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

Etiologia e variabilidade do agente causal da antracnose da soja no Brasil

Flávia Rogério

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

**Piracicaba
2015**

Flávia Rogério
Engenheira Agrônoma

Etiologia e variabilidade do agente causal da antracnose da soja no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Rogério, Flávia

Etiologia e variabilidade do agente causal da antracnose da soja no Brasil / Flávia Rogério. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
67 p. : il.

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

1. Identificação 2. Filogenia 3. Diversidade genética 4. *C. truncatum* I. Título

CDD 633.34
R722e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha mãe Maria, meu pai João, minha irmã Ana Paula,
bem como meus sobrinhos, meu cunhado
por me incentivarem
a lutar pelos meus sonhos e objetivos,
com todo amor,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear com o dom da vida e nela poder buscar os meus sonhos.

À minha Família pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) pela oportunidade e condições oferecidas.

A fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos concedidas.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola pelos ensinamentos e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Micologia: Ananias Cruz, Sergio Perez, Carlos Augusto, Wagner Vicente, Juliana Ramiro, Marina Barbieiri e Maísa Cíampi, pela amizade, ensinamentos, apoio e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos colegas e amigos do departamento: Marina Mengardo, Victor Hugo Moura, Aline Zavaglia, Raphael Severo e Antônio Nogueira, pelo apoio, pelos conselhos, ensinamentos, parceria nos trabalhos de disciplinas, paciência e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos meus amigos que fiz durante a vida, que de uma forma ou outra estavam sempre presentes e que torcem por mim constantemente: Jucileia Irian dos Santos, Livia Fernanda Silva, Aline Moraes, Verena Benício, Raquel Caobeli, Ariane Ricarte, Karine Piovezan entre outro tantos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.2 Matéria e métodos	24
2.2.1 Obtenção, identificação e preservação dos isolados.....	24
2.2.2 Caracterização Molecular	26
2.2.2.1 Extração de DNA total	26
2.2.2.2 Amplificação, Purificação e sequenciamento de fragmentos gênicos.....	27
2.2.2.3 Edição das sequências.	27
2.2.2.4 Análise Filogenéticas.....	28
2.2.2.5 Caracterização haplotípica e análise da diversidade genética	28
2.2.3 Caracterização cultural	29
2.2.4. Caracterização morfológica.....	30
2.2.5 Caracterização patogênica	32
2.2.5.1 Inoculação por palito de dente colonizado	32
2.2.5.2 Inoculação das sementes pelo método da restrição hídrica	33
2.3 Resultados.....	34
2.3.1 Caracterização molecular	34
2.3.2 Caracterização cultural.....	46
2.3.3 Caracterização morfológica.....	50
2.3.4 Caracterização patogênica.....	53
3 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Etiologia e variabilidade do agente causal da antracnose da soja no Brasil

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja estão as doenças. A antracnose é uma das principais doenças da cultura, sendo causada, segundo a literatura, pelo fungo *Colletotrichum truncatum*. No Brasil não há estudos detalhados sobre a real etiologia da doença. A identificação e a distribuição das espécies do gênero *Colletotrichum* nas diferentes regiões produtoras de soja do Brasil é fundamental para o entendimento da epidemiologia da doença e para o sucesso no desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle. Por meio de abordagem polifásica foram caracterizados 51 isolados de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, utilizando-se análises molecular, cultural, morfológica e patogênica. Foi realizada extração do DNA genômico e reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes GAPDH, HIS3 e da região ITS. Análises filogenéticas foram realizadas para cada gene de forma isolada e concatenada. Construiu-se uma árvore filogenética, por meio de inferência Bayesiana, utilizando os genes concatenados. Analisou-se, também, a diversidade genética intraespecífica dos isolados, por meio da construção de uma rede de haplótipos presentes na coleção. As demais caracterizações foram realizadas com 10 isolados selecionados com base na caracterização molecular. A caracterização cultural foi realizada nos meios BDA e SNA e foram avaliados esporulação, taxa de crescimento micelial e análise da coloração, morfologia e topografia das colônias. A caracterização morfológica também foi realizada nos mesmos meios de cultura, por meio da mensuração de 50 conídios por isolado, além da observação de acérvulos, setas e apressórios. A caracterização patogênica foi realizada utilizando-se a variedade BMX Potência inoculada por meio de palitos de dente colonizados com o fungo e por inoculações de suas sementes pelo método da restrição hídrica seguido de semeadura em solo autoclavado. Em ambos os métodos foram observados incidência e severidade de sintomas. A análise molecular dos isolados de *Colletotrichum* evidenciou ocorrência apenas da espécie *C. truncatum* associada à cultura da soja na coleção de isolados estudada. No entanto a análise intraespecífica mostrou alto grau de variabilidade, com a presença de 27 haplótipos na coleção, muitos deles idênticos geneticamente a isolados de *C. truncatum* de outros locais do mundo. Foi encontrada grande variabilidade cultural, morfológica e patogênica entre os isolados. A caracterização patogênica mostrou, nos dois métodos empregados, alta variação na agressividade dos isolados, sendo que os isolados CMES 1075 e CMES 1080 se destacaram dos demais por causarem as maiores lesões na haste da soja e por afetarem mais o desenvolvimento das sementes inoculadas. Não foi possível correlacionar a variabilidade intraespecífica observada nos isolados com sua respectiva origem geográfica.

Palavras chaves: Identificação; Filogenia; Diversidade genética; *C. truncatum*

ABSTRACT

Etiology and variability of the causal agent of soybean anthracnose in Brazil

Diseases are among the main factors that limit high yields in soybean crops. Anthracnose is a major disease of the culture, caused, according to the literature, by *Colletotrichum truncatum*. In Brazil, there are no detailed studies on the real etiology of the disease. Identification and distribution of *Colletotrichum* species in different soybean producing regions of Brazil is critical to understand the epidemiology and develop effective control of these diseases. The polyphasic approach was used to characterize 51 isolates from different soybean producing regions in Brazil, using molecular, cultural, morphological and pathogenic analyses. Genomic DNA extraction was performed and polymerase chain reaction (PCR) of GAPDH, HIS3 genes and the ITS region. Phylogenetic analyses were carried for each gene isolated and in the concatenated form. A phylogenetic tree was constructed according to the Bayesian inference, using concatenated genes. We also analyzed the intraspecific genetic diversity of the isolates by building a network of haplotypes in the collection. The remaining characterizations were performed with 10 strains selected based on the molecular characterization. The cultural characterization was performed in PDA and SNA media and sporulation, mycelial growth rate, colonies color, morphology and topography were evaluated. The morphological characterization was also performed in the same culture media by measuring 50 conidia per isolate in addition to observation of acervuli, *setae* and appressoria. The pathogenic characterization was performed using the variety BMX Potencia inoculated with toothpicks colonized with the fungus as well as by seed inoculations using the water restriction technique followed by sowing in sterilized soil. The evaluation of the pathogenicity was based on disease incidence and severity. The molecular analysis of *Colletotrichum* isolates showed only occurrence of *C. truncatum* species associated with soybean in the collection studied. However, the intraspecific analysis showed a high variability degree, with the presence of 27 haplotypes in the collection, many of them genetically identical to strains of *C. truncatum* elsewhere in the world. There was high cultural, morphological and pathogenic variability among the isolates. Pathogenic characterization showed, in both methods, high variation in aggressiveness of isolates. Isolates CMES 1075 and CMES 1080 were more aggressive due to their ability to cause bigger lesions on soybean stem and affect more severely the development of inoculated seeds. It was not possible to correlate intraspecific variability observed in the isolates with their respective geographical origin.

Keywords: Identification; Phylogeny; Genetic diversity; *C. truncatum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Morfologia e topografia da colônia.....29
- Figura 2 - Morfologia de estruturas fúngicas.....31
- Figura 3 - Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de 51 isolados de *C. truncatum*, de forma concatenada dos genes GAPDH, HIS3 e ITS, com os isolados tipos de diversas espécies (em negrito) e os isolados utilizados neste trabalho. Os valores de probabilidade a posteriori estão representados nos entroncamentos da figura.....38
- Figura 4 - Rede de haplótipos individual para os genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum*. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, cujo tamanho é proporcional à frequência do haplótipo na amostra e os círculos menores indicam pontos de mutação.....42
- Figura 5- Rede de haplótipos baseada nos genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum* de forma concatenada. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, proporcionais á frequência na amostra e os círculos menores indicam pontos de mutação.....43
- Figura 6 - Rede de haplótipos baseada nos genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum* de forma concatenada, representando as áreas geográficas amostradas no estudo. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, proporcionais à frequência na amostra em cada área geográfica amostrada, representada pelas diferentes cores. Os círculos menores indicam pontos de mutação.....45

Figura 7 - Aspectos das colônias de *Colletotrichum* após oito dias de cultivo em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias crescidas no meio SNA não foram mostradas pelo seu crescimento extremamente tênue, impossibilitando de serem visualizadas em imagem.....48

Figura 8- Isolado CMES1034 de *Colletotrichum truncatum* de soja cultivado em meio SNA. a: acérvulos; b: acérvulo e conídios c: setas e conídios, d-e: conídios, f: apressórios. Barra: a = 100 µm; b=10 µm, c- f=10 µm.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação do isolado, local de origem (cidade/Estado) e data de coleta dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.de soja utilizados neste trabalho.....	25
Tabela 2 -	Isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> utilizados neste estudo, número de acesso, hospedeiro, país e acesso Genbank.....	39
Tabela 3-	Haplotípos encontrados na população, utilizando os genes GAPDH, HIS3 e ITS de <i>Colletotrichum truncatum</i> de forma concatenada, obtido pelo programa DNASP v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009).....	44
Tabela 4 -	Coloração e Morfologia das colônias de <i>Colletotrichum truncatum</i> , analisadas nos meios de cultura BDA e SNA, após sete dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h.	49
Tabela 5-	Tabela 5 – Esporulação e taxa de crescimento micelial diário (TCMD) de isolados de <i>Colletotrichum</i> de soja, analisados nos meios de cultura BDA e SNA, após sete dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h.	50
Tabela 6 -	Tabela 6 – Dimensões de conídios de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> obtidos de soja.....	52
Tabela 7 -	Inoculação dos isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> na soja, utilizando palito de dente colonizado.....	56
Tabela 8 -	Variáveis relativas à germinação de sementes de soja da variedade BMX Potência quando inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> pelo método da restrição hídrica.....	57
Tabela 9 -	Variáveis relativas à germinação e sanidade de sementes de soja da variedade BMX Potência quando inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> utilizando rolo de papel filtro e blotter-test.....	58

1 INTRODUÇÃO

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas entre 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA 2003).

Plantas de soja são suscetíveis a antracnose em todos os estádios de desenvolvimento. Durante os primeiros estádios reprodutivos, áreas marrons, de forma irregular podem aparecer nos ramos, vagens e pecíolos. Ramos, vagens e folhas podem também ser infectados sem mostrar sintomas. Nas fases reprodutivas da soja e em estádios mais avançados da doença, os tecidos infectados são recobertos com acérvulos, os quais produzem setas que podem ser vistas a olho nu (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Em condições climáticas adequadas os danos podem ser consideráveis. O uso de sementes saudáveis ou o tratamento de sementes é essencial para a prevenção da doença ou redução das perdas (KIMATI, et al., 2005).

O gênero *Colletotrichum* Corda compreende inúmeras espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas, responsáveis pela doença denominadas antracnose, a qual causa danos consideráveis em grande número de culturas, tais como fruteiras, cereais, café e legumes (BAILEY; JEGGER, 1992).

Na cultura da soja a antracnose parece ser associada com a espécie *C. truncatum*, no entanto em algumas regiões como EUA, Itália e Taiwan outras espécies foram identificadas como o agente causal da doença (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998; CHEN et al., 2006). No Brasil não existem estudos sobre a etiologia da antracnose da soja.

A identificação de espécies de *Colletotrichum* por métodos tradicionais baseia-se na cor de colônia, formato e tamanho de conídios, formato de apressórios, temperatura ótima e taxa de crescimento, presença ou ausência de setas e existência do teleomorfo (SUTTON, 1992; GUNNELL; GUBLER, 1992). Entretanto, essas características podem ser influenciadas pelo ambiente, hospedeiro e condições de armazenamento das colônias. Além disso, é frequente a sobreposição de características morfológicas entre espécies distintas de *Colletotrichum*, dificultando ainda mais a identificação (CANNON et al., 2000; CANNON et al., 2012).

Técnicas moleculares tais como a PCR espécie-específica foram utilizadas, em passado recente, para complementar a identificação das espécies (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1992; FREEMAN et al., 1998; CANNON et al., 2000).

No entanto, à luz de técnicas mais modernas, como sequenciamento genômico, percebeu-se que a PCR espécie-específica identificava apenas complexos de espécies, sendo, portanto ineficiente para identificação precisa de espécies. Mais recentemente tem-se usado métodos filogenéticos, baseados em sequenciamento multilocus para a sistemática de classificação do gênero *Colletotrichum* (CROUCH et al., 2009 a,b; DAMM et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009; DAMM et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

A identificação e a distribuição das espécies do gênero *Colletotrichum* nas diferentes regiões produtoras de soja do Brasil é fundamental para o entendimento da epidemiologia da doença e para o sucesso no desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle.

Considerando a importância do agente causal da antracnose da soja bem como a importância da cultura no país, o presente trabalho teve por objetivo investigar a diversidade de espécies, além da variabilidade morfológica, genética e patogênica do gênero *Colletotrichum* nas diferentes regiões produtoras de soja do Brasil.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisões bibliográfica

A cultura da soja é de grande importância, sendo considerada uma das principais “commodities” agrícolas, com grande importância econômica em nível nacional e mundial. Em 2013, a produção mundial de soja foi superior a 280 milhões de toneladas, sendo que 86,27% desse valor foram produzidos no continente americano, com destaque para os Estados Unidos, Brasil e Argentina como maiores produtores (FAO, 2014).

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, com produtividade de 85,6 milhões de toneladas (safra 2013/2014), perdendo apenas para os EUA. Os maiores estados brasileiros produtores, são Mato Grosso e Paraná, com produção média de 26,4 e 14,7 toneladas respectivamente (EMBRAPA 2014). Na safra 2013/2014, a área cultivada foi de 30,135 milhões de hectares e a produtividade média de 2.842 kg ha⁻¹, valores superiores aos da safra anterior, que atingiram 27,729 milhões de hectares e sendo que a expectativa para a safra de 2014/2015 é de crescimento, para ambos os indicadores (CONAB, 2014).

A antracnose está entre os fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos da cultura da soja. O patógeno, sob condições de alta umidade, causa apodrecimento e queda das vagens, abertura das vagens imaturas e germinação dos grãos em formação. Pode causar perda total da produção, mas, com maior frequência, causa alta redução do número de vagens e induz a planta à retenção foliar e haste verde. Além das vagens, o fungo infecta a haste e outras partes da planta, causando manchas castanho-escuro. É também possível que seja um dos principais causadores da necrose da base do pecíolo que, nos últimos anos, tem sido responsável por severas perdas de soja no Cerrado (EMBRAPA, 2000).

A doença é causada pelo *Colletotrichum truncatum* segundo a literatura (ALMEIDA et al., 2005). Este também pode infectar outras culturas, como lentilha, ervilha, grão de bico e feijão (WEIDEMANN et al., 1988). O patógeno foi descrito pela primeira vez por Andrus e Moore (1935). É classificado na família *Glomerellaceae*, subclasse *Sordariomycetidae*, classe *Sordariomycetes*, filo *Ascomycota* e reino *Fungi*. Na sua fase perfeita é classificado no gênero *Glomerella* e possui alguns sinônimos como *Vermicularia truncata*, *C. dematium* sp. (INDEX FUNGORUM, 2014).

A infecção por *C. truncatum* pode induzir sintomas na parte aérea em vários estádios de desenvolvimento da planta, mas comumente ocorre na germinação das sementes, principalmente na semeadura precoce, estádios reprodutivos e na senescência da planta. As

infecções podem estar latentes na planta, durante os estádios vegetativos (CERKAUSKAS; DHINGRA; SINCLAR, 1983).

Outras espécies como *C. gloeosporioides* e *C. coccodes* já foram identificadas como os agentes causais da antracnose em soja em outros países, como nos EUA, Itália e Taiwan (RICCIONI; CONCA; HARTMAN, 1998; CHEN et al., 2006). Podendo, assim, haver a existência de um complexo de espécies que ocasiona a doença, assim como ocorre em outros patossistemas.

A diferenciação entre espécies do gênero *Colletotrichum* baseadas no hospedeiro de origem ou em sua gama de hospedeiros pode não ser um critério confiável. É importante ressaltar que um único (ou uma única espécie de) hospedeiro pode ser atacado por várias espécies do fungo e induzir sintomas semelhantes aos da antracnose, como também, uma única espécie pode causar doença em vários (ou várias espécies de) hospedeiros. Como exemplo, *C. dematium* foi isolado de folhas de algodoeiro e erva-de-touro (*Tridaxprocumbens*) após o plantio de soja, na safra 2002/2003 (MACHADO; CASSETARI NETO, 2011). Este fato dificulta a compreensão de aspectos epidemiológicos e afeta o sucesso na estratégia adotada para o manejo da doença (FREEMAN, 2000). Dessa forma, a caracterização e identificação de isolados de *Colletotrichum* visando compreender a real etiologia da antracnose em diferentes hospedeiros, vêm sendo buscada (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; PHOTITA et al., 2005).

No passado, a identificação e caracterização de *Colletotrichum* spp. foram comumente realizadas de acordo com a suas características morfológicas. No entanto, à luz dos conhecimentos atuais, esses critérios, isoladamente, não são suficientes para a diferenciação confiável entre espécies. Variações fenotípicas observadas frente às diferentes condições ambientais a que são submetidas as culturas, além da sobreposição de características entre espécies distintas, dificultam a identificação baseada na morfologia (CANNON et al., 2000; CANNON et al., 2012). Assim, os estudos de populações devem aplicar, também, técnicas moleculares com o intuito de identificar, caracterizar e demonstrar a variação entre as espécies (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009b). Cai et al. (2009) propõem abordagem polifásica, baseada em filogenia multilocus em associação com aspectos morfológicos, culturais, patogênicos e enzimáticos com essa finalidade.

Houve grande mudança no conceito de espécies do gênero *Colletotrichum*, principalmente nos últimos 10 anos, devido à identificação incerta de algumas espécies, principalmente com base em métodos tradicionais. Com o advento de técnicas moleculares a definição das espécies vem se baseando em análise multilocus, possibilitando a identificação

de novas espécies, as quais eram mencionadas pertencentes a um complexo de espécies anteriormente (DAMM et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

A técnica do sequenciamento gênico vem sendo utilizada com maior frequência, permitindo a análise de sequências de nucleotídeos de regiões do genoma, o que tem facilitado a identificação e gerado inúmeras informações sobre as relações existentes entre as espécies de *Colletotrichum*, principalmente quando aliado à análise multilocus (BAILEY et al., 1992; SREENEVASAPRASAD et al., 1996; PERES et al., 2002; DAMM et al., 2009).

Damm et al. (2012) trabalhando com isolados anteriormente identificados como *C. boninense* e *C. acutatum*, por meio de filogenia multilocus, obtiveram resultados que confirmaram que essas duas espécies eram, na verdade, complexos de espécies. Resultados idênticos foram obtidos por Weir, Johnston e Damm (2012) que, trabalhando com isolados de *C. gloeosporioides*, encontraram grande diversidade de espécies, reforçando assim a existência de um complexo de espécies relacionado com uma única doença.

O uso de dados moleculares vem sendo imprescindível para a investigação de espécies e o uso do sequenciamento de DNA representou o principal avanço sobre a sistemática de fungos do gênero *Colletotrichum*, se mostrando altamente sensível para a distinção de espécies, cujas caracterizações tradicionais falharam. O uso de métodos nos quais é realizada a incorporação de regiões e genes ou a combinação destes aumentou muito nos últimos anos (DAMM et al., 2009; ROJAS et al., 2010; PRIHASTUTI et al., 2009; SHIVAS et al., 2009; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012).

Diversos genes são utilizados para a abordagem multi-gene. Os mais utilizados são os genes: Espaçador interno transcrito (ITS), Actina (ACT), Beta-tubulina (TUB-2), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Quitina sintetase -1 (CHS-1) e Histona-3 (HIS3) (CAI et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009; DAMM et al., 2009; THAN et al., 2008; GUERBER; LIU; CORREL, 2003). De acordo com Crouch, Clarke e Hillman (2009) a região ITS sozinha não é indicada para a delimitação de espécies, devido ser um gene altamente conservado no genoma.

De forma geral o gênero *Colletotrichum* é altamente patogênico às espécies vegetais atacadas (CAI et al., 2009). E por apresentar uma grande gama de hospedeiros, os sintomas são variados, mas no geral aparecem como lesões necróticas e deprimidas nos órgãos infectados. Na cultura da soja, os órgãos afetados são a haste, as vagens e sementes, com escurecimento que progride para necrose (SINCLAIR, 1989).

Vários trabalhos descrevem características moleculares, morfológicas e patogênicas de espécies de *Colletotrichum* em diversos hospedeiros, como Prihastuti, et al. (2009) e Peres et

al. (2002), que caracterizam população isoladas de café e de frutíferas. Chen et al, (2006) com população isolada de soja, relata duas espécies associadas a doença, *C. gloeosporioides* e *C. truncatum*, caracterizando todos como patogênicos. No entanto isolados de uma mesma espécie, pode haver diferenciação na agressividade, o que evidencia variabilidade patogênica entre os indivíduos de uma mesma população. Este fato foi observado no trabalho de Mayonjo (1995), onde isolados de *C. truncatum* apresentaram diferenças significativas na habilidade de causar doença em três diferentes cultivares de soja.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção, identificação e preservação dos isolados

Foram utilizados 51 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de soja de diferentes regiões produtoras do Brasil, cedidos gentilmente pela Embrapa Soja, Londrina, PR. Tais isolados foram coletados entre 1992 e 2007 (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação do isolado, local de origem (cidade/estado) e data de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. de soja utilizados neste trabalho

(continua)

Isolado	Local de Origem	Data de coleta
CMES 286	Rondonópolis/MT	1992
CMES 1030	General Carneiro/PR	2006
CMES 1031	Taquarituba/SP	2005
CMES 1032	Campo Alegre/SC	2006
CMES 1033	Ponta Grossa/PR	2007
CMES 1034	Primavera do Leste/MT	2006
CMES 1036	Rondonópolis/MT	2006
CMES 1037	Balsas/MA	2006
CMES 1038	Uruçuí/PI	2004
CMES 1039	BA	2006
CMES 1040	BA	2006
CMES 1041	Nova Ponte/MG	2006
CMES 1042	Nova Ponte/MG	2006
CMES 1043	Bom Jesus/GO	2005
CMES 1044	Jataí/GO	2005
CMES 1045	Londrina/PR	2006
CMES 1046	Londrina/PR	2006
CMES 1050	Boa Vista/RO	2004
CMES 1051	Boa Vista/RO	2004
CMES 1055	Londrina/PR	2004
CMES 1056	Londrina/PR	2004
CMES 1057	Londrina/PR	2004
CMES 1058	Londrina/PR	2004
CMES 1059	Londrina/PR	2004
CMES 1060	Barreiras/BA	2006
CMES 1061	Tracajá/RO	2004
CMES 1062	Tracajá/RO	2004
CMES 1063	Tracajá/RO	2004
CMES 1064	Candeias/RO	2004
CMES 1066	Londrina/PR	2002
CMES 1067	Sorriso/MT	2006
CMES 1068	Passo Fundo/RS	2006
CMES 1069	BA	2006
CMES 1070	Ponta Grossa/PR	2007
CMES 1071	Ponta Grossa/PR	2007
CMES 1072	Sertanópolis/PR	2004
CMES 1075	Santarém/PA	2004
CMES 1076	Londrina/PR	2004
CMES 1077	Londrina/PR	2004
CMES 1078	Londrina/PR	2004

Tabela 1 - Identificação do isolado, local de origem (cidade/estado) e data de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. de soja utilizados neste trabalho

Isolado	Local de Origem	(conclusão)
		Data de coleta
CMES 1080	Boa Vista//Ro	2004
CMES 1081	Boa Vista//Ro	2004
CMES 1083	Londrina/PR	2004
CMES 1085	Candeias/RO	2004
CMES 1126	Campo Alegre/SC	2006
CMES 1127	Campo Alegre/SC	2006
CMES 1132	Sorriso/MT	2006
CMES 1141	Londrina/PR	2004
CMES 1144	Londrina/PR	2004
CMES 1182	Passo Fundo/RS	2006

A partir de cada isolado foram obtidas culturas monospóricas. Para isso, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD à 25°C e fotoperíodo de 12h. Após sete dias de crescimento, a partir das colônias que estavam esporulando, foram preparadas suspensões diluídas de conídios, de modo a conter de 1 a 10 conídios por campo no microscópio, quando examinadas sob aumento de 100x. Foram vertidos 100 µL da suspensão sobre a superfície do meio de cultura sólido Ágar-Água (AA) contido em placas de Petri, espalhando-se uniformemente. As placas com os conídios foram mantidas em BOD à 25°C e fotoperíodo de 12h por 24h horas. Posteriormente, ao microscópio foram retirados pequenos fragmentos do meio de cultura, cada um contendo um conídio germinado, os quais foram transferidos para meio de cultura BDA. Após crescimento, as culturas monospóricas foram preservadas pelos métodos de Castellani a 5°C e papel de filtro colonizado armazenado a -80 °C.

2.2.2 Caracterização Molecular

2.2.2.1 Extração de DNA total

Os isolados foram repicados para 50 ml de meio líquido semi-sintético (sacarose 10 g, extrato de levedura 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mg) em erlenmeyers mantidos sob agitação a 50 rpm em temperatura ambiente por 4 dias (ALFENAS,

1998). Após este período, o micélio foi colocado para secar sobre discos estéreis de papel filtro por 24 h.

Para extração do DNA genômico total de cada isolado, aproximadamente 100 mg de micélio seco foi macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído usando protocolo proposto por Murray (1980).

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas por meio de leituras em aparelho NanoDrop e confirmadas a partir da eletroforese em gel de agarose (1%). As amostras foram diluídas até a concentração de 100 ng DNA/ μ L de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

2.2.2.2 Amplificações, Purificação e sequenciamento de fragmentos gênicos

Foram realizadas as reações de amplificação da região do espaçador interno transcrito (ITS; 540 pb) e dos genes Histona 3 (HIS3; 490 pb) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH; 250 pb) (CAI et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009; DAMM et al., 2009; THAN et al., 2008; GUERBER; LIU; CORREL, 2003), de todos os isolados, utilizando os pares de primers V9G (HOOG; GERRITS VAN DEN ENDE, 1998) e ITS4(WHITE et al., 1990), GDF1 + GDR1 (GUEBER et al., 2003) e CYLH3F + CYLH3R (CROUS et al., 2004), respectivamente.

As reações de amplificação para esses fragmentos foram realizadas em termociclador Techne[®] modelo TC-512 equipado com gradiente de temperatura. A desnaturação inicial foi a 94°C/5 min, seguido de 40 ciclos a 94°C/30 s, 60°C /30 s, 72°C/30 s, e extensão final a 72°C/5 min, sendo que para o gene HIS3, foi utilizado a temperatura de anelamento de 52°C /30 s. Para cada gene, a reação de amplificação, com volume final de 25 μ l, conteve de 100 ng de DNA genômico, 0,2 μ M de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂.

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos e purificados utilizando-se o kit de purificação DNA GenômicoWizard®, Promega. Posteriormente, os *amplicons* purificados foram sequenciados na Companhia Macrogen (Coreia).

2.2.2.3 Edição das sequencias

Após o sequenciamento, verificou-se a qualidade das sequências por meio dos seus respectivos eletroferogramas. Para as sequências de má qualidade todos os procedimentos anteriormente descritos foram repetidos e novas sequências obtidas. As sequências direta e

reversa foram editadas com o *software* Codon Code Aligner versão 3.7.1.1 para obtenção do “*contig*” (Codon Code Corporation). A verificação da paridade entre as sequências obtidas e as depositadas no GenBank e outras bases de dados moleculares, foi realizada por meio do alinhamento local utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (ALTSCHUL et al., 1990).

Assim, as sequências obtidas foram alinhadas com as das espécies tipo e/ou epitipo do gênero *Colletotrichum* listadas no trabalho de Damm et al. (2009) para as inferências moleculares aqui previstas.

2.2.2.4 Análise filogenética

Para realizar o alinhamento do “*contig*” das sequências editadas dos isolados que foram utilizados na análise filogenética, foi utilizado o programa MEGA (TAMURA et al., 2007) e para concatenar os múltiplos alinhamentos, o programa Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2011). O modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado pelo programa MrModeltest v.3.7 (HUELSENBECK, 2001), usando AIC (critério de informação Akaike) para cada locus.

Para reconstrução filogenética baseado no alinhamento multilocus, foi utilizado o método de inferência Bayesiana. A análise particionada foi executada duas vezes no programa MrBayes v 3.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), usando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) – para gerar árvores filogenéticas com probabilidade a posteriori. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente com 1×10^7 gerações. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas pelo programa Figtree 3.1 (RAMBAU, 2009).

Durante o processo foram construídas diversas árvores, com os genes separadamente e, posteriormente, os três genes de forma concatenada, para assim realizar as inferências sobre o resultado obtido.

2.2.2.5. Caracterização haplotípica e análise da diversidade genética

Para a caracterização da diversidade genética intraespecífica de *C. truncatum*, foram utilizadas sequências de 51 isolados do patógeno utilizadas na análise filogenética, e as sequências de referência da espécie, depositadas no banco de dados GenBank e listadas na Tabela 2.

A identificação de haplótipos distintos foi realizada usando o programa DNASP v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009), a partir das sequências concatenadas dos três genes amplificados

para cada isolado, de forma separada para cada gene e de forma concatenada, incluindo as sequências de referência citadas acima. Para realizar inferências sobre o relacionamento filogenético dos isolados de *C. truncatum* associados à antracnose em soja, construiu-se uma rede de haplótipos usando o método da parcimônia estatística, com a confiabilidade de 95% (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992). Essa análise se baseia em uma matriz de distância genética entre todos os haplótipos, conectando-os, par a par, até que todos se encontrem ligados à rede. Essa análise foi executada com o auxílio do programa TCS v. 1.21:2 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), onde os “gaps ou indels” foram codificados como dados perdidos e, portanto, não foram considerados na diferenciação dos haplótipos.

2.2.3 Caracterização cultural

Dez isolados representativos de cada subclado formado na caracterização molecular foram selecionados para a caracterização cultural. Discos de micélio de 4 mm de diâmetro foram retirados da margem das colônias monospóricas cultivadas por cinco dias em meio BDA e depositadas sobre o centro de placas de Petri contendo os meios BDA e SNA (NIRENBERG 1976).

As placas foram incubadas em BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias (CAI et al., 2009). Foram feitas leituras diárias dos dois diâmetros ortogonais das colônias, com auxílio de paquímetro digital, durante sete dias. As médias obtidas dos diâmetros serviram para o cálculo da taxa de crescimento micelial (mm/dia), que foram calculadas por meio do cálculo da taxa de crescimento micelial diário TCMD (mm/dia), conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991): $TCMD = \sum (D - D_a) / N$, onde D= diâmetro médio atual da colônia, D_a=diâmetro médio da colônia no dia anterior e N= número de dias. No oitavo dia, observou-se a morfologia das colônias, comparando suas topografias e formatos de bordos com a descrição de Gaws, Verkley e Crous (2007) (Fig. 1).

Figura 1 – Morfologia de colônias. Topografia da colônia (A-H): A, plana; B, levantada; C, convexa baixa; D, convexa; E, levantada com centro côncavo; F, levantada com centro convexo; G, convexa com superfície papilada; H, draughts-man-shaped. Formato dos bordos da colônia (I-P): I, inteiro; J, ondulado; K, lobado; L, crenado; M, dentado; N, radialmente estriado; O, fimbriado; P, rizoidal. Adaptado de Gaws, Verkley e Crous (2007).

Avaliou-se, ainda, a coloração das colônias além da quantificação da esporulação e presença de microescleródios. A esporulação foi determinada pela quantidade de esporos produzidos por milímetro quadrado de colônia. Esse procedimento foi realizado por meio da adição de água destilada esterilizada em cada placa, seguida pela raspagem das colônias com pincel e determinação da concentração de esporos com auxílio de câmara de Neubauer. Em seguida, dividiu-se a quantidade total de esporos produzidos na colônia pela sua área, para se obter o número de esporos.mm⁻² de colônia.

Para os dados de esporulação e crescimento micelial o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma placa. Os valores médios foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de probabilidade de 5%. Apenas para os valores de esporulação no meio de cultura BDA as médias dos valores obtidos foram transformados para log(X) e submetidos à mesma análise estatística mencionada, utilizando o software Assistat (SILVA, 2002).

2.2.4 Caracterização Morfológica

Para a caracterização morfológica, utilizaram-se os mesmos 10 isolados usados na caracterização cultural. Os isolados selecionados foram analisados morfolologicamente em dois meios de cultura, o SNA e BDA. Foram avaliadas as dimensões médias dos conídios

(comprimento, largura e relação entre comprimento e largura), além da observação e descrição de acérvulos, setas e apressórios. As estruturas fúngicas foram comparadas com o trabalho de Gaws, Verkley e Crous (2007) (Figura 2).

Figura 2 – Morfologia de estruturas fúngicas: A, Globular; B, Semiglobular; C, Elipsoidal; D, Reniforme; E, Fusiforme; F, Apiculada; G, Cilíndrica; H, Truncado; I, Falcado; J, Ampuliforme; K, Ovoide; L, Piriforme; M, Clavado; N, Obovoide, O, Lenticular

Para este estudo, utilizou-se a técnica da microcultura, realizada como se descreve a seguir. Os isolados foram repicados para meio BDA e incubados a 25°C e fotoperíodo, por 7 dias. Após o crescimento, as estruturas do patógeno foram removidas e colocadas nas extremidades de blocos dos meios de cultura BDA e SNA, contidos sobre lâminas de microscopia esterilizadas. Em seguida, uma lamínula esterilizada foi sobreposta ao bloco. Esse conjunto foi acondicionado em placa de Petri esterilizada, contendo um disco de papel de filtro umedecido ao fundo. Após 7 dias de incubação as lamínulas foram removidas e usadas na confecção de lâminas semipermanentes para a observação ao microscópio de luz (CAI et al., 2009).

As dimensões dos conídios foram determinadas por meio da avaliação de 50 conídios de cada isolado, utilizando microscópio tipo Axioskop 2 (Zeiss) equipado com Contraste Interferencial Diferencial (DIC). As imagens, transmitidas para o computador, foram analisadas por meio do programa Vision Rel 4.9. Os resultados foram submetidos à análise de

variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat (SILVA, 2002).

2.2.5 Caracterização Patogênica

A caracterização patogênica foi realizada utilizando-se duas metodologias distintas para a inoculação do fungo nas plantas de soja.

2.2.5.1 Inoculações por palito de dente colonizado

O experimento foi instalado na casa de vegetação do campo experimental do departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Utilizaram-se vasos com capacidade de 2 litros, contendo solo autoclavado, semeando-se em cada vaso 20 sementes de soja, da cultivar BMX Potência. Antes da inoculação, foi efetuado desbaste, deixando-se dez plantas por vaso. Foram utilizadas quatro repetição para cada tratamento, totalizando 40 plantas por isolado.

Pontas de palitos de dente, cortadas com cerca de 1 cm de comprimento, foram submetidos à fervura em água destilada visando a eliminação de possíveis resíduos presentes na madeira. Após este processo os palitos foram autoclavados juntamente com meio BDA líquido e posteriormente inseridos, com a ponta para cima, no meio de cultura BDA solidificado em placas de Petri. Posteriormente, foram colocados discos de micélio colonizados com os isolados sobre o meio BDA, entre os palitos, segundo técnica descrita por Keeling (1982), modificada por Yorinori (1996). Após a colonização dos palitos, os mesmos foram utilizados nas inoculações.

As plantas foram inoculadas no estágio V1, cerca de dez dias após semeadura. As inoculações foram feitas inserindo-se o palito colonizado pelo micélio do fungo 1 cm abaixo das folhas cotiledonares das plantas, evitando-se atravessar o caule. As plantas, após a inoculação, foram mantidas em câmara úmida, por 72 horas. Após este período, permaneceram nas bancadas de casa de vegetação durante 20 dias até a avaliação, submetidas à irrigação por nebulização diariamente. Como controle as plântulas foram inoculadas com palito estéril.

A avaliação foi realizada medindo-se a extensão da lesão na haste da planta, com auxílio de um paquímetro digital. Os valores médios dos tamanhos das lesões foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott knott ao nível de probabilidade de 5%, utilizando o software Assistat (SILVA, 2002). O ensaio foi realizado duas vezes.

2.2.5.2 Inoculações das sementes pelo método da restrição hídrica

Foram utilizadas sementes de soja da variedade BMX Potência, submetidas à desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos, a fim de eliminar possíveis patógenos aderidos externamente às sementes. Testes de germinação e sanidade foram realizados previamente para verificar viabilidade das sementes e a presença do fungo *C. truncatum*. Foram utilizadas no trabalho sementes com porcentagem de germinação e vigor acima de 80%, e ausência do fungo alvo deste trabalho.

As sementes foram inoculadas com os 10 isolados escolhidos previamente. A inoculação foi realizada utilizando o meio de cultura BDA adicionado de manitol como restritor hídrico (MACHADO et al., 2001; COSTA et al., 2003). Testes preliminares com diferentes concentrações de manitol e diferentes tempos de contato com as sementes revelaram que a concentração que proporcionou potencial osmótico de -0,6 Mpa e 24 h de contato foi a melhor para a inoculação das sementes, sendo utilizada nos testes. O cálculo para se obter a quantidade necessária de manitol, foi obtido por meio da fórmula de Van'tHoff (SALISBURY; ROSS, 1991). Como testemunha utilizou-se o meio BDA com manitol e sem o fungo.

Os isolados foram repicados para meio BDA e incubados durante 5 dias em câmara de crescimento. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados das margens das colônias e depositado no centro do meio BDA acrescido de manitol contido em placas recém preparado. As placas, em número de cinco por tratamento, foram distribuídas ao acaso na câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C, até o fechamento da colônia fúngica na placa. Após, as sementes foram adicionadas sobre as colônias em todos os tratamentos e permaneceram durante 24 horas, nas mesmas condições descritas acima. Em seguida as sementes foram retiradas das placas e mantidas em gerbox, durante 72 horas para secagem de forma natural (MACHADO et al., 2001).

Após a inoculação, as sementes foram semeadas em solo autoclavado contido em bandejas plásticas de 20,5x47x12 cm (largura x comprimento x altura). Cinquenta sementes foram semeadas por bandeja, com quatro repetições (bandejas) por tratamento, as quais foram mantidas em casa de vegetação sob nebulização diária. A avaliação foi realizada calculando-se o índice de velocidade de germinação (IVG) através da fórmula de Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ onde: G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias, desde a primeira, segunda, até a última contagem. Foi realizada também a determinação da porcentagem de

emergência e sobrevivência. Os valores médios foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott knott ao nível de probabilidade de 5%. O ensaio foi realizado duas vezes.

Na segunda repetição do ensaio, após a realização do procedimento descrito, as sementes inoculadas foram submetidas a testes de germinação e sanidade. Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento, acondicionadas em rolos de papel filtro, umedecidos com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos foram levados para um germinador regulado a 25°C por sete dias. Na avaliação, foram computadas as porcentagens de plântulas infectadas e plântulas não infectadas, bem como plântulas normais, anormais e sementes mortas, segundo Brasil (2009a). Para o teste de sanidade foi utilizando o blotter-test, sendo as sementes incubadas em placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. Foram utilizadas 20 repetições de 10 sementes, que foram mantidas em câmara de crescimento à 22°C, em regime alternado de 12 horas de luz branca e 12 horas de escuro. Foi avaliado a presença do fungo nas sementes aos sete dias após o plaqueamento, com auxílio de microscópio estereoscópico e determinada a taxa de transmissão, em função da presença do patógeno nas sementes e da porcentagem de plântulas infectadas.

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterização Molecular

A análise filogenética foi realizada com sequencias de 51 isolados de *Colletotrichum*, incluindo 15 sequencias tipo das principais espécies, a maioria com conídios curvados, além de 9 representantes de *C. truncatum* e o outgroup (*C. lindemuthianum* CBS151.28), que foram baixadas do GenBank, totalizando 75 sequências (Tabela 2). Os limites dos genes foram: GAPDH: 1-391, HIS3: 392-800, ITS: 801-1450, com 1450 caracteres. Para a inferência Bayesiana, os modelos de evolução baseados no critério AIC foram (K80+I+G) para GAPDH, (GTR+I+G) para HIS3 e (K80+G) para ITS, os quais foram incluídos na análise particionada.

A análise bayesiana multilocus formada pela concatenação dos três genes, gerou uma árvore filogenética, com os isolados analisados agrupando em um cladomonofilético, juntamente com isolados da espécie tipo *C. truncatum*, como mostra a figura 3. Tal resultado sugere a presença de uma única espécie associada à doença na cultura da soja.

Houve formação de subclados dentre os isolados estudados, evidenciando variação genética entre a coleção de isolados. Dessa forma foram separados 10 isolados que representavam os principais subclados, os quais foram usados para as demais caracterizações previstas.

Na literatura diversos trabalhos como descrito por Riccioni, Conca e Hartman, (1998) e Chen et al. (2006), relatam *C. gloeosporioides* e *C. coccodes* como agente causal da doença. Recentemente diversos trabalhos vêm relatando a presença de outras espécies associadas a antracnose na cultura da soja, como *C. destructivum* (RAMOS, et al., 2013), *C. gloeosporioides* (MAHMODI, et al., 2013), *C. chlorophyti* (HANG, 2013), e novas espécies como *C. incanum* sp. Nov (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMA, 2014). Com uma coleção de isolados numérica e geograficamente representativa como a do presente trabalho, esperava-se encontrar maior variabilidade genética entre os isolados, indicando presença de mais de uma espécie associada à antracnose da soja no Brasil. Como os isolados utilizados neste estudo foram amostrados no período anterior a esses relatos, há possibilidades da presença de outras espécies atualmente nos campos de produção de soja no Brasil. Para elucidar isso, novos estudos precisam ser conduzidos com isolados coletados mais recentemente.

Para a caracterização da diversidade genética dos isolados de *C. truncatum*, utilizou-se o método de parcimônia estatística, aplicado as 51 sequências dos isolados estudados, utilizando-se os três genes amplificados, GAPDH, HIS3 e ITS. A análise da diversidade intraespecífica foi realizada de forma separada para cada gene e de forma concatenada, constatando-se a presença de diversos haplótipos na coleção investigada. Analisando as redes de haplótipos construídas para cada gene individualmente, observou-se a presença de um haplótipo mais frequente e amplamente distribuído nas áreas amostradas, resultante de multiplicação clonal do patógeno, representado pela figura geométrica de maior tamanho em cada uma das redes (Figura 4). Foram identificados 5, 12 e 13 haplótipos, respectivamente, para os genes ITS, GAPDH e HIS3, evidenciando diferenças no potencial de discriminação de haplótipos de cada um desses genes, sendo que os genes GAPDH e HIS3 permitiram melhor resolução da variação genética entre os isolados, em comparação à região ITS.

A análise dos haplótipos de forma concatenada, utilizou-se as 51 sequências dos três genes de *C. truncatum* e adicionando-se nove sequências de *C. truncatum* retiradas do GenBank, as quais foram também utilizadas na análise filogenética, totalizando 60 sequências analisadas. Foram identificados 27 haplótipos nas 60 sequências analisadas. Construiu-se uma rede de haplótipos para melhor resolução da distribuição da variação genética intraespecífica, e o resultado pode ser visto na Figura 5. Houve formação de três grupos principais contendo

os haplótipos analisados. O primeiro grupo, identificado pelo círculo verde na Figura 5, engloba o haplótipo mais comum da população estudada, que é geneticamente idêntico às sequências de *C. truncatum* de isolados de plantas de soja nos EUA (CBS1953 e CBS1825). Tal posicionamento na rede indica que esse haplótipo pode ser o iniciador das epidemias de antracnose em soja no país, por ser o mais frequente e amplamente distribuído na população estudada. Esse haplótipo é compartilhado por 29 isolados do patógeno, originados de diferentes áreas geográficas do Brasil. O segundo grupo, destacado em azul, é composto por haplótipos próximos geneticamente a isolados de *C. truncatum* provenientes de plantas de feijão do Brasil e dos EUA (CBS71070 e CBS15135). O terceiro grupo (em vermelho) é formado por haplótipos geneticamente relacionados a isolados de *C. truncatum* provenientes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (CBS50697) e da planta daninha tiririca (*Cyperus rotundus*) (CBS71170). Essa constatação, aliada aos relatos da literatura que indicam a atuação das plantas daninhas como fontes de inóculo de *Colletotrichum* em outros patossistemas (RAIS; PENNYPARCHER, 1987; FRARE, 2011), pode indicar que, também no caso da antracnose da soja, este fato esteja ocorrendo. Devido às óbvias implicações epidemiológicas dessa hipótese, sugere-se que novos estudos sejam conduzidos para elucidar esse aspecto.

Os resultados encontrados na análise dos haplótipos estão em concordância com os dados obtidos pela análise filogenética, nos quais os principais subclados encontrados são formados, na maioria das vezes, por isolados pertencentes ao mesmo grupo de haplótipos, englobando as mesmas sequências de referência do GenBank (Figuras 3 e 5). Esses resultados indicam que há um considerável nível de variabilidade genética dentro da espécie *C. truncatum*, como observado em estudos anteriores, revelando alto nível de diversidade genética, a partir de marcadores moleculares distintos (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2014; VASCONCELOS, et al., 1994). Sharma, Pinnaka e Shenoy (2014), analisando uma população de *C. truncatum* isolados de pimenta (*Capsicum* spp) da Índia e utilizando marcadores microssatélites, encontraram polimorfismo em todos os locos analisados, podendo dividir a população do patógeno em seis grupos distintos. Estudos que utilizaram RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) também apontam diferenças genéticas entre isolados de *C. truncatum* de soja coletados no Brasil, sendo possível separá-los em três grupos distintos, de acordo com o perfil genético apresentado (VASCONCELOS, et al., 1994).

Não foi observada correlação entre área geográfica e a presença dos haplótipos nas áreas amostradas no estudo, uma vez que os haplótipos não foram agrupados em função da área em que os isolados do patógeno foram coletados. Ao contrário, nos três grandes grupos

de haplótipos observados na rede, são encontradas sequências de *C. truncatum* de vários estados do Brasil e de outros países, como pode ser demonstrado na figura 6, através da rede de haplótipos construída em função da área geográfica de cada isolado. A distribuição dos haplótipos de *C. truncatum* deste estudo é típica de dispersão do patógeno via sementes, considerada por Almeida et al. (2005) a principal forma de disseminação da doença.

Figura 3 – Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de 51 isolados de *C. truncatum*, de forma concatenada dos genes GAPDH, HIS3 e ITS, com os isolados tipos de diversas espécies (em negrito) e os isolados utilizados neste trabalho. Os valores de probabilidade a posteriori estão representados nos entroncamentos da figura

Tabela 2 – Isolados de *Colletotrichum truncatum* utilizados neste estudo, número de acesso, hospedeiro, país e acesso Genbank (continua)

Espécies ¹	Nº Acesso	Hospedeiro	Acesso GenBank ²			
			País	ITS	GPDH	HIS3
<i>C. anthrisci</i> *	CBS 125334	<i>Anthriscussylvestris</i> , deadstem	Holanda	GU227845	GU228237	GU228041
<i>C.chlorophyti</i> *	IMI 103806	<i>Chlorophytum</i> sp.	Índia	GU227894	GU228286	GU228090
<i>C. circinans</i> *	CBS 221.81	<i>Allium cepa</i>	Sérvia	GU227855	GU228247	GU228051
<i>C. curcumae</i> *	IMI 288937	<i>Curcuma longa</i> ,	Índia	GU227893	GU228285	GU228089
<i>C. dematium</i> *	CBS 125.25	<i>Eryngium campestre</i> , deadleaf	França	GU227819	GU228211	GU228015
<i>C.fructi</i> *	CBS 346.37	<i>Malussylvestris</i> , fruit	USA	GU227844	GU228236	GU228040
<i>C. Lineola</i> *	CBS 125337	<i>Apiaceae</i> , deadstem	Chéquia	GU227829	GU228221	GU228025
<i>C.liriopes</i> *	CBS 119444	<i>Liropemuscaris</i>	México	GU227804	GU228196	GU228000
<i>C.phaseolorum</i> *	CBS 157.36	<i>Phaseolusradiatus</i> var. <i>aureus</i>	Japão	GU227896	GU228288	GU228092
<i>C.rusci</i> *	CBS 119206	<i>Ruscus</i> , stem	Itália	GU227818	GU228210	GU228014
<i>C.spaethianum</i> *	CBS 167.49	<i>Hostasieboldiana</i> , deadstem	Alemanha	GU227807	GU228199	GU228003
<i>C. verruculosum</i> *	IMI 45525	<i>Crotalariajuncea</i>	Zimbábue	GU227806	GU228198	GU228002
<i>C.cocodes</i> *	CBS 369.75	<i>Solanumtuberosum</i>	Holanda	HM171679	HM171673	JX546779
<i>C.gloeosporioides</i> *	CBS 112999	<i>Citrussinensis</i>	Itália	JQ005152	JQ005239	JQ005413
<i>C. truncatum</i> *	CBS 151.35	<i>Phaseoluslunatus</i>	USA	GU227862	GU228254	GU228058
<i>C. truncatum</i>	CBS 710.70	<i>Phaseoluslunatus</i>	Brasil	GU227864	GU228256	GU228060
<i>C. truncatum</i>	CBS 711.70	<i>Cyperusrotundus</i>	Brasil	GU227892	GU228284	GU228088
<i>C. truncatum</i>	CBS 195.32	<i>Glycinemax</i> , anthracnose	USA	GU227865	GU228257	GU228061
<i>C. truncatum</i>	CBS 182.52	<i>Glycinemax</i>	USA	GU227866	GU228258	GU228062
<i>C. truncatum</i>	CBS 345.70	<i>Glycinemax</i> , seed	Dinamarca	GU227867	GU228259	GU228063
<i>C. truncatum</i>	CBS 506.97	<i>Vignaunguiculata</i>	Burkina Faso	GU227871	GU228263	GU228067
<i>C. truncatum</i>	CBS 172.48	<i>Unknown</i>	Índia	GU227878	GU228270	GU228074
<i>C. truncatum</i>	CBS 335.75	<i>Capsicumannuum</i> , seed	Indonésia	GU227879	GU228271	GU228075
<i>C. lindemuthianum</i> (outgroup)	CBS 151.28	<i>Phaseolusvulgaris</i>	UK	GU227800	GU228192	GU227996
CMES 286	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614335	KJ614383	KJ614290
CMES1030	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614294	KJ614338	KJ614245

Tabela 2 – Isolados de *Colletotrichum truncatum* utilizados neste estudo, número de acesso, hospedeiro, país e acesso Genbank (continua)

Espécies	Nº Acesso	Hospedeiro	País	Acesso GenBank		
				ITS	GAPDH	HIS
CMES1031	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614295	KJ614339	KJ614246
CMES 1032	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614296	KJ614340	KJ614247
CMES 1033	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614300	KJ614344	KJ614250
CMES 1034	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614302	KJ614345	KJ614252
CMES1036	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614303	KJ614346	KJ614253
CMES1037	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614304	-	KJ614254
CMES 1038	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614305	-	KJ614255
CMES1039	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614307	KJ614347	KJ614256
CMES1040	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614306	KJ614348	KJ614257
CMES1041	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614351	KJ614259
CMES1042	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614311	KJ614353	KJ614261
CMES1043	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614312	KJ614354	KJ614262
CMES 1044	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614313	KJ614355	KJ614263
CMES 1045	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614315	KJ614357	KJ614265
CMES1046	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614316	KJ614362	-
CMES1050	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614323	KJ614367	KJ614274
CMES1051	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614324	KJ614368	KJ614275
CMES1055	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614326	KJ614370	KJ614277
CMES1056	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614371	KJ614278
CMES1057	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614327	KJ614372	KJ614279
CMES1058	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614373	KJ614280
CMES1059	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614328	KJ614374	KJ614281
CMES1060	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614329	KJ614375	KJ614282
CMES1061	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614376	KJ614283
CMES1063	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614331	KJ614378	KJ614285
CMES1064	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614379	KJ614286

Tabela 2 – Isolados de *Colletotrichum truncatum* utilizados neste estudo, número de acesso, hospedeiro, país e acesso Genbank (conclusão)

Espécies	Nº Acesso	Hospedeiro	País	Acesso GenBank		
				ITS	GAPDH	HIS
CMES1066	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614333	KJ614381	KJ614288
CMES1067	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614334	KJ614382	KJ614289
CMES1068	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614292	KJ614336	KJ614243
CMES1069	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614293	KJ614337	KJ614244
CMES1070	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614299	KJ614343	KJ614249
CMES1071	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614301	-	KJ614251
CMES1072	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614309	KJ614350	KJ614258
CMES1073	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614310	KJ614352	KJ614260
CMES1075	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614314	KJ614356	KJ614264
CMES1076	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614316	KJ614359	KJ614267
CMES1077	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614361	KJ614269
CMES1078	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614319	KJ614363	KJ614270
CMES1079	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614320	KJ614364	KJ614271
CMES1080	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614321	KJ614365	KJ614272
CMES1081	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614322	KJ614366	KJ614273
CMES1083	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614325	KJ614369	KJ614276
CMES1085	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614332	KJ614380	KJ614287
CMES1126	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614297	KJ614341	-
CMES1127	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614298	KJ614342	KJ614248
CMES1132	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614308	KJ614349	-
CMES1141	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	KJ614358	KJ614266
CMES1144	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	KJ614317	KJ614360	KJ614268
CMES1182	-	<i>Glycinemax</i>	Brasil	-	-	-

¹ Espécies com * representam espécies tipo.² Acesso ao Genbank iniciado com KJ foram obtidos nesse estudo.

Figura 4- Rede de haplótipos individual para os genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum*. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, cujo tamanho é proporcional à frequência do haplótipo na amostra e os círculos menores indicam pontos de mutação

Figura 5- Rede de haplótipos baseada nos genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum* de forma concatenada. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, proporcionais à frequência na amostra e os círculos menores indicam pontos de mutação

Tabela 3 – Haplótipos encontrados na população, utilizando os genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum* de forma concatenada, obtido pelo programa DNASP v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009)

Haplótipos (27)	Isolados
1	CBS19532; CBS18252; CMES1068; CMES1030; CMES1031; CMES1032; CMES1126; CMES1127; CMES1033; CMES1036; CMES1037; CMES1038; CMES1039; CMES1132; CMES1043; CMES1144; CMES1081; CMES1050; CMES1051; CMES1083; CMES1055; CMES1057; CMES1058; CMES1060; CMES1061; CMES1064; CMES1085; CMES1066; CMES286
2	CMES1080
3	CMES1056
4	CMES1069
5	CMES1070
6	CBS71010; CMES1072
7	CMES1034
8	CBS15135
9	CMES1182
10	CMES1075
11	CMES1040
12	CBS34570
13	CMES1059
14	CBS33575
15	CMES1076
16	CBS17248
17	CBS50697
18	CMES1042
19	CMES1067
20	CMES1078
21	CMES1077
22	CMES1046
23	CMES1073; CMES1045; CMES1079
24	CMES1071
25	CMES1044; CMES 1141; CMES 1063
26	CBS71170
27	CMES1041

Figura 6- Rede de haplótipos baseada nos genes GAPDH, HIS3 e ITS de *Colletotrichum truncatum* de forma concatenada, representando as áreas geográficas amostradas no estudo. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Figuras geométricas indicam grupos de haplótipos, proporcionais à frequência na amostra em cada área geográfica amostrada, representada pelas diferentes cores. Os círculos menores indicam pontos de mutação

2.3.2 Caracterização Cultural

De acordo com a análise filogenética, foram escolhidos os isolados CMES286, CMES1034, CMES1040, CMES1059, CMES1069, CMES1075, CMES1076, CMES1080, CMES1141 e CMES1182 para a caracterização cultural.

As colônias, após sete dias de cultivo à 25°C sob fotoperíodo de 12 horas, apresentaram crescimento denso de coloração escura no meio BDA, e crescimento ralo, com coloração branca a acinzentada no meio SNA. Entre os isolados analisados no meio de cultura BDA apenas o isolado CMES1076 apresentou coloração diferente das demais, caracterizando-se por exibir colônia de cor alaranjada, como é mostrado na figura 7. A descrição da coloração das colônias nos dois meios de cultura analisados está apresentada na tabela 4. Não houve formação de microescleródios em nenhum isolado, nos dois meios de cultura. Os isolados CMES1034, CMES1040, CMES1075, CMES1080 e CMES1182 no meio BDA produziram massas de esporos de coloração alaranjada.

A topografia das colônias, nos dois meios de cultura, foi predominante plana. Em relação ao formato dos bordos os isolados cultivados em meio BDA apresentaram predominância de formato inteiro e apenas o isolado CMES1080 apresentou formato ondulado. Fato semelhante ocorreu no meio SNA, no qual a maioria dos isolados apresentou colônias inteiras, com apenas dois isolados (CMES1080 e CMES1182) apresentou colônias dentadas (Tabela 4 e Figura 7).

Houve grande variação em relação à esporulação dos isolados, nos dois meios de cultura analisados. No meio BDA os isolados CMES286, CMES1034, CMES1075, CMES1076 e CMES1182 apresentaram as maiores médias, com produções entre $9,7$ e $29,9 \times 10^5$ conídios/mm². Os isolados CMES 1059 e CMES 1069 apresentaram menor média de esporulação, com $1,78$ e $3,4$ conídios/cm², como mostra a tabela 5. No meio SNA, houve menores valores de esporulação, certamente devido à característica do meio, com poucos nutrientes disponíveis para o fungo. Os isolados CMES 1034, CMES1069, CMES1075 e CMES1141 apresentaram as maiores médias, diferindo estatisticamente dos demais. Nesse meio, os isolados CMES1059 e CMES1080 apresentaram menores valores de esporulação e os demais isolados apresentaram valores intermediários. Segundo Cai et al, (2009), a análise de esporulação não é um critério confiável para se diferenciar intra e inter especificamente isolados de *Colletotrichum*, devido à grande variação existente dentro do gênero, quando submetidas à diferentes condições e substratos.

Em relação à taxa de crescimento micelial diário (TCMD), assim como nos dados de esporulação houve grande variação dos valores nos dois meios de cultura analisados (Tabela

5). No meio BDA os isolados foram separados estaticamente em dois grupos. O grupo 1 foi representado pelos isolados CMES1034, CMES1040, CMES 1059, CMES1069 e CMESCMES1076, que apresentaram taxa média de crescimento micelial de 7,94 mm/dia, enquanto o grupo 2 foi representado pelos isolados CMES286, CMES1075, CMES1080, CMES1141, CMES1182, com taxa de crescimento de 6,52 mm/dia. Para o meio SNA, houve maior variação da TCMD, podendo-se separar os isolados em 4 grupos. O grupo 1 foi representado pelos isolados CMES1069 e CMES1076, que apresentaram a maior TCMD, 9,2 mm/dia, o grupo 4 apresentou a menor TCMD, com 3,3 mm/dia. Os demais isolados foram agrupados em grupos intermediários em relação à TCMD. Os valores obtidos de TCMD no meio BDA estão de acordo com os resultados obtidos por Ford et al. (2004), segundo os quais, isolados de *C. truncatum* de lentilha apresentaram taxa de crescimento média de 6 mm/dia.

A taxa de crescimento micelial diária é comumente utilizada para a taxonomia de *Colletotrichum* (SUTTON, 1992), e é considerada uma característica estável e útil para distinção de espécies, como *C. acutatum* e *C. glosporiodes*. No entanto não há relatos de estudos de variabilidade nessa característica dentro de uma mesma espécie.

Figura 7 - Aspectos das colônias de *Colletotrichum* após oito dias de cultivo em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias crescidas no meio SNA não foram mostradas pelo seu crescimento extremamente tênue, impossibilitando de serem visualizadas em imagem

Tabela 4 – Coloração e Morfologia das colônias de *Colletotrichum truncatum*, analisadas nos meios de cultura BDA e SNA, após sete dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h

Meio BDA					Meio SNA		
Isolados	Coloração		Morfologia das colônias		Coloração	Morfologia das colônias	
	Colônia	Massa de esporos	Reverso	Topografia e Formato	Colônia	Reverso	Topografia e Formato
CMES286	Cinza escura	Ausente	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES1034	Cinza escura	Alaranjada	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES1040	Cinza escura	Alaranjada	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES1059	Cinza escura	Ausente	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES1069	Cinza claro	Ausente	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES 1075	Cinza escuro	Alaranjada	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES 1076	Alaranjado	Ausente	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES 1080	Cinza escura	Alaranjada	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, dentada
CMES 1141	Cinza escura	Ausente	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, inteira
CMES 1182	Cinza escura	Alaranjada	Cinza escuro	Plana, inteira	Branco acinzentada	Branca	Plana, dentada

Tabela 5 – Esporulação e taxa de crescimento micelial diário (TCMD) de isolados de *Colletotrichum* de soja, analisados nos meios de cultura BDA e SNA, após sete dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h

Isolado	BDA		SNA	
	Esporulação (x10 ⁵ conídios/mm ²)	TCMD (mm/dia)	Esporulação (x10 ⁵ conídios/mm ²)	TCMD (mm/dia)
CMES286	17,8 a *	6,6 b	0,29 b	6,8 c
CMES1034	11,21 a	8,1 a	0,47 a	7,8 b
CMES1040	4,6 b	7,7 a	0,37 b	7,4 b
CMES1059	1,78 c	7,6a	0,09 c	3,3 d
CMES1069	3,4 c	8,9 a	0,56 a	8,8 a
CMES1075	29,9 a	6,8 b	0,29 b	6,6 c
CMES1076	9,7 a	7,4a	0,48 a	9,6 a
CMES1080	7,8 b	6,0 b	0,10 c	3,3 d
CMES1141	4,3 b	7,0 b	0,46 a	8,0 b
CMES1182	18,0 a	62 b	0,38b	7,7 b
CV%	15,48	11,6	15,0	9,29

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de probabilidade. Para a análise estatística dos valores de esporulação em BDA, os dados foram transformados em log(X)

2.3.3 Caracterização Morfológica

As análises microscópicas revelaram a presença de conídios falcados, hialinos, unicelulares, nos dois meios de cultura, com dimensões variáveis como mostra a tabela 6.

O comprimento médio dos conídios foi estatisticamente superior para os isolados CMES1069 e CMES1076, nos dois meios de cultura analisados, com uma amplitude de 21,25 a 30,71 µm. No meio BDA, a média foi de 24,66µm e no meio SNA foi 26,5 µm.

Para a largura dos conídios no meio BDA o isolado CMES1075 apresentou maior largura, com média de 3,40 µm e amplitude de 2,33 a 4,42 µm. Os isolados CMES286, CMES1040, CMES1069, CMES1080 e CMES1141 apresentaram menor largura dos conídios, com média de 2,96 µm, com amplitude de 2,02 a 4,20 µm. Os demais isolados agruparam-se estatisticamente em grupos intermediários. No meio SNA não houve diferença estatística entre os isolados.

Para a relação comprimento/largura o isolado CMES1069 apresentou maior amplitude nos dois meios de cultura, variando de 6,85 a 12,78 µm no meio SNA e 6,52 a 12,71 µm no

meio BDA. O isolado CMES1141 também apresentou maior relação no meio BDA. O isolado 1075 apresentou menor relação nos dois meios, juntamente com os isolados CMES1080 e CMES1182 no meio SNA.

Os valores obtidos de comprimento, largura e relação comprimento/largura, para os isolados estudados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, como os obtidos por Ford et al. (2004) e Damm et al., (2009), para *C. truncatum* isolados de lentilha e soja, respectivamente.

Observou-se a formação de acérvulos, geralmente sobre massa estromática de coloração marrom escura a negra, com presença de setas. Os apressórios mostraram-se predominantemente truncados, elipsoidais e ovóides, com bordos inteiros ou ondulados, de coloração marrom e parede lisa (Figura 8). Esses apressórios foram produzidos de forma solitária, em cadeia ou em grupos. As dimensões médias dos apressórios variaram entre 6,9 μm a 18,47 μm para o comprimento e 4,13 μm a 10,03 μm para a largura.

Tabela 6 – Dimensões de conídios de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de soja

Dimensões						
BDA				SNA		
Isolados	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp/Larg (µm)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp/Larg (µm)
CMES286	20,7 d (16,57-27,71)	2,86 c (2,40-4,20)	7,35 b (5,26-9,79)	24,12 b (20,75-28.1)	3,23 a (2,69-4,09)	7,75 b (5,39-9,70)
CMES1034	22,77 b (16,88-25,97)	3,21 b (2,40-3,72)	7,18 b (5,94 10,35)	24,85 b (21,22-30,09)	3,03 a (2,05-3,57)	8,33 b (6,13-11,43)
CMES1040	22,46 b (18,68-25,82)	2,97 c (2,02-3,88)	7,47 b (5,54-11,50)	24,73 b (30,39 - 20,2)	3,18 a (2,51-3,97)	7,89 b (6,05-10,98)
CMES1059	22,98 b (16,35-25,64)	3,16 b (2,29-3,81)	7,37 b (5,16-9,83)	24,05 b (20,73-27,76)	3,16 a (2,49-3,89)	7,68 b (5,60-9,80)
CMES1069	24,55 a (23,11-29,53)	3,03 c (2,10-3,87)	8,17 a (6,52-12,71)	26,36 a (21,69-30,65)	3,26 a (2,13-3,21)	9,99 a (6,85-12,78)
CMES1075	20,54 d (14,52-24,61)	3,40 a (2,33-4,42)	5,98 c (4,17-8,12)	21,86 c (18,88-24,7)	3,36 a (2,25-4,29)	6,63 c (4,83-8,45)
CMES1076	24,78 a (21,84-27,66)	3,25 b (2,40-3,80)	7,01 b (5,01-10,90)	26,64 a (21,25-30,71)	3,44 a (2,49-4,09)	7,81 b (5,22-9,77)
CMES1080	21,90 c (15,93-25,85)	2,95 c (2,08-3,59)	7,53 b (5,83-11,50)	22,01 c (17,03-30,16)	3,28 a (2,56-4,37)	6,80 c (5,70-9,19)
CMES1141	22,77 b (18,70-26,80)	3,00 c (2,60-3,57)	8,13 a (6,76-10,82)	25,37 b (19,22-30,22)	3,21 a (2,63-4,88)	7,92 b (6,06-10,06)
CMES1182	22,01 c (18,8-27,70)	3,11 b (2,27-3,77)	7,17 b (5,56-10,04)	21,65 c (17,03-30,32)	3,27 a (2,65-4,37)	6,68 c (4,88-9,22)
CV %	9,11	11,24	17,10	10,94	11,17	15,95

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 8 – Isolado CMES1034 de *Colletotrichum truncatum* de soja cultivado em meio SNA. a: acérvulos; b: acérvulo e conídios c: setas e conídios, d-e: conídios, f-e: apressórios. Barra: a = 100 µm; b=10 µm, c-f=10 µm

2.3.4 Caracterização Patogênica

Foi possível observar diferenças na agressividade entre os isolados testados, nos dois métodos de inoculação empregados. Analisando-se os valores referentes ao comprimento de lesões nas plântulas, o experimento utilizando palito de dente mostrou, na primeira repetição do ensaio, o isolado CMES1059 se destacando dos demais, apresentando comprimento de lesão estatisticamente superior. No mesmo ensaio o isolado CMES1076 apresentou o menor comprimento de lesão. Os demais isolados mostraram comportamento intermediário. A segunda repetição do ensaio mostrou maior amplitude de variação na patogenicidade e os isolados foram agrupados em 5 grupos, de acordo com a análise estatística. O isolado mais agressivo foi o CMES1080, seguido pelos isolados CMES1075 e CMES1059. Os isolados CMES 286, CMES 1040, CMES 1069 mostraram comportamento intermediário e os isolados CMES 1034, CMES 1076, CMES 1141 e CMES 1182 foram os menos agressivos (Tabela 7).

O ensaio utilizando a metodologia da inoculação das sementes com restrição hídrica também permitiu classificar com segurança o grau de patogenicidade dos isolados. Os isolados CMES1075 e CMES1080 foram os mais agressivos para as três variáveis avaliadas, inclusive resultando em 0% de sobrevivência de plântulas (Tabela 8), sugerindo que esses dois isolados podem acarretar perda total no stand de plantas. Esses resultados para esses dois isolados coincidem com a segunda repetição do ensaio com inoculação por palitos colonizados (Tabela 7), indicando concordância entre os dois métodos de inoculação. Entretanto, quando se consideraram os isolados menos agressivos, não houve concordância entre os dois métodos. Diferentemente do método com os palitos, na inoculação das sementes os isolados CMES1040 e CMES1069 foram os menos agressivos para as três variáveis avaliadas.

Por meio dos testes complementares de germinação e sanidade das sementes inoculadas pelo método da restrição hídrica, foi possível confirmar os resultados obtidos nos testes anteriores, como pode ser visto na tabela 9. No entanto provavelmente devido às condições mais favoráveis para o desenvolvimento do fungo nesses testes, principalmente em relação à alta umidade, houve amplitude de resultados maior que a prevista, resultando em maior número de isolados altamente agressivos.

Para os isolados CMES 286, CMES 1059, CMES1075, CMES1080 e CMES 1182 os testes de germinação mostram 100% das plântulas infectadas. Os isolados CMES 1040, CMES 1069, CMES 1076, CMES 1141, se mostraram menos patogênicos, como já evidenciado nos testes anteriores, resultando em maior porcentagem de plântulas normais, mesmo com a infecção do fungo. Este fato evidencia que tais plantas fisiologicamente normais, porém infectadas, podem servir de fonte de inóculo da doença nos campos de produção. Não houve diferença estatística entre os tratamentos para sementes mortas, segundo o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (Tabela 9). Apenas a testemunha apresentou alta porcentagem de plântulas normais e não infectadas. Os isolados CMES 286, CMES 1059, CMES 1075 e CMES 1080 e CMES 1182 apresentaram valor de 0%, indicando 100% das plântulas inoculadas anormais e infectadas, os demais isolados apresentaram valores abaixo de 50%.

O teste de sanidade mostrou alta porcentagem de sementes infectadas, apresentando valores superiores a 85 %. Para os isolados CMES 286, CMES 1059, CMES1075, CMES 1080 e CMES 1141, 100% das sementes foram infectadas, com alta taxa de transmissão, indicando grande capacidade de infecção das sementes.

A principal forma de disseminação de *C. truncatum* é pelas sementes e pode resultar em infecção sistêmica das plantas (NEERGARD, 1979). O patógeno pode sobreviver em restos culturais, e várias espécies de ervas daninhas também podem servir como fontes de inóculo (SINCLAIR, 1989; HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986). A infecção pelo fungo reduz a qualidade das sementes, afetando seu vigor e germinação, causando danos em pré-emergência e pós-emergência, como damping-off, reduzindo o stand final das plantas. (SINCLAIR, 1989).

Os métodos até então conhecidos para inocular fungo fitopatogênicos em sementes revelam baixa eficiência para a obtenção de índices desejáveis de infecção, e em sua maioria, consistem de imersão de sementes em suspensão de esporos ou exposição das sementes à colônia fúngica por contato em determinado período de tempo. No entanto, estes métodos apresentam limitações que inviabilizam o uso das sementes para a sua posterior utilização em testes futuros (CARVALHO, 1999).

A restrição hídrica modifica as condições originais do meio onde, e a emergência da radícula ocorre quando o conteúdo de água da semente atinge um platô, que depende de um potencial hídrico de equilíbrio específico entre a semente e o meio externo. As condições favoráveis ao condicionamento osmótico variam amplamente em função das características das sementes de cada espécie e cultivar, e possivelmente, entre lotes de um mesmo cultivar, em função dos processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos (BRADFORD, 1986).

De acordo com Carvalho (1999), o uso da restrição hídrica em meio BDA com manitol foi eficaz para inocular *C. lindemuthianum* em sementes de feijão, com período relativamente elevado de exposição das sementes ao inóculo do fungo, sem contudo ocorrer germinação das sementes. Além disso, o meio foi capaz de estimular o crescimento radial das colônias do referido fungo.

Os resultados obtidos no experimento com palito de dente e no experimento de inoculação das sementes utilizando a restrição hídrica indicaram variação nos graus de patogenicidade dos isolados analisados. Os isolados 1080 e 1075 mostraram comportamento semelhantes em todos os testes realizados, sugerindo serem os mais agressivos dentre a população estudada, com capacidade de causar o maior comprimento de lesão na haste além de influenciar na geminação das sementes inoculadas, com alta infecção e taxa de transmissão.

Tais isolados apresentaram diferenças em nível molecular que os classificaram em subclados distintos na árvore filogenética, bem como a haplótipos pertencentes a grupos diferentes. Da mesma forma, se considerarmos os isolados CMES1040 e CMES1069,

revelados como menos agressivos pelo método de inoculação das sementes, verifica-se que também foram agrupados em subclados distintos pela análise molecular e grupos diferentes na rede de haplótipos. Inclusive, os isolados CMES1080 (mais agressivo) e CMES1069 (menos agressivo), agruparam-se no mesmo subclado na árvore filogenética e no mesmo grupo de haplótipos. Esses resultados sugerem que a variação genética observada entre os isolados não está ligada à variação patogênica, provavelmente porque as regiões genômicas analisadas não desempenham papel importante na capacidade de causar doença pelos isolados.

Tabela 7— Inoculação dos isolados de *Colletotrichum truncatum* na soja, utilizando palito de dente colonizados

Isolados	1º Ensaio	2º Ensaio
	Comprimento da Lesão (mm)	Comprimento da Lesão (mm)
Testemunha	3,65 d	1,99 f
CMES 286	8,25 b	7,68 d
CMES1034	7,47 b	5,90 e
CMES1040	8,88 b	7,99 d
CMES1059	11,9 a	8,87 c
CMES1069	7,99 b	7,22 d
CMES1075	7,87 b	10,12 b
CMES1076	6,21 c	6,47 e
CMES1080	7,83 b	11,00 a
CMES1141	8,00 b	5,96 e
CMES1182	8,21 b	6,06 e
CV%	8,90	7,34

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8 –Variáveis relativas à germinação de sementes de soja da variedade BMX Potência quando inoculadas com *Colletotrichum truncatum* pelo método da restrição hídrica

1° Ensaio				2° Ensaio		
Isolados	Velocidade de emergência	Porcentagem de emergência	Porcentagem de sobrevivência	Velocidade de emergência	Porcentagem de emergência	Porcentagem de sobrevivência
Test	6,57 a	100 a	100 a	6,56 a	100 a	100 a
CMES 286	1,13 e	17 d	4 e	2,38d	35 d	10 d
CMES 1034	4,54 c	90,5 a	86,5 b	5,72 b	98 a	95 a
CMES 1040	5,07 b	90 a	88 b	5,58 b	95 a	95 a
CMES 1059	2,04 e	33,5 c	11,5 d	1,90 d	30 c	2,5 e
CMES 1069	5,71b	88,5 a	85,5 b	6,08 a	96 a	90 a
CMES 1075	0,2 f	3,5 e	0 e	0,39 e	5 e	0,5 e
CMES 1076	5,26 b	82,5 b	76 c	5,49 b	90 a	80 b
CMES 1080	0,04 f	0,5 e	0 e	0,25 e	2 e	0 e
CMES 1141	3,46 d	75 b	72,5 c	3,72 c	85 a	75 b
CMES 1182	1,58 e	32 c	9,5 d	2,44d	50 c	10 d
CV%	18,09	12,63	10,59	9,93	13,35	8,89

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Variáveis relativas à germinação e sanidade de sementes de soja da variedade BMX Potência quando inoculadas com *Colletotrichum truncatum*, utilizando rolo de papel filtro e blotter-test

Trat	Germinação				Sanidade	
	Porcentagem de Pl. infect.	Porcentagem de Pl. normais	Porcentagem de Pl. anormais	Porcentagem de Sementes mortas	Porcentagem de incidencia	Porcentagem de Taxa de transmissão
		Infect.	Não infect.			
Test	0 f	0 a*	90 a*	7,5 c*	2,5	0 c
286	100 a	41 b	0 f	55 b	4,5	100 a
1034	53 e	39 b	47 b	8 c	6,5	87 b
1040	84,50 c	62 a	16 d	17 c	6,0	98 a
1059	100 a	16 c	0 f	78 a	6,5	100 a
1069	74,50 d	49 b	26 c	20 c	5,5	89 b
1075	100 a	32 b	0 f	58 b	11	100 a
1076	90 b	76 a	10 e	8 c	6,5	89 b
1080	100 a	2 c	0 f	92 a	6,5	100 a
1141	94 b	75 a	6 e	13 c	4,5	100 a
1182	100 a	18 c	0 f	72 a	10,5	99 a
CV%	6,58	12,3	10,5	15,0	18,3	3,70

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

3 CONCLUSÕES

- A filogenia molecular dos isolados de *Colletotrichum* evidenciou ocorrência apenas da espécie *C. truncatum* associada à cultura da soja na coleção de isolados estudada.
- A análise da variabilidade intraespecífica mostrou alto grau de variação genética na coleção de isolados de *C. truncatum* estudada.
- Foi encontrada grande variabilidade cultural, morfológica e patogênica entre os isolados estudados.
- As variabilidades genética, cultural, morfológica e patogênica encontrada na população de *C. truncatum* estudada não foi correlacionada com a origem geográfica dos isolados.

REFERÊNCIAS

- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St Paul, n. 5, v. 93 p.579-587, 2003.
- ALMEIDA A.M.R.; FERREIRA L.P.; YORINORI J.T.; SILVA J.F.V.; HENNING, A.A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A, REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, 2005. v. 2, cap.61 p. 569-588.
- ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., de ALONSO S.K., SCORTCHINI, M. Extração de proteínas para Eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Editora UFV: Viçosa. 1998.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MERSY, E.W., LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Zurich, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDRUS, C.F.; MOORE, W.D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans, **Phytopathology**, St. Paul, v. 25, n. 1, p.121-125, 1935.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. 388p.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992, p. 88–120.
- BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hortscience**, Alexandria, v.21, n.5, p.1105-1112, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009a. 200 p.
- BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1992.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; McKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 29, n. 1, p.183-204, 2009.
- CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematic. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum – host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 2000. Cap. 1, p. 1-20.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p. 181-213, 2012.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999, 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CERKAUSKAS, R.F.; DHINGRA, O.D; SINCLAIR, J.B. Effects of three desiccant-type herbicides on fruiting struc; DHINGRA, O.D; SINCLAIR, J.B. Effects of three desiccant type herbicides on fruiting structures of *Colletotrichum* and *Phomopsis*. Spp on soybean stems. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, n .6, p.620-622, 1983.

CHEN, L.S.; CHU, C.; LIU, C.D.; CHEN, R.S.; TSAY, J.G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal Phytopathology**, Malden, v. 154, n. 1, p.654-662, 2006.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: A computer program to stimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p.1657-1660, 2000.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas: soja**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 16 out. 2014.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORILDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.

CROUCH, J.A., CLARKE, B.B., WHITE, J.F. AND HILLMAN, B.I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p.717-732, 2009a.

CROUCH, J.A., TREDWAY, L.P., CLARKE, B.B. AND HILLMAN, B.I. Phylogenetic and population genetic divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. **Molecular Ecology**, Malden, v. 18, n. 1, p.123-135, 2009b.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J.M.; HYWEL-JONES, N.L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaero pedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.50, p. 415–430, 2004.

DAMM, U., WOUDEBERG, J.H.C., CANNON, P.F., CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 39, n. 1, p. 45-87, 2009.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 37-113, 2012.

EMBRAPA. Produtividade Safra 2012-2013. 2014. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=1&op_page=294>. Acesso em: 23 fev. 2014.

EMBRAPA. Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja/Fundação Mato grosso, 245p. 2000.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. Londrina, 2003. <Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/portancia.htm>>. Acesso em: 20 de maio 2013.

FAO. FAOSTAT. Rome, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 16 out. 2014.

FORD, R.; BANNINZA, C.; PHOTITA, W., TAYLOR, P.W.J. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. **Australasian Plant Pathology**, Camberra, v. 33, n. 1, p. 559–569, 2004.

FRARE, G.F. **Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros, em plantas daninhas**. 2011, 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY, D., FREEMAN, S., DICKMAN, M.B. (Eds.) ***Colletotrichum*: Host specificity, pathology and host-patogen interaction**. St. Paul: APS Press. p.131-144, 2000.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 1, p. 596-605, 1998.

GAWS, W.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W. (Ed.). **CBS course of mycology**. 5th ed. Utrecht: Centraal bureau voor Schimmel cultures, 2007. 242p.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORREL, J.C. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

GUNNEL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, New York, v. 84, n. 2, p.157-165, 1992.

HANG, H.C. First Report of *Colletotrichum chlorophyti* Infecting Soybean Seed in Arkansas, United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 11, p. 1510, 2013.

HARTMAN, G.L.; J.B. MANANDHAR, J.B.; SINCLAIR, Incidence of *Colletotrichum* spp. on soybeans and weeds in Illinois and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 1, p. 780-782, 1986.

HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN AND ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 183-189, 1998.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 754-755, 2001.

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

INDEXFUNGORUM, 2014. Disponível

em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=280780>>. Acesso em: 13 out. 2014.

KEELING, B.L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 1, p. 807-809, 1982.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Doenças da soja. In: ALMEIDA A.M.R.; FERREIRA L.P.; YORINORI J.T.; SILVA J.F.V.; HENNING, A.A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, 2005. v. 2, cap.61 p. 569-588.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 1451-1452, 2009.

MACHADO, A.Q.; CASSETI NETO, D. 2011. Antracnose da soja no cerrado: diagnose e controle. Boletim informativo nº 02. Disponível em: http://www.univag.edu.br/adm_univag/Modulos/Producoes_Academicas/arquivos/Boletim_Antracnose.pdf. Acesso em: 19 abr. 2013.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75, 2011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, n.1, v. 2, p. 176-177, 1962.

MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L. 1999. Anthracnose. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. & RUPE, J.C. Compendium of Soybean disease. 4rd American phytopathological Society. St. Paul, n. 1, v. 1, p. 13-14.

MANJOYO, D.A. **Determination of the variability of *Colletotrichum truncatum*, the causal agent of antracnose of soybean (*Glycine max* L. merr) em Zambia.** 1995. 75p. Dissertação (Mestrado em agronomia) – University of Zambia, Lusaka, 1995.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.S. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n 19, p. 4321-4325, 1980.

NEERGARD, P. (Ed.). **Seed Pathology.** 2th ed. London: MacMillan Press, 1979. 300p.

NIRENBERG, H.I. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft**, Dahlem, v. 169, n.1, p. 1-117, 1976.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.).** 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; DE SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 150, n. 1, p. 128-134, 2002.

PHOTITA, W.; TAYLOR, P.W.J.; FORD, R.; HYDE, K.D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plant in Thailand. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 18, n. 1, p.117-133, 2005.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 39, n, 1, p. 89-109, 2009.

RAID, R.N.; PENNYPARCHER, S.P. Weeds as host for *Colletotrichum coccodes*. **Plant Diseases**, Saint Paul, v. 71, n. 1, p. 643-645, 1987.

RAMBAUT, A. Figtree 3.1. Versão 1, 2009. Disponível em:
<<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>. Acesso em: 17 mar. 2009.

RAMOS, A.M.; FRANCO, T.L.; CINTO, I.; CARMONA, M.; GALLY, M. Molecular characterization of *Colletotrichum* species causing soybean anthracnose in Argentina. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 123, n. 9, p. 457-465, 2013.

RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G.L. First report of *Colletotrichum coccodes* on soybean in the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 8, p.959, 1998.

ROJAS, E.I.; REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J.; VAN BAELE, S.A.; HERRE, E.A.; CANNON, P.; CHEN, R.; PANG, J.; WANG, R.; ZHANG, Y.; PENG, Y.Q.; SHA, T.

- Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, New York, v. 102, n. 1, p. 1318-1338, 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 1572-1574, 2003.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SHARMA, G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B.D. Infra-specific diversity of *Colletotrichum truncatum* associated with chilli anthracnose in India based on microsatellite marker analysis. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 40, n. 20, p. 2509-2523, 2014.
- SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 39, n. 1, p. 111-122, 2009.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional ASSISTAT para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- SINCLAIR, J.B. (ED.). Compendium of soybean diseases. 3th ed. Saint Paul: The American phytopathological society, 1989. 389p.
- SREENIVASAPRASAD, S; SHARADA, K; BROWN, A.E.; MILLS, P.R.; PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, p. 650-655. 1996.
- SUTTON, B.C. (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A. and JEGGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxon: CAB International, p. 1-26.
- TAMURA K, DUDLEY J.; NEI, S.; KUMAR S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. Molecular Biology and Evolution, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III Cladogram estimation. **Genetics**, Bethesda, v. 132, n. 1, p. 619-633, 1992.
- THAN, P.P.; JEEWON, R.; HYDE, K.D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P.W.J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 562-572, 2008.
- VASCONCELOS, M.J.V; MACHADO, M.A.; ALMEIDA, A.M.R.; HENNING, A.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Differentiation of *colletotrichum truncatum* isolates by

random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 520-523. 1994.

WEIDEMANN, G.J.; TEBEEST, D.O.; CARTWRIGHT, R.D. Host Specificity of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aechynonebe* and *C. truncatum* in the Leguminosae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n.1, p. 986-990, 1988.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115-180, 2012.

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

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YORINORI, J.T. Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle. Circular Técnica: Embrapa Soja, n. 14, 1996.