está correlacionado com a ativação de um conjunto específico de genes (genes SAR), que incluem genes codificadores para proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-PR).

No teste de indução de resistência sistêmica realizado com plantas de soja, foi constatado que os tratamentos utilizados não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 8). A TPP ocasionou menor área de lesão nas folhas, seguido pelo ASM. O ASM é um indutor efetivo na resistência adquirida local e sistêmica e um agente de controle de doenças que ativa mecanismos inerentes de resistência a doenças em plantas (Achuo and Hofte 2001; Achuo et al. 2002). Os resultados corroboram com os testes bioquímicos, os quais não mostraram efeito sistêmico nas plantas dos indutores testados.

5.3. Análises bioquímicas

5.3.1. Atividade da guaiacol-peroxidase

A POX é uma enzima oxido-redutora que está envolvida na interligação de componentes da parede celular, no metabolismo de auxinas, lignificação e suberização de células vegetais durante a reação de defesa contra agentes patogênicos, na síntese de fitoalexinas e no metabolismo de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (Kolattukudy et al. 1992; Almagro et al. 2009). O aumento da atividade das peroxidases ligadas à parede celular é eliciado em plantas infectadas com patógenos (Chen et al. 2000; Jung et al. 2004). Neste estudo, os níveis de POX foram mais elevados em folhas de sojas tratadas com ASM 6 dias após a aplicação do indutor. A atividade foi mais evidente nos trifólios que receberam o indutor local do que os trifólios avaliados pelo efeito sistêmico. Após a inoculação de *C. truncatum*, a atividade da POX apresentou semelhanças nos tratamentos ASM com e sem patógeno. Após 48 h da inoculação do patógeno, os níveis de POX dos tratamentos ASM com e sem patógeno aumentaram significativamente, em relação aos outros tratamentos.

O perfil das plantas tratadas somente com água (testemunhas) foi um aumento natural na atividade da peroxidase. Algumas enzimas oxidativas aumentam suas atividades durante a senescência foliar, suportando a ideia de que senescência e níveis mais altos de enzimas oxidativas são fenômenos intimamente associados (Parish 1968). Entretanto, plantas testemunhas, após serem inoculadas com *C. truncatum* retardaram a expressão da atividade da POX. Diversas hipóteses podem estar relacionadas com este evento, sendo que muitos patógeno podem alterar a atividade dessas enzimas nas plantas, através de inibidores proteicos e efetores.

Nos últimos anos, ficou evidente que as proteínas efetoras são cruciais para a virulência de patógenos microbianos (Jones and Dangl 2006; Hogenhout et al. 2009). Um aspecto característico dos efetores microbianos é a supressão das respostas imunes do hospedeiro (Xiang et al. 2008; Göhre and Robatzek 2008; de Jonge and Thomma 2009; Stergiopoulos and de Wit 2009). Hemetsberger et al., (2012) estudaram uma proteína efetora essencial para a patogenicidade de *Ustilado maydis*, a Pep 1 (*Protein essential during penetration*$^{-1}$). Esta proteína apresenta um papel crucial na supressão da explosão oxidativa das plantas através da inibição direta de peroxidases apoplásticas. Assim, descobriu-se um mecanismo de virulência elementar de *U. maydis*. Esse fenômeno pode ocorrer quando se

inocula *C. truncatum* em plantas de soja, ou ainda uma interferência no reconhecimento do patógeno através de efetores. Em plantas de tomate, a proteína de resistência Pto interage diretamente com o efetor de *Pseudomonas syringae AvrPto* dentro da célula da planta para ativar o ETI (*effector-triggered immunity*). O *AvrPto* é capaz de interagir com alguns genes, e esta interação está correlacionada com a sua capacidade de bloquear a função de PTI (PAMP-*triggered immunity*) e virulência em plantas de tomate (Xiang et al. 2008).

A TPP não apresentou diferença significativa quanto à atividade da peroxidase em relação ao controle (Tabela 7). Entretanto, nas plantas nos quais foram avaliados o efeito local, a TPP obteve um bom controle no desenvolvimento da doença. As plantas de soja possuem diversos mecanismos de defesa, os quais podem ser estimulados por agentes abióticos como a TPP. Os fenilpropanóides, por exemplo, estão envolvidos em interações planta-patógeno e podem ser extremamente tóxicos a patógenos quando formandos constitutivamente (fitoantecipinas) ou induzidos (fitoalexinas) (Lozovaya et al.; Bhattacharyya and Ward 1985; Ebel and Grisebach 1988; Graham 1991; Huang and Barker 1991). As espécies reativas de oxigênio, por sua vez, estão envolvidas no sistema de defesa da planta, sendo uma das primeiras respostas celulares após o reconhecimento bem-sucedido do patógenos (Doke 1983). E assim, muitas outras enzimas podem exibir atividade, após serem induzidas através de um agente indutor, formando um arsenal enzimático contra o patógeno (King et al. 2011).

A figura 12.C mostra que os níveis de POX dos dois trifólios são diferentes, devido à idade dos trifólios. Alguns relatos mostram que o aumento da atividade da POX está relacionada a idade fisiológica das folhas (Lowry et al. 1951; Parish 1968; Ford and Simon 1972). Neste contexto, os trifólios que receberam os tratamentos indutores eram mais velhos do que os que não receberam, sendo que estes apresentaram menores níveis de POX. Porém, quando ativada sistemicamente, os níveis se igualaram aos da testemunha do primeiro trifólio, sem efeito contra o *C. truncatum*.

As alterações na atividade das POX é um indício de metabolismo alterado. Nesse sentido, é esperado alterações na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. As POX possuem diversas funções, sendo uma delas a formação de lignina pela polimerização de fenóis.

5.3.2. Fenóis

Os compostos fenólicos desempenham papel importante no desenvolvimento das plantas, particularmente nos mecanismos de defesas (Kulbat 2016). Os fenóis podem ser encontrados nas plantas em sua forma livre, ligados à parede celular ou conjugado. Os fenóis ligados podem ser extraídos por reação de esterificação com NaOH, e os livres através do metanol (Kofalvi and Nassuth 1995). Muitos compostos fenólicos são tóxicos para os microrganismos (Paxton et al. 1994) e a produção desses compostos por tecidos do

hospedeiro tem sido associado com uma resposta de defesa (Lazarovits and Higgins 1976; Mould et al. 1991). A produção e acúmulo pós-infecção desses compostos são mais intensos em cultivares resistentes do que suscetíveis. Ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido p- cumárico são exemplos desses compostos fenólicos. Trabalhos realizados por Chavan and Suryvanshi (2014), mostram que a infecção de *C. truncatum* acumulou fenóis em folhas de cultivares suscetíveis e resistentes. No entanto, houve maior acúmulo de fenóis em folhas do cultivar resistente, enquanto que houve um acúmulo comparativamente menor de fenóis nas folhas doentes da variedade suscetível. Isso indica que a presença da quantidade máxima de fenóis na planta no momento da infecção pode conferir resistência à infecção. Como resultado, a progressão da infecção é restrita muito antes de o patógeno ganhar o controle total da planta (Bittel and Robatzek 2007; Nicaise et al. 2009).

Plantas não inoculadas apresentaram níveis mais baixos de fenóis, entretanto, plantas que receberam o indutor TPP destacam-se por apresentarem maior acúmulo de fenóis ligados à parede celular. Tegg et al. (2005) propuseram um possível modelo para explicar os primeiros efeitos da taxtomina em células de plantas, onde a toxina desencadeia via um influxo de Ca^{2+}, ocasionando um aumento das concentrações de Ca^{2+} no citoplasma. As concentrações elevadas de Ca^{2+} no citoplasma ativariam a bomba de H^{+} da membrana plasmática, causando acidificação da parede celular e o deslocamento de ions Ca^{2+} ligados por H+. Como resultado, podem ocorrer a ativação de enzimas na parede celular, devido a acidificação da mesma (Cosgrove 1999).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos o tipo de suspensão micelial e 72 horas de molhamento foliar são importantes fatores para aumentar a severidade da antracnose na soja. Também, foi possível observar que os isolados utilizados apresentam diferentes graus de agressividade diante dos fatores testados (tipo de inóculo x horas de molhamento foliar).

Através da padronização do teste de inoculação, foi possível determinar as cultivares mais resistentes e suscetíveis entre as cultivares testadas. Nesse caso, o método de inoculação tornou-se eficaz para determinar a reação das cultivares de soja à *C. truncatum*.

A taxtomina parcialmente purificada (100µg equivalente/mL de taxtomina) inibiu a germinação dos conídios do fungo *C. truncatum* e foi termoestável, todavia não inibiu o crescimento micelial.

A taxtomina parcialmente purificada e o acibenzolar – S - metil (ASM) reduziram a severidade da doença quando aplicadas localmente em plantas de soja, no entanto, quando testadas sistemicamente, não apresentaram efeito como indutores de resistência.

REFERÊNCIAS

Abdel-Monaim MF, Ismail ME, Morsy KM (2011) Induction of systemic resistance of benzothiadiazole and humic acid in soybean plants against Fusarium wilt disease. Mycobiology 39:290–298. doi: 10.5941/MYCO.2011.39.4.290

Achuo AE, Audenaert K, Meziane H, Höfte M (2002) The SA-dependent defense pathway is active against different pathogens in tomato and tobacco. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet 67:149–57

Achuo AE, Hofte M (2001) Potential of induced resistance to control Oidium lycopersici on tomato and tobacco. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet 66:195–203

Agrios G (2005) Plant pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 26-27, 398-401.

Agrofit (2018) AGROFIT — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit. Accessed 24 Nov 2018

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. J Plant Biol 51:167–173. doi: 10.1007/BF03030694

Ahmad S, Gordon-Weeks R, Pickett J, Ton J (2010) Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. Mol Plant Pathol 11:no-no. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00645.x

Almagro L, Gómez Ros L V, Belchi-Navarro S, et al (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. J Exp Bot 60:377–90. doi: 10.1093/jxb/ern277

Almeida AMR (2016) Doenças da soja. In: Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas, 5th edn. Piracicaba, pp 642–664.

Amorim L, Rezende JAM, A Camargo LEABF (2016) Manual de Fitopatologia Volume 2. Doenças das plantas cultivadas, Editora Ag. São Paulo

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Araújo FF, Henning AA, Hungria M (2005) Phytohormones and antibiotics produced by Bacillus subtilis and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root Development. World J Microbiol Biotechnol 21:1639–1645. doi: 10.1007/s11274-005-3621-x

Armstrong-Cho CL, Banniza S (2006) Glomerella truncata sp. nov., the teleomorph of *C. truncatum*. Mycol Res 110:951–956. doi: 10.1016/j.mycres.2006.06.002 Bania I, Mahanta R (2012) Evaluation of peroxidases from various plant sources. Int J Sci Res 2: 14-54

Barbieri MCG, Ciampi-Guillardi M, Moraes SRG, et al (2017) First report of Colletotrichum cliviae causing anthracnose on soybean in Brazil. Plant Dis 101:1677–1677. doi: 10.1094/PDIS-07-16-0963-PDN

Barbosa MR, Silva MM de A, Willadino L, et al (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. Ciência Rural 44:453–460. doi: 10.1590/S0103-84782014000300011

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, et al (2002) The strobilurin fungicides. Pest Manag Sci 58:649–662. doi: 10.1002/ps.520

Baysal O, Soylu EM, Soylu S (2003) Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by Clavibacter michiganensis sp. michiganensis. Plant Pathol 52:747–753. doi: 10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x

Bertoldo E, Mazaro MS (2018) β-1,3 Glucanases: Uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. – Sci Agrar Parana 17:1–13

Bhattacharyya MK, Ward EWB (1985) Differential sensitivity of Phytophthora megasperma f.sp. glycinea isolates to glyceollin isomers. Physiol Plant Pathol 27:299–310. doi: 10.1016/0048-4059(85)90043-8

Bittel P, Robatzek S (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. Curr Opin Plant Biol 10:335–341. doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.021

Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F.; Romeiro RS (2005) Indução da resistência: Noções básicas e perspectivas. In: Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. FEALQ. Piracicaba, pp 11–28

Bostock RM (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. Annu Rev Phytopathol 43:545–580. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095505

Brammer SP, Irene M, Morais B, et al (2004) Mapeamento de genes deresistência à ferrugem da folha em cultivares de trigo (Triticum aestivum L. Thell). Ciência agricola. 23: 122-134.

Brand SC (2016) Taxtomina A e Piriformospora indica no controle de Phytophthora nicotianae em citros e Phytophthora plurivora em faia Fagus sylvatica. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. Pos-graduação em fitopatologia - Esalq/USP.

Buonaurio R, Scarponi L, Ferrara M, et al (2002) Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease European Journal of Plant Pathology 108: 41-49

Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, New York

Chakraborty U, Dutta S, Chakraborty B (2001) Indian journal of plant physiology : official publication of the Indian Society for Plant Physiology. Indian Society for Plant Physiology

Chattopadhyay C, Kolte SJ, Waliyar F (2015) Diseases of edible oilseed crops. CRC Press.134-168

Chavan SS, Suryvanshi AP (2014) Studies on biochemical changes in soybean infected with *C. truncatum* (Schw.). The Bioscan Journal 9:1341–1344

Chen C, Bélanger RR, Benhamou N, Paulitz TC (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and Pythium aphanidermatum. Physiol Mol Plant Pathol 56:13–23. doi: 10.1006/PMPP.1999.0243

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento (2017) Acompanhamento da safra brasileira - grãos. In: Safra 2016/17 - Décimo Levant. Brasília

Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50:391–417. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.391

Costa IFD, Balardin RS, Medeiros LAM, et al (2009) Reação de germoplasma comercial de soja a *C. truncatum*. Tropical Plant Pathology 34: 47–50

Cruz MFA, Rodrigues FA, Diniz APC, et al (2014) Soybean resistance to Phakopsora pachyrhizi as affected by acibenzolar-s-methyl, jasmonic acid and silicon. J Phytopathol 162:133–136. doi: 10.1111/jph.12170

Cui H, Xiang T, Zhou J-M (2009) Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. Cell Microbiol 11:1453–1461. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01359.x

Dann E, Diers B, Byrum J, Hammerschmidt R (1998) Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by Sclerotinia sclerotiorum in field and greenhouse studies. Eur J Plant Pathol 104:271–278. doi: 10.1023/A:1008683316629

De Jonge R, Thomma BPHJ (2009) Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? Trends Microbiol 17:151–157. doi: 10.1016/j.tim.2009.01.002

De Souza AA, Takita MA, Do Amaral AM, et al (2008) Citrus responses to Xylella fastidiosa infection, the causal agent of citrus variegated chlorosis. Tree and Forestry Science and Biotechnology 31: 73-80

Deacon JW, Donaldson SP (1993) Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to Pythium and Phytophthora. Mycol Res 97:1153–1171. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81278-1

Deepak SA, Ishii H, Park P (2006) Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. Physiol Mol Plant Pathol 69:52–61. doi: 10.1016/J.PMPP.2006.12.006

Deverall BJ, Dann EK (1995) Induced Resistance in Legumes. Springer, Dordrecht, 1–30 Department of Crop Sciences The University of Sydney.

Dias MD (2014) Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja. Tese (Doutorado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília

Doke N (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of Phytophthora infestans and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. Physiol Plant Pathol 23:359–367. doi: 10.1016/0048-4059(83)90020-6

Donzelli BGG, Churchill ACL (2007) A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of Mycosphaerella fijiensis. Phytopathology 97:916–929. doi: 10.1094/PHYTO-97-8-0916

Duval I, Brochu V, Simard M, et al (2005) Thaxtomin A induces programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension-cultured cells. Planta 222:820–831. doi: 10.1007/s00425-005-0016-z

Ebel J, Grisebach H (1988) Defense strategies of soybean against the fungus Phytophthora megasperma f.sp. glycinea: a molecular analysis. Trends Biochem Sci 13:23–27. doi: 10.1016/0968-0004(88)90014-X

El-Ghaouth A (1997) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. J Ind Microbiol Biotechnol 19:160–162. doi: 10.1038/sj.jim.2900428

Elad Y, Windham M (1984) The nature and practice of biological control of plant pathogens.

R. James Cook , Kenneth F. Baker. Q Rev Biol 59:499–500. doi: 10.1086/414138

Eliza G, Barros G, Scientiae M (2008) Avaliação da resistência de genótipos de soja a Colletotrchum truncatum e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD. Dissertação (mestrado) – Universidade de Rio Verde – Goiás Faessel L, Nassr N, Lebeau T, Walter B (2008) Effects of the plant defence inducer, acibenzolar-s-methyl, on hypocotyl rot of soybean caused by Rhizoctonia solani AG-4. J Phytopathol 156:236–242. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01367.x

Farag RS, Mohsen SM, Khalil FA, Basyony AE (1985) Effect of fungal infection on the chemical composition of wheat, soybean and sesame seeds. Grasas Aceites 36:357

Ford TW, Simon EW (1972) Peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in cotyledons of Cucumis sativus (L.). J. Exp. Bot. 23:423–431

Forseille L (2007) Molecular and pathological differentiation of *C. truncatum* from scentless chamomile and legume crops. Thesis Department of Biology University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan Canada

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, et al (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol Plant-Microbe Interact 19:711–724. doi: 10.1094/MPMI-19-0711

Garcia EO (2008) Resistência de cultivares de batata (Solanum tuberosum) à sarna comum (Streptomyces spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (Sorghum bicolor): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. Pos-graduação em fitopatologia ESALQ/USP 1-92

Gazola KS, Melz LJ, Torres AL, Anunciato KM (2012) Evolução do nível de concentração e produção da soja no Brasil e Mato Grosso do ano 2000 a 2010. Rev UNEMAT Contab 1:. doi: 10.30681/RUC.V1I2.393

Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it’s all the world to induced disease resistance. Eur J Plant Pathol 121:233–242. doi: 10.1007/s10658-007-9251-4

Göhre V, Robatzek S (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. Annu Rev Phytopathol 46:189–215. doi: 10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050

Goodfellow M, Williams ST (1988) Actinomycetes in biotechnology. Academic Press 1-501 Goodman RD, Kiraly A, Wood K. (1986) The biochemistry and physiology of plant disease: Robert N.;Kiraly, Zoltan;Wood, K.R. Goodman Amazon.com: Books. Columbia Univ Missouri Press 433 p.

Goulart ACP (2009) Detecção e controle químico de Colletotrichum em sementes de soja e algodão. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/574033/deteccao-e-controle-quimico-de-colletotrichum-em-sementes-de-soja-e-algodao. Accessed 21 Nov 2018

Goyer C, Vachon J, Beaulieu C (1998) Pathogenicity of Streptomyces scabies mutants altered in thaxtomin A production. Phytopathology 88:442–445. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.5.442

Graham TL (1991) A rapid, high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites. Plant Physiol 95: 584–93

Grant M, Lamb C (2006) Systemic immunity. Curr Opin Plant Biol 9: 414–420. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.013

Hajimorad MR, Hill JH (2001) Rsv1 -mediated resistance against Soybean mosaic virus -N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. Mol Plant-Microbe Interact 14:587–598. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.5.587

Hammerschmidt R, Métraux J-P, Van Loon LC (2001) Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, European Journal of Plant Pathology107:1–6

Han Q, Feng H, Zhao H, et al (2013) Effect of a benzothiadiazole on inducing resistance of soybean to Phytophthora sojae. Protoplasma 250:471–481. doi: 10.1007/s00709-012-0430-6

Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, et al (2008) Compendium of soybean diseases and pests. American Phytopathological Society; Edição: 5

Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, et al (2000) The txtAB genes of the plant pathogen Streptomyces acidiscabies encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. Mol Microbiol 38:794–804

Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. Plant Mol Biol 44:321–34

Heil M, Bostock RM (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Ann Bot 89:503–12. doi: 10.1093/AOB/MCF076

Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, et al (2012) The Ustilago maydis effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. PLoS Pathog 8:e1002684. doi: 10.1371/journal.ppat.1002684

Hill J, Lazarovits G (2005) A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. Can J Plant Pathol 27:46–52. doi: 10.1080/07060660509507192

Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. Mol Plant-Microbe Interact 22:115– 122. doi: 10.1094/MPMI-22-2-0115

Hong JK, Hwang BK (1998) Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by Colletotrichum coccodes. Plant Dis 82:1079–1083. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.10.1079

Huang JS, Barker KR (1991) Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions : spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. Plant Physiol 96:1302–7

Hyde K (2009) Colletotrichum-names in current use. Fungal Diversity 39: 147–182

IBGE (2018) Agricultural production.

Irvingan HR, Bruce D (1984) The effect of calcium on zoospore differentiation in Phytophthora cinnamomi Journal of General Microbiology, 130: 1569-1576

Jijakli M, Grevesse C, Lepoivre P (2001) Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases: challenges and difficulties. Bull 24:317–318

Jones DH (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry 23:1349–1359. doi: 10.1016/S0031-9422(00)80465-3

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323–329. doi: 10.1038/nature05286

Jourdan S, Francis IM, Deflandre B, et al (2017) Tracking the subtle mutations driving host sensing by the plant pathogen Streptomyces scabies. American Society for Microbiology mSphere 2:. doi: 10.1128/mSphere.00367-16

Jung W-J, Jin Y-L, Kim Y-C, et al (2004) Inoculation of Paenibacillus illinoisensis alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by Phytophthora capsici. Biol Control 30:645–652. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2004.03.006

Kessmann H, Staub T, Hofmann C, et al (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annu Rev Phytopathol 32:439–459. doi: 10.1146/annurev.py.32.090194.002255

Khare MN, Chacko S (1983) Factors affecting seed infection and transmission of Colletotrichum dematium f.sp. truncata in soybean. Seed Sci Technol 120-154

Kim YK, Li D, Kolattukudy PE (1998) Induction of Ca2+-calmodulin signaling by hard-surface contact primes Colletotrichum gloeosporioides conidia to germinate and form appressoria. J Bacteriol 180:5144–50

King BC, Waxman KD, Nenni N V, et al (2011) Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi Biotechnol Biofuels 4: 4

King RR, Lawrence CH, Clark MC, Calhoun LA (1989) Isolation and characterization of phytotoxins associated with Streptomyces scabies Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 0:849. doi: 10.1039/c39890000849

Klingelfuss LH, Yorinori JT (2001) Infecção latente de *C. truncatum* e Cercospora kikuchii em soja. Fitopatol Bras 26:158–164. doi: 10.1590/S0100- 41582001000200007

Kofalvi SA, Nassuth A (1995) Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. Physiol Mol Plant Pathol 47:365–377. doi: 10.1006/PMPP.1995.1065

Kolattukudy PE, Mohan R, Bajar MA, Sherf BA (1992) Plant peroxidase gene expression and function. Biochem Soc Trans 20:333–7

Kuhn OJ (2007) Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris) por acibenzolar- S-metil e Bacillus cereus: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção; Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo Pos-graduação em fitopatologia ESALQ/USP

Kulbat K (2016) The role of phenolic compounds in plant resistance Biotechnology and Food Sciences 80: 97-108

Kuo KC, Lee CY, Chiang SS, Zheng YS (1999) Plant protection bulletin -Taipei Plant Pathology 256 p.

Kurusu T, Yagala T, Miyao A, et al (2005) Identification of a putative voltage-gated Ca2+ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. Plant J 42:798–809. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02415.x

Lawrence CH (1990) Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. Phytopathology 80:606. doi: 10.1094/Phyto-80-606

Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, et al (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J 10:71–82

Lazarovits G, Higgins VJ (1976) Histological comparison of Cladosporium fulvum race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. Can J Bot 54:224–234. doi: 10.1139/b76-022

Lazzarotto JJ, Hirakuri MH (2010) Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro / Joelsio José Lazzarotto, Marcelo Hiroshi Hirakuri. – Londrina: Embrapa Soja

Leclerc C, Zebré A, Enault J, et al (2017) Evaluation of Streptomyces common scab toxins diffusion in potato tubers and through the intestinal barrier. Int J Curr Microbiol Appl Sci 6:1662–1676. doi: 10.20546/ijcmas.2017.605.181

Leiner R (1996) Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of Streptomyces scabies on seedlings. Phytopathology 86:709. doi: 10.1094/Phyto-86-709

Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR (1997) Plant pathogenicity in the genus Streptomyces. Plant Dis 81:836–846. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.8.836

Loria R, Kers J, Joshi M (2006) Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces. Annu Rev Phytopathol 44:469–487. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–75

Lozovaya V V, Lygin A V, Li S, et al Biochemical response of soybean roots to Fusarium solani f. sp. glycines infection Crop Science 44: 820-826

Lusso MFG, Pascholati SF (1999) Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. Summa Phytopathol 25:244–249

Manandhar JB (1985) Penetration and infection of soybean leaf tissues by *C. truncatum* and Glomerella glycines. Phytopathology 75:704. doi: 10.1094/Phyto-75-704

MAPA (2016) Nova estimativa prevê supersafra de 234,3 milhões de toneladas de grãos. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense priming: an adaptive part of induced resistance. Annu Rev Plant Biol 68:485–512. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132

Mauch-Mani B, Métraux J-P (1998) Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. Ann Bot 82:535–540. doi: 10.1006/anbo.1998.0726

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9:490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009

Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal phytotoxins as mediators of virulence. Curr Opin Plant Biol 12:390–398. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.004

Molesworth PP, Gardiner MG, Jones RC, et al (2010) Synthesis and phytotoxicity of structural analogues of thaxtomin natural products. Aust J Chem 63:813–820. doi: 10.1071/CH10006

Mould MJR, Boland GJ, Robb J (1991) Ultrastructure of the Colletotrichum trifolii-Medicago sativa pathosystem. II. Post-penetration events. Physiol Mol Plant Pathol 38:195–210. doi: 10.1016/S0885-5765(05)80124-9

Fundação MT (2016) Doenças – doenças da soja. In: Boletim de pesquisa 2015/2016.

Münch S, Lingner U, Floss DS, et al (2008) The hemibiotrophic lifestyle of Colletotrichum species. J Plant Physiol 165:41–51. doi: 10.1016/J.JPLPH.2007.06.008

Nafie E, Mazen MM (2008) Chemical-induced resistance against brown stem rot in soybean: the effect of benzothiadiazole Journal of Applied Sciences Research, 4: 2046-2064

Newman M-A, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M (2007) Invited review: Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. J Endotoxin Res 13:69–84. doi: 10.1177/0968051907079399

Nicaise V, Roux M, Zipfel C (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. Plant Physiol 150:1638–47. doi: 10.1104/pp.109.139709

OECD O Economic co-operation and development- (2017) Oilseeds and oilseed products Food and Agriculture Organization of the United Nations

Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol 9:1084–1090. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x

Padilla-Reynaud R, Simao-Beaunoir A-M, Lerat S, et al (2015) Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in Streptomyces scabiei, the causal agent of potato common scab. Microbes Environ 30:245–53. doi: 10.1264/jsme2.ME15034

Pal KK, McSpadden Gardener B (2006) Biological control of plant pathogens. Plant Heal Instr. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02

Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, et al (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathol 58:409–424. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x

Parish RW (1968) Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. Plant disease 82:14–21. doi: 10.1007/BF00384694

Pascholati S. (2018) Fisiologia do Parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. pp 424–450

Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P (2008) Interação planta - patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular, FEALQ. Piracicaba

Pascholati SF, Garcia E.O. (2009). Fitotoxina taxtomina e a ativação de mecanismos de defesa em plantas. Ed Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P In: Anais do XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, Rio de Janeiro. Tropical Plant Pathology (Impresso). Lavras: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 34. p. XXXI-XXXII.

Paxton JD, Groth J, Graham T (1994) Constraints on pathogens attacking plants. CRC Crit Rev Plant Sci 13:77–95. doi: 10.1080/07352689409701909

Pesqueira A da S, Bacchi LMA, Gavassoni WL (2016) Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul Revista Ciência agronômica. 47: 202-217 Pfaller MA, Richter SS, Funke G, et al (eds) (2015) Manual of clinical microbiology, 11th Edition. American Society of Microbiology

Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Van Wees SCM, et al (2001) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. Eur J Plant Pathol 107:51– 61. doi: 10.1023/A:1008747926678

Pinto LR (2014) Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (Rhizopus stolonifer) em uva. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo Pos-graduação em fitopatologia ESALQ/USP

R Core Team (2017) R: a language and environment for statistical computing. https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical- computing. Accessed 29 Nov 2018

Reimmann C, Ringli C, Dudler R (1992) Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. Plant Physiol 100:1611–2

Reymond P, GruÈnberger S, Paul K, MuÈller M, Farmer EE. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 92: 4145±4149.

Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant Cell Online 16:3426– 3436. doi: 10.1105/tpc.104.025288

Rodrigues MBC, Andreote FD, Spósito MB, et al (2007) Resistência a benzimidazóis por Guignardia citricarpa. Pesqui Agropecuária Bras 42:323–327. doi: 10.1590/S0100-204X2007000300004

Rogério F, Ciampi-Guillardi M, Barbieri MCG, et al (2017) Phylogeny and variability of *C. truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. J Appl Microbiol 122:402–415. doi: 10.1111/jam.13346

Sant'anna JR, Franco CCS, Kaneshima EN, Castro-Prado MAA (2010) Genetic relatedness of Brazilian Colletotrichum. Biol Res 43:51–62

Scheible W-R, Fry B, Kochevenko A, et al (2003) An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from Streptomyces species. Plant Cell 15:1781–94

Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, et al (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. Plant Cell Environ 29:909–18

Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Pascholati SF. (2008). Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. Ed Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P. In: Interação planta-patógeno. Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. 3ºEd. 13: 627 p

Shaw BD, Hoch HC (2000) Ca2+ regulation of Phyllosticta ampelicida pycnidiospore germination and appressorium formation. Fungal Genet Biol 31:43–53.

Shovan LR, Bhuiyan MKA, Sultana N, et al (2008) Prevalence of fungi associated with soybean seeds andpPathogenicity tests of the major seed-borne pathogens Int. J. Sustain. Crop Prod. 3(4):24-33

Sinclair JB (James B, Backman PA (1989) Compendium of soybean diseases. APS Press 5: 256-234

Somssich IE, Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plants: a paradigm of biological complexity. Trends Plant Sci 3:86–90. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01199-6

Souza Dias JAC, Imauti MT (2016) Doenças da batateira. In: Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Editora Ceres 119–142

Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo M V., et al (2011) A defesa vegetal contra fitopatógenos. Sci Agrar Parana 10:18. doi: 10.1818/SAP.V10I1.5268

Stergiopoulos I, de Wit PJGM (2009) Fungal effector proteins. Annu Rev Phytopathol 47:233–263. doi: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637

Stevens C, Wilson C, Lu J, et al Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. Crop Protection 14 (2): 122-134

Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux and J (1997) Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol 35:235–270. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.235

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, et al (1993) Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75:687–706

Subedi S, Gharti DB, Neupane S, Ghimire T (2016) Management of anthracnose in soybean using fungicide. J Nepal Agric Res Counc 1:29. doi: 10.3126/jnarc.v1i0.15721

Sugano S, Sugimoto T, Takatsuji H, Jiang C-J (2013) Induction of resistance to Phytophthora sojae in soyabean (Glycine max) by salicylic acid and ethylene. Plant Pathol 62:1048–1056. doi: 10.1111/ppa.12011

Sze-Chung CL, Nicholson RL (2008) Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. Ed Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P. In: Interação planta-patógeno. Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba, pp 285–300

Tegg RS, Melian L, Wilson CR, Shabala S (2005) Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin a: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. Plant Cell Physiol 46:638–648. doi: 10.1093/pcp/pci069

Thakur M, Sohal BS (2013) Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. ISRN Biochem 2013:1–10. doi: 10.1155/2013/762412

Tomiyama K (1963) Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. Annu Rev Phytopathol 1:295–324. doi: 10.1146/annurev.py.01.090163.001455

Tringali C, Tringali C (1994) Bioactive compounds from natural sources : isolation, characterization and biological properties. Ed Corrado T Università di Catania, Italy

Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol Biol Report 12:245–264. doi: 10.1007/BF02668748

Walters DR, Paterson L, Walsh DJ, Havis ND (2008) Priming for plant defense in barley provides benefits only under high disease pressure. Physiol Mol Plant Pathol 73:95– 100. doi: 10.1016/J.PMPP.2009.03.002

Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. J Exp Bot 64:1263–1280. doi: 10.1093/jxb/ert026

Warwar V, Dickman MB (1996) Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in Colletotrichum trifolii. Appl Environ Microbiol 62:74–9

Wisniewski M, Biles C, Droby S, et al (1991) Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, Pichia guilliermondii. I. Characterization of attachment to Botrytis cinerea. Physiol Mol Plant Pathol 39:245–258. doi: 10.1016/0885-5765(91)90033-E

Wong CFJ, Nik WZ, Lim TK (1983) Studies of Colletotrichum dematium f. sp. truncatum on soybean Departmentof Plant Protection, Universiti Pertanian Malaysia, Serdang, Selangor

Wrather JA (1990) Apparent systemic effect of *C. truncatum* and C. lagenarium on the interaction between soybean and *C. truncatum*. Phytopathology 80:472. doi: 10.1094/Phyto-80-472

Xiang T, Zong N, Zou Y, et al (2008) Pseudomonas syringae effector avrpto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. Curr Biol 18:74–80. doi: 10.1016/j.cub.2007.12.020

Yang H-C, Haudenshield JS, Hartman GL (2014) Colletotrichum incanum sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. Mycologia 106:32–42. doi: 10.3852/13-013

Yang H-C, Stewart JM, Hartman GL (2013) First report of Colletotrichum chlorophyti infecting soybean seed in arkansas, United States. Plant Dis 97:1510–1510. doi: 10.1094/PDIS-04-13-0441-PDN

Yang H, Hartman GL (2015) Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *C. truncatum*. Plant Dis 99:143–148. doi: 10.1094/PDIS-03-14-0228-RE Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Curr Opin Immunol 20:10–16. doi: 10.1016/j.coi.2007.11.003