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

***Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja: uma
comparação entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas**

Renata Aparecida dos Santos Brito

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2018**

Renata Aparecida dos Santos Brito
Engenheira Agrônoma

***Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja: uma comparação
entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas**

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

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

Brito, Renata Aparecida dos Santos

Colletotrichum truncatum, agente causal da antracnose da soja: uma comparação entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas / Renata Aparecida dos Santos Brito. - - Piracicaba, 2018.

79 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Glycine max* 2. *Colletotrichum truncatum* 3. Endófito 4. Sistemática
5. Patogenicidade 6. Resposta biónica 7. Controle I. Título

À minha amada e querida mãe, Lia, que no decorrer da minha vida sempre esteve e
estará ao meu lado, contribuindo para minha formação profissional e
desenvolvimento como ser humano.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo carinho, pela paciência e pelo incentivo.

À ESALQ e ao Departamento de Fitopatologia pela infraestrutura e a reconhecida excelência em ensino e pesquisa de seus docentes, possibilitando minha formação acadêmica e a realização deste trabalho.

Ao Prof. Nelson Massola pela atenção e orientação ao longo desses anos, permitindo meu desenvolvimento desde os meus primeiros momentos no doutorado.

Ao meu querido amigo Ricardo Felipini pelo companheirismo e disposição para compartilhar seus conhecimentos, contribuindo muito com esse trabalho. Gratidão por todas as nossas conversas e ensinamentos que me fizeram ser uma pessoa melhor hoje.

Aos colegas e amigos de trabalho pela ajuda, pelas discussões e pelo companheirismo. Em especial à Renata Linhares que com carinho, paciência e extrema dedicação sempre esteve disposta à contribuir, dividindo seus conhecimentos.

Aos professores Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, Dr. Jorge Alberto Marques Rezende e Dr. Francisco André Ossamu Tanaka pelo suporte no desenvolvimento desse trabalho.

Ao prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati por me orientar nas análises bioquímicas e por permitir que eu utilizasse os equipamentos e reagentes de seu Laboratório.

À Dra. Maria Heloisa Duarte de Moraes pela orientação e apoio nos ensaios com sementes.

À professora Dra. Maria Carolina Quecine Verdi pelo apoio, pelos ensinamentos e por me acolher tão bem em seu laboratório e permitir que fizesse uso dele.

Aos funcionários do Departamento, em especial ao Seu Pedro pelo apoio nos trabalhos em campo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos amigos da pós-graduação que me alegraram e deram forças dividindo alegrias e angústias, em especial às queridas Kelly Pazolini, Isabela Primiano, Rafaela Zázera e ao querido Wesler Marcelino.

Às minhas ex e atuais companheiras de república: C/pota, Diuva, Mônica e Katherine pelos excelentes momentos de convivência em nossa residência.

Aos amigos Lina, Ricardo e Sérgio pelos momentos felizes compartilhados.

À minha querida amiga Juliana Infante, futura fitopatologista, pelo apoio incondicional, pela amizade, pelo companheirismo e pela paciência. Gratidão por se fazer presente, sempre.

Aos jamais esquecidos e sempre presentes: K-paxão, C-tembrão, Kurik-k, Priscilla Moller, Grupo (Adans Colman e Diêgo Nogueira), Carlos Aucique, , Inorbert Lima, Sara Salcedo, Nilmara Caires, Raul Coutinho, Filipe Borel e Andreea, minha admiração e eterna gratidão.

Ao Dolores e ao Bar da Maria pelos momentos de descontração e alegria.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

*“Tenha coragem de seguir seu coração e intuição. De alguma maneira eles já sabem
o que você realmente quer se tornar.”*

Steve Jobs

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	13
2. COMPARAÇÕES GENÉTICA, FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA ENTRE ISOLADOS DE <i>C. TRUNCATUM</i> OBTIDOS DE PLANTAS ASSINTOMÁTICAS E SINTOMÁTICAS DE SOJA	15
RESUMO	15
ABSTRACT	15
2.1. INTRODUÇÃO	16
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.2.1. Amostragem e isolamento de <i>Colletotrichum truncatum</i> endofíticos e patogênicos	18
2.2.2. Identificação e determinação da diversidade genética	19
2.2.2.1. Extração de DNA.....	19
2.2.2.2. Análise da região ITS e de parte dos genes Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Histona 3 (HIS3) e β -tubulina(β -tub)	20
2.2.2.3. Análise da diversidade genética por meio do marcador IRAP	21
2.2.3. Taxa de crescimento micelial e esporulação in vitro dos isolados	22
2.2.4. Caracterização de conídios, porcentagem de germinação e formação de apressórios	23
2.2.5. Caracterização dos isolados por meio da avaliação de produção de enzimas hidrolíticas.....	23
2.2.5.1. Caracterização enzimática dos isolados usando o Sistema API-ZYM®.....	23
2.2.5.2. Produção de pectina liase	24
2.2.6. Pareamento de cultura e compatibilidade micelial.....	25
2.2.7. Avaliação da patogenicidade dos isolados de <i>C. truncatum</i>	25
2.2.7.1. Efeito de <i>C. truncatum</i> na qualidade sanitária e fisiológica das sementes	25
2.2.7.2. Efeito da inoculação de <i>C. truncatum</i> em sementes na emergência e produção	26
2.2.7.3. Teste de patogenicidade em plantas de soja	27
2.3. RESULTADOS	27
2.3.1. Filogenia e análise da diversidade genética	27
2.3.1.1. Análise filogenética com base na região ITS e de parte dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona 3 (HIS3) e β -tubulina (β -tub).....	27
2.3.1.1. Análise do marcador IRAP.....	33
2.3.2. Taxa de crescimento micelial e esporulação in vitro dos isolados	36
2.3.3. Caracterização de conídios, porcentagem de germinação e formação de apressórios	42
2.3.4. Caracterização dos isolados por meio da avaliação de produção de enzimas hidrolíticas.....	44
2.3.4.1. Caracterização enzimática dos isolados usando o Sistema API-ZYM®.....	44
2.3.4.2. Produção de pectina liase	45

2.3.5. Pareamento de cultura e compatibilidade micelial	47
2.3.6. Patogenicidade dos isolados de <i>C. truncatum</i>	48
2.3.6.1. Efeito de <i>C. truncatum</i> na qualidade sanitária e fisiológica das sementes, emergência e produção.....	48
2.3.6.2. Patogenicidade em plantas de soja.....	49
2.4. DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	55
3. RESPOSTAS BÍOQUÍMICAS DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS COM <i>COLLETOTRICHUM TRUNCATUM</i> ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO E CONTROLE DE MOFO BRANCO	61
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	61
3.1. INTRODUÇÃO.....	62
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.2.1. Aspectos bioquímicos de plantas de soja inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> endofítico e patogênico.....	64
3.2.1.1. Análises enzimáticas	65
3.2.1.1.1. Atividade de guaiacol peroxidases (POX) (EC 1.11.1)	65
3.2.1.1.2. Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5).....	65
3.2.1.1.3. Proteínas totais	66
3.2.1.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio	66
3.2.1.3. Quantificação de malondialdeído (MDA).....	66
3.2.2. Proteção de plantas de soja por <i>Colletotrichum truncatum</i> endofítico contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	67
3.3. RESULTADOS.....	67
3.3.1. Aspectos bioquímicos de plantas de soja inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> endofítico e patogênico.....	67
3.3.1.1. Análises enzimáticas	67
3.3.1.1.1. Atividade de guaiacol peroxidases (POX) (EC 1.11.1)	67
3.3.1.1.2. Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5).....	68
3.3.1.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio	69
3.3.1.3. Quantificação de malondialdeído (MDA).....	70
3.3.2. Proteção de plantas de soja por <i>Colletotrichum truncatum</i> endofítico contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	71
3.4. DISCUSSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

***Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose da soja: uma comparação entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas**

Colletotrichum truncatum tem sido amplamente estudado como fitopatógeno da soja. No entanto, diferentes isolados possuem diferentes graus de agressividade, podendo, inclusive, serem encontrados em plantas aparentemente sadias. Assim, primeiramente objetivou-se comparar isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja, a fim de identificar características que os diferenciasssem. Obtiveram-se 17 isolados de plantas assintomáticas e três de plantas doentes. Com os testes de patogenicidade, verificou-se que alguns isolados obtidos de plantas assintomáticas podem ser endofíticos e que outros causaram sintomas na parte aérea, com severidade variável, e afetaram a germinação e a emergência de plântulas obtidas a partir de sementes inoculadas. Na análise concatenada dos genes ITS, GAPDH, HIS3 e do gene β -tub verificou-se que isolados caracterizados como hipovirulentos e endofíticos foram alocados em um mesmo clado, assim como os mais agressivos também se agruparam. Na análise do marcador molecular IRAP não houve diferenças. Em meio SNA isolados mais agressivos tiveram menores taxas de crescimento, porém, esporulação em maiores quantidades, ao contrário, avirulentos e hipovirulentos. A germinação de conídios dos isolados agressivos foi maior quando comparada à dos isolados endofíticos e hipovirulentos, assim como a porcentagem de conídios formando apressório. Em relação à atividade enzimática *in vitro*, não foi possível a diferenciação dos isolados com diferentes graus de patogenicidade utilizando-se sistema API-ZYM® e todos os isolados obtidos produziram as enzimas esterase, esterase-lipase, fosfatase ácida e a naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Para a atividade de pectina-liase, isolados mais agressivos produziram menos pectina liase que os não agressivos. A partir da identificação dos dois estilos de vida, selecionou-se um isolado endofítico e um patogênico para verificar a capacidade de *C. truncatum* endofítico ativar o sistema de defesa de plantas de soja e conferir proteção contra a antracnose e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Para tanto, plantas de soja foram inoculadas com os isolados endofítico patogênico de *C. truncatum*, separadamente. Um outro tratamento consistiu da pré-inoculação do endofítico, seguido do patogênico. Avaliou-se a atividade de proteínas relacionadas à patogênese – PR-proteínas (peroxidases - POX e fenilalanina amônia-liase-FAL) e da quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Plantas de soja foram pré-inoculadas com o endofítico seguido de inoculação de *S. sclerotiorum* após cinco dias, sendo avaliada a severidade do mofo branco após 10 dias da inoculação do mesmo. Plantas pré-inoculadas com *C. truncatum* endofítico e desafiadas com o *C. truncatum* patogênico tiveram aumento da atividade de POX e da FAL e da quantidade de H_2O_2 . Quando inoculados separadamente, endofítico e patogênico não foram capazes de aumentar a atividade ou quantidade dessas moléculas. Demonstrou-se redução de mais de 88% na severidade do mofo-branco em plantas de soja pré-inoculadas com isolado endofítico. A redução da doença pode ser devido a capacidade dessas plantas em aumentar a resposta de defesa mais rapidamente e em níveis maiores do que quando expostas ao endofítico isoladamente.

Palavras-chave: Endofitismo; *Glycine max*; Sistemática; Resposta bioquímica

ABSTRACT

***Colletotrichum truncatum*, the causal agent of anthracnose of soybean: a comparison of isolates obtained from asymptomatic and symptomatic plants**

Colletotrichum truncatum has been widely studied as soybean pathogen. However, different isolates have different degrees of aggressiveness, and it can even be found in apparently healthy plants. Thus, the first objective was to compare isolates of *C. truncatum* from asymptomatic and symptomatic soybean plants, in order to identify characteristics that differentiate them. Seventeen asymptomatic plant isolates and three diseased plants were obtained. From the pathogenicity tests, it was verified that some isolates obtained from asymptomatic plants could be endophytic and others caused symptoms in the aerial part, with variable severity, and affected the germination and emergence of seedlings obtained from inoculated seeds. In the concatenated analysis of the genes ITS, GAPDH, HIS3 and β -tub gene, it was verified that the isolates characterized as hypovirulent and endophytic were allocated in the same clade, as well as the more aggressive were also grouped. In the analysis of the molecular marker IRAP there were no differences. In the SNA (Synthetic - Poor in Nutrient - Agar) medium, the aggressive isolates had the lowest growth rates, however, they had higher sporulation. The endophytic and hypovirulent ones had higher rates of mycelial growth and less sporulation in vitro. The germination of conidia and the percentage of conidia forming appressory of the aggressive isolates was higher when compared to the endophytic and hypovirulent isolates. In relation to the enzymatic activity in vitro, it was not possible to differentiate the isolates with different degrees of pathogenicity using the API-ZYM® system. Furthermore, all the isolates obtained produced the enzymes esterase, esterase-lipase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. For pectin-lyase activity, isolates that are more aggressive produced less lyase pectin than non-aggressive pectin. From the identification of the two lifestyles, an endophytic and pathogenic isolate were selected to verify the ability of *C. truncatum* to activate the soybean defense system and to protect soybean plants against anthracnose and white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). For that, soybean plants were inoculated with an endophytic, a *C. truncatum* pathogenic, and an endophytic followed by the inoculation of the pathogen after 5 days. These plants were evaluated for the activity of proteins related to the pathogenesis - PR-proteins (peroxidases - POX and phenylalanine ammonia-lyase-FAL), the amount of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA). Soybean plants were pre-inoculated with the endophytic followed by inoculation of *S. sclerotiorum* after five days, and the severity of the white mold was evaluated after 10 days of inoculation. Plants pre-inoculated with endophytic *C. truncatum* and challenged with pathogenic *C. truncatum* had increased POX and FAL activity and the amount of H₂O₂. When inoculated separately, endophytic and pathogenic were not able to increase the activity or quantity of these molecules. There was a reduction of more than 88% in the severity of white mold in soybean plants preinoculated with endophytic isolate. The reduction of the disease may be due to the ability of these plants to increase the defense response more rapidly and at higher levels than when exposed to the endophyte alone.

Keywords: Endophytism; *Glycine max*; Systematic; Biochemical response

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*) é a principal oleaginosa cultivada no mundo e de acordo com levantamento realizado pela USDA (2018), na safra de 2017/2018, foram produzidas mundialmente 336,7 milhões de t, das quais 35 % (116,9 milhões de t) se devem ao Brasil, o segundo maior produtor mundial atrás apenas dos EUA com 119,5 milhões de t. No entanto, esses rendimentos poderiam ser maiores caso a cultura não fosse afetada por diversos problemas fitossanitários, como doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides.

Dentre as doenças fúngicas, a antracnose, causada por *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore, está entre as mais importantes que acometem a cultura da soja (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Os maiores danos ocorrem em regiões com altas temperaturas e prolongados períodos de chuva (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). No Brasil, é considerada uma das principais doenças do cerrado. A doença tem sido favorecida pela monocultura, pela semeadura direta e pelo plantio adensado, sendo capaz de causar perdas da ordem de 90 kg.ha⁻¹ de grãos de soja a cada incremento de 1 % na sua incidência (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Colletotrichum truncatum é um fitopatógeno de ampla distribuição geográfica e de inúmeros hospedeiros, como feijão (*Phaseolus vulgaris*), amendoim (*Arachis hypogea*), alfafa (*Medicago sativa*), pimentão (*Capsicum annuum*) e pimenta (*C. frutescens*) (CAI L et al., 2009). Esse fungo pode infectar plantas de soja durante todo o ciclo da cultura. Quando infecta a semente, pode impedir a germinação ou causar a morte de plântulas. Em plântulas que chegam a emergir, podem ocorrer manchas necróticas deprimidas e de coloração escura nos cotilédones. Outros sintomas comuns são necrose nos pecíolos, manchas-marrons irregulares nas folhas, hastes e vagens e desfolha prematura. Vagens que são infectadas no início da formação podem não produzir sementes e, em casos de infecção tardia, a qualidade das sementes pode ser afetada (GODOY et al., 2016; MANANDHAR; HARTMAN, 1999).

O ciclo de vida desse patógeno se inicia com a infecção primária, ocorrendo germinação de esporos, desenvolvimento de apressórios, formação de hifa de penetração, colonização do tecido hospedeiro pelas hifas e produção de acérvulo e de esporos. Durante o ciclo da cultura ocorrem as infecções secundárias com produção de novos acérvulos e esporos que são disseminados pelos respingos de chuva ou água de irrigação (AGRIOS, 2005; MANANDHAR et al., 1985).

As principais fontes de inóculo de *C. truncatum* são sementes infectadas, restos culturais e hospedeiros alternativos infectados. Deste modo, o manejo da antracnose se baseia,

essencialmente, na eliminação/redução dessas fontes de inóculo por meio do uso de sementes saudáveis, aplicação de fungicidas, rotação de cultura, eliminação de hospedeiros alternativos e menor densidade do plantio (GODOY et al., 2016; MANANDHAR; HARTMAN, 1999; SCHNEIDER et al., 1974). Caso essas medidas não sejam adotadas a doença pode se alastrar rapidamente dificultando ainda mais o seu controle.

Apesar da importância como fitopatógeno, isolados de *C. truncatum* demonstraram possuir alta variabilidade genética e diferentes níveis de agressividade (ROGÉRIO et al., 2017). Ainda, outros autores demonstraram que a infecção pode permanecer latente nos estágios vegetativos da planta (CERKAUSKAS; SINCLAIR, 1982; MANANDHAR; HARTMAN, 1999; SINCLAIR, 1991), supondo, inclusive, que alguns deles não seriam de fato patogênicos, mas sim endofíticos (KLINGELFUSS; YORINORI, 2001; LEITE et al., 2013; PIMENTEL et al., 2006), pois mesmo em plantas mais velhas já infectadas os sintomas típicos de antracnose não se desenvolveram (PIMENTEL et al., 2006).

Microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam tecidos internos do hospedeiro sem causar dano aparente, incluindo também aqueles que possuem uma fase epifítica ou são patógenos latentes vivendo de forma assintomática em seus hospedeiros (PETRINI, 1991). Embora infecções, ainda que assintomáticas, possam prejudicar o desenvolvimento da planta, tal como *C. musae* ao diminuir a eficiência fotossintética da bananeira (PINTO et al., 2000), há evidências de que fungos endofíticos reduziram danos e perdas causados por patógenos e que estirpes de fungos avirulentas ou hipovirulentas poderiam colonizar nichos de infecção em superfícies de plantas, protegendo-as das respectivas estirpes patogênicas (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SNEH, 1998). Diante do exposto, e do fato de que pouco se sabe sobre os isolados de *C. truncatum* endofíticos à soja, o trabalho foi delineado a fim de contribuir ao conhecimento sobre os seus diferentes fenótipos bem como testar a hipótese de sua atuação benéfica na planta.

Na primeira parte deste trabalho, os isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja são caracterizados a partir da análise filogenética e do uso do marcador molecular IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) para avaliar a variabilidade genética dentro dessa espécie. A morfologia, a taxa de crescimento, a esporulação e a formação de apressórios, bem como a atividade enzimática *in vitro* também foram comparados entre os isolados. Faz-se presente, ainda, a avaliação da patogenicidade e o efeito de *C. truncatum* na qualidade de sementes e produção de grãos de soja.

Na parte seguinte, apresentam-se as respostas bioquímicas das plantas após a inoculação de um isolado endofítico e um patogênico, selecionados com base nos resultados das análises presentes no capítulo anterior. E por fim, demonstra-se a capacidade do isolado endofítico em diminuir a severidade do mofo branco em soja, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

Referências

- AGRIOS, G. N. Anthracnose Diseases caused by Ascomycetes and Deuteromycetes (Mitosporic fungi). In: AGRIOS, G. N. (Ed.). . **Plant Pathology**. 5. ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2005. p. 483–500.
- CAI L et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CERKAUSKAS, R. F.; SINCLAIR, J. B. Effect of paraquat on soybean pathogens and tissues. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, n. 3, p. 495–502, 1982.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 18–23, 2016.
- FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5104, p. 75–78, 1993.
- GODOY, C. et al. Doenças da Soja. In: AMORIN, L. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2016. p. 657–676.
- KLINGELFUSS, L.; YORINORI, J. Latent infection by *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* in soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158–164, 2001.
- LEITE, T. S. et al. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 56–69, 2013.
- MANANDHAR, J. et al. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, v. 75, p. 704–708, 1985.
- MANANDHAR, J.; HARTMAN, G. Anthracnose. In: HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. (Eds.). . **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul, MN: APS Press, 1999. p. 13–14.

- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 179–197.
- PIMENTEL, I. C. et al. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705–711, 2006.
- PINTO, L. S. R. C. et al. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, v. 147, n. 3, p. 609–615, 2000.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: Who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, v. 151, n. 3, p. 705–716, 2001.
- ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402–415, fev. 2017.
- SCHNEIDER, R. W. et al. *Colletotrichum truncatum* borne within the seedcoat of soybean. **Phytopathology**, v. 64, n. 1, p. 154–155, 1974.
- SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, v. 75, n. 3, p. 220–224, 1991.
- SNEH, B. Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogen. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 1, p. 1–32, 1998.
- USDA. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**WASDE. Washington,DC: [s.n.].

2. COMPARAÇÕES GENÉTICA, FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PATOGENICA ENTRE ISOLADOS DE *C. TRUNCATUM* OBTIDOS DE PLANTAS ASSINTOMÁTICAS E SINTOMÁTICAS DE SOJA

RESUMO

Colletotrichum truncatum tem sido amplamente estudado como patógeno da soja, causando a antracnose. No entanto, sabe-se que *C. truncatum* tem alta variabilidade genética e que diferentes isolados exibem distintos graus de agressividade, podendo, inclusive, serem encontrados em plantas aparentemente saudáveis. Assim, esse trabalho objetivou comparar isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja por meio de análise filogenética e do uso do marcador molecular IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism); comparar a morfologia, a taxa de crescimento, a esporulação e a formação de apressórios, bem como a atividade enzimática *in vitro* também foram comparados entre os isolados. E por fim, a avaliação da patogenicidade e o efeito de *C. truncatum* na qualidade de sementes e produção de grãos de soja. Obtiveram-se 17 isolados de plantas assintomáticas e três de plantas doentes. Com os testes de patogenicidade, verificou-se que alguns dos isolados obtidos de plantas assintomáticas podem ser endofíticos, pois não causaram sintomas de antracnose quando reinoculados em plantas de soja, sendo possível também o reisolamento a partir de folhas assintomáticas. No entanto, outros isolados de plantas assintomáticas causaram sintomas na parte aérea, com severidade variável, e afetaram a germinação e a emergência de plântulas obtidas a partir de sementes inoculadas. Na análise concatenada dos genes ITS, GAPDH e HIS3, houve formação de três subclados, todos esses com isolados obtidos tanto de plantas assintomáticas quanto de sintomáticas. Ao analisar alguns desses isolados com a inclusão do gene β -tub e correlacionando-os com a agressividade dos mesmos, foi possível verificar que isolados caracterizados como hipovirulentos e endofíticos foram alocados em um mesmo clado, assim como os mais agressivos também se agruparam. Na análise do marcador molecular IRAP não se verificaram diferenças entre os isolados endofíticos e patogênicos. Em meio SNA (Sintético - Pobre em Nutriente-Ágar) isolados mais agressivos tiveram as menores taxas de crescimento, porém, esporulação em maiores quantidades. Ao contrário dos avirulentos e hipovirulentos, que tiveram maiores taxas de crescimento micelial e menor esporulação *in vitro*. A germinação de conídios dos isolados agressivos foi maior quando comparada à dos isolados endofíticos e hipovirulentos, assim como a porcentagem de conídios formando apressório. Em relação à atividade enzimática *in vitro*, não foi possível a diferenciação dos isolados com diferentes graus de patogenicidade utilizando-se sistema API-ZYM® e todos os isolados obtidos produziram as enzimas esterase, esterase-lipase, fosfatase ácida e a naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Para a atividade de pectina-liase, isolados mais agressivos produziram menos pectina liase que os não agressivos. Assim, nesse estudo, foi possível verificar dois estilos de vida dentro da espécie *C. truncatum*: endofítico e patogênico, este último causando severidade variável.

Palavras-chave: Endofitismo; *Glycine max*; Sistemática; Diversidade

ABSTRACT

Colletotrichum truncatum has been widely studied as pathogen of soybean, by causing anthracnose. However, *C. truncatum* has high genetic variability and different isolates exhibit different degrees of aggressiveness, and it can even be found in apparently healthy plants. Thus, this work aimed to compare genetic, physiological, biochemical and pathogenic characteristics of *C. truncatum* isolates obtained from asymptomatic and symptomatic soybean plants. The isolates were compared by phylogenetic analysis and the use of the molecular marker IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism); by comparing morphology, growth rate, sporulation and apressory formation, as well as *in vitro* enzymatic activity, pathogenicity and the effect of *C.*

truncatum on seed quality and soybean yield. Seventeen asymptomatic plant isolates and three diseased plants were obtained. From the pathogenicity tests, it was verified that some of the isolates obtained from asymptomatic plants could be endophytic, since they did not cause symptoms of anthracnose when they were reinoculated in soybean plants, being possible also the reisolamento from asymptomatic leaves. However, other isolates of asymptomatic plants caused symptoms, with variable severity, and they affected the germination and emergence of seedlings obtained from inoculated seeds. In the concatenated analysis of the ITS, GAPDH and HIS3 genes, three subclades were formed, all with isolates obtained from both asymptomatic and symptomatic plants. Some of these isolates were analyzed with the inclusion of the β -tub gene and the isolates, which were characterized as hypovirulent and endophytic, were allocated in the same clade, as well as the more aggressive ones were also grouped. In the analysis of the molecular marker IRAP there were no differences between the endophytic and pathogenic isolates. In the SNA (Synthetic - Poor in Nutrient - Agar) medium, the aggressive isolates had the lowest growth rates, however, they had higher sporulation. The endophytic and hypovirulent ones had higher rates of mycelial growth and less sporulation in vitro. The germination of conidia and the percentage of conidia forming appressory of the aggressive isolates was higher when compared to the endophytic and hypovirulent isolates. In relation to the enzymatic activity in vitro, it was not possible to differentiate the isolates with different degrees of pathogenicity using the API-ZYM® system. Furthermore, all the isolates obtained produced the enzymes esterase, esterase-lipase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. For pectin-lyase activity, isolates that are more aggressive produced less lyase pectin than non-aggressive pectin. Thus, in this study, it was possible to verify two lifestyles within the *C. truncatum* species: endophytic and pathogenic, the last one causing variable severity.

Keywords: Endophytism; *Glycine max*; Systematic; Diversity

2.1. Introdução

Pesquisas sobre interação fungos-planta têm enfatizado patossistemas que afetam o crescimento e a produtividade de plantas, como *C. truncatum* que tem sido extensivamente estudado como fitopatógeno da soja, causando a antracnose. No entanto, sabe-se que *C. truncatum* tem alta variabilidade genética e que diferentes isolados exibem distintos graus de agressividade (ROGÉRIO et al., 2017), podendo, inclusive, ser encontrados em plantas aparentemente sadias (CERKAUSKAS; SINCLAIR, 1982; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001; LEITE et al., 2013; PIMENTEL et al., 2006), o que faz com que o mesmo também seja considerado um endofítico.

Há relatos na literatura de que nos estádios vegetativos, a infecção por *C. truncatum* pode permanecer latente e os sintomas de antracnose em soja só aparecerem quando as condições de temperatura e umidade são favoráveis ao desenvolvimento da doença (CERKAUSKAS; SINCLAIR, 1982; MANANDHAR; HARTMAN, 1999; SINCLAIR, 1991), porém trabalhos já evidenciaram que mesmo em plantas mais velhas o fungo permaneceu assintomático (PIMENTEL et al., 2006). Estudos com *C. truncatum* em pimentões sugerem, ainda, que o mesmo tenha breve fase assintomática após a infecção inicial e antes do desenvolvimento necrotrófico, colonizando o fruto de forma subcuticular

intramural (AUYONG; FORD; TAYLOR, 2012; RANATHUNGE; SANDANI, 2016). Observa-se, portanto, que as informações sobre *C. truncatum* endofítico são muito limitadas e o estilo de vida dessa espécie em plantas de soja permanece desconhecido.

Durante muito tempo, a antracnose foi diagnosticada a partir de características morfológicas do fungo em especificidade ao hospedeiro, o que é insuficiente quando se deseja diferenciar, de forma confiável, as espécies e fenótipos de *Colletotrichum* spp. Isso porque tem se observado alta variabilidade, inter e intraespecíficas dos caracteres morfológicos e, a ocorrência de formas intermediárias, que é comum pela influência do ambiente na expressão desses caracteres (CANNON et al., 2012). Devido à semelhança morfológica com *C. graminicola* e *C. dematium*, que também podem estar associados à antracnose na soja, a identificação de *C. truncatum* torna-se complicada. Nestes, os acérvulos se apresentam como setas escuras e septadas enquanto os conídios, produzidos em conidióforos eventualmente ramificados próximo à base, caracterizam-se por serem unicelulares, hialinos, fortemente curvados e fusiformes com extremidades afiladas (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Adicionalmente, ressalta-se que *C. capsici*, outra espécie fitopatogênica de conídios curvos, e *C. truncatum* foram recentemente sinonimizados, sendo distinguidos de acordo com o hospedeiro e a região de ocorrência (HYDE et al., 2009). Assim, o estudo sistemático de *Colletotrichum* spp. deve ser baseado em análise conjunta de filogenia multigênica e caracteres polifásicos reconhecíveis, como morfologia, fisiologia, patogenicidade e características culturais (CAI L et al., 2009).

Atualmente, técnicas moleculares têm sido muito utilizadas, proporcionando grandes avanços na caracterização de microrganismos e consolidando conhecimentos referentes à sua variabilidade genética. Com o uso de marcadores moleculares tem sido possível avaliar os níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e interespecíficas de *Colletotrichum* spp., correlacionando variações fenotípicas e genotípicas (CAI L et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009).

Um dos mecanismos que produz variabilidade genética em fungos e, portanto, pode ser utilizado como marcador molecular, é a atividade de elementos transponíveis (ET). ET ou genes saltitantes são sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma (DABOUSSI; CAPY, 2003). IRAP (Inter-RetrotransposonAmplifiedPolymorphism) é um exemplo de marcador baseado em retrotransposons, sendo um dos mais utilizados em estudos de variabilidade genética. Para *Colletotrichum* spp. e *C. gloeosporioides*, os ETs CgT1 (HE et al., 1996) e Cgret(ZHU; OUDEMANS, 2000) foram usados para o estudo da estrutura populacional e dinâmica do genoma e para o estudo da sua evolução. SANTOS et al. (2012)

desenvolveram marcadores IRAP para estudar a diversidade intra e interespecíficas dentro do gênero *Colletotrichum* e demonstrou que *C. lindemuthianum* tem alta diversidade genética e que 51% da variabilidade são encontrados entre as populações de diferentes raças. Ainda, *C. lindemuthianum* endofítico foi distinguido rapidamente de outras espécies *Colletotrichum* spp. em feijoeiro por meio dos marcadores IRAP (GONZAGA et al., 2015). Entretanto, poucos estudos foram feitos a fim de comparar a variabilidade genética entre isolados com diferentes graus de patogenicidade.

Nesse contexto, pretende-se realizar comparações genética, fisiológica, bioquímica e patogênica entre isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja. Especificamente, objetivou-se:

- i. Avaliar a relação filogenética e a variabilidade genética por meio dos marcadores moleculares IRAP (Inter-RetrotransposonAmplifiedPolymorphism), entre isolados de *C. truncatum* de soja;
- ii. Comparar os isolados de *C. truncatum* de soja quanto a morfologia, taxa de crescimento, esporulação e formação de apressório;
- iii. Comparar a atividade enzimática *in vitro* dos isolados de *C. truncatum* de soja;
- iv. Avaliar a patogenicidade de isolados de *C. truncatum* em plantas de soja;
- v. Avaliar o efeito de *C. truncatum* na qualidade da semente e produção de grãos de soja.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Amostragem e isolamento de *Colletotrichum truncatum* endofíticos e patogênicos

Para obtenção de isolados endofíticos, plantas de soja aparentemente saudáveis foram amostradas nas regiões de Uberlândia/MG (cultivar Tec 7849 IPRO) e Santa Helena de Goiás/GO (cultivar NA 5909 RG). Coletaram-se folhas da região mediana de plantas nos estádios de crescimento de R3 a R7, que foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixa de isopor com gelo até o processamento.

Em câmara asséptica, as folhas foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 2-2,5% por 3,5 min, água destilada esterilizada

(ADE) por duas vezes e, logo após, secas em papel filtro esterilizado. Com um furador de rolha ($\varnothing=4,76$ mm) esterilizado, os tecidos vegetais desinfestados foram cortados e depositados em meio batata dextrose-ágar (BDA) suplementado com 50 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 50 mg L⁻¹ de tetraciclina (FERNANDES et al., 2015). Para verificar a eficácia da desinfestação superficial, os fragmentos foram pressionados sob o meio BDA por 5 s e, ainda, alíquotas de 100 µL da água da última lavagem foram plaqueadas em meio BDA. As placas foram mantidas a 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

Após checagens periódicas, isolados monospóricos de *C. truncatum* foram obtidos a partir de colônias com crescimento e morfologia típicos desse fungo. Os isolados patogênicos, cedidos pela EMBRAPA Soja, Londrina-PR, foram coletados de plantas de soja doentes entre 1992 e 2006. Ainda, folhas de plantas de soja, em estágio final de ciclo, foram amostradas na região de Piracicaba/SP (cultivar Potência).

Os isolados monospóricos foram preservados pelo método de Castellani e em papel filtro autoclavado. Para o Método de Castellani, discos de BDA contendo fragmentos de colônia dos isolados foram armazenados em água destilada autoclavada que foram, em seguida, mantidos em refrigerador. E por fim, fragmentos de papéis de filtro colonizados pelo fungo foram transferidos para tubos Eppendorf autoclavados contendo sílica gel e após, mantidos a -80 °C.

2.2.2. Identificação e determinação da diversidade genética

2.2.2.1. Extração de DNA

Para extração de DNA, micélio de cultura monospórica de cada isolado foi cultivado em meio BDA por 5 dias. O micélio foi macerado em areia autoclavada com pistilo e cadinho de porcelana. O DNA genômico de cada isolado foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo protocolo modificado. A quantidade de DNA extraída foi estimada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000®). A relação A260/A280 ($\geq 1,8$) foi utilizada para avaliar a pureza do DNA e sua integridade por meio do perfil eletroforético de 1 µL de cada amostra misturado com 3 µL de tampão de carregamento (Tris-HCl 1 M (pH 8), azul de bromofenol 0,02%, glicerol 50%) em gel de agarose (1% com 0,02 µL mL⁻¹ de SYBR® Safe) em tampão TBE 1X visualizados sob radiação ultravioleta em sistema de fotodocumentação. Ajustou-se a concentração de DNA para 25 ng µL⁻¹. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.2.2.2. Análise da região ITS e de parte dos genes Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Histona 3 (HIS3) e β -tubulina(β -tub)

A confirmação da identidade dos isolados foi feita com base na análise da sequência da região do Espaço Interno Transcrito (ITS, 540pb) e parte dos genes Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH, 250 pb) e Histona 3 (HIS3, 490 pb). Para a amplificação, usaram-se oligonucleotídeos iniciadores V9G (DE HOOG; GERRITS VAN DEN ENDE, 1998) e ITS4 (WHITE et al., 1991); GDF1 e GDR1 (GUERBER et al., 2003); e CYLH3F + CYLH3R (CROUS et al., 2004), respectivamente.

Processou-se cada reação de amplificação com 12,5 μ L de Master Mix (Promega); 8,5 μ L de água livre de nuclease; 1 μ L de cada primer (10 mM); 2 μ L de DNA (± 25 ng μ L⁻¹), totalizando 25 μ L. O DNA dos isolados foi amplificado em termociclador Techne TC-312. As condições para amplificação da região ITS consistiram de uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos a 1 min a 94 °C, 1 min de anelamento a 55 °C, 1 min de extensão a 72 °C e 5 min de extensão final a 72 °C. Para GAPDH, uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 34 ciclos a 1 min a 94 °C, 45 s de anelamento a 60 °C, 1 min de extensão a 72 °C e 10 min de extensão final a 72 °C. Para a HIS3, uma desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 34 ciclos a 1 min a 95 °C, 1 min de anelamento a 56,9 °C, 1 min de extensão a 72 °C e 4 min de extensão final a 72°C.

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1 %, juntamente com o marcador de massa molecular DNA Ladder de 1Kb (Invitrogen). Visualizou-se sob radiação ultravioleta em sistema de fotodocumentação. O produto da reação foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo recomendações do fabricante, e sequenciado pela empresa MACROGEN, Inc (Seul, Coréia do Sul) utilizando-se os mesmos iniciadores utilizados na PCR.

Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram analisados e as sequências contíguas foram montadas utilizando-se o programa DNA Sequence Assembly BASER versão 4.36. Compararam-se as sequências no banco de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

As sequências obtidas foram alinhadas a espécies tipo de *C. truncatum* listadas no trabalho de DAMM et al. (2009) e também com algumas estudadas por ROGÉRIO et al. (2017), que são sabidamente patogênicos (CMES 286, CMES 1034, CMES 1040, CMES 1059, CMES 1069, CMES 1075 e CMES 1076). O programa utilizado foi o MUSCLE implementado no pacote MEGA 7.0. A filogenia foi reconstruída por meio de métodos

baseados em análise de parcimônia, no programa MEGA 7.0, e em inferência Bayesiana, no Mr Bayes v.3.1 As sequencias parciais dos genes ITS, GAPDH e HIS3 foram concatenados e as mesmas análises foram realizadas com todos os nucleotídeos.

A partir dos resultados obtidos, nove isolados foram selecionados para análise adicional do gene beta tubulina (β -tub), utilizando-se os primers Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC). A condições para amplificação consistiram de uma desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 39 ciclos a 1 min a 94 °C, 45 s de anelamento a 55 °C, 1 min de extensão a 72 °C e 10 min de extensão final a 72 °C. Os mesmos procedimentos foram feitos como citado acima, com posterior reconstrução da filogenia por meio de métodos baseados em análise de parcimônia, assim como a concatenação da β -tub com os genes ITS, GAPDH e HIS3.

2.2.2.3. Análise da diversidade genética por meio do marcador IRAP

O DNA extraído de todos os isolados de *C. truncatum* também foram usados para analisar a variabilidade genética com base no marcador IRAP. Além desses, mais dez isolados foram acrescentados no estudo, totalizando 20 obtidos neste estudo, dez sabidamente patogênicos (CMES 286, CMES 1040, CMES 1069, CMES 1075, CMES 1034, CMES1059, CMES 1080, CMES 1182. CMES 1076 e CMES 1141) e outros sete apenas comparados filogeneticamente (CMES1070, CMES 1072, CMES 1051, CMES 1063, CMES 1044, CMES 1067 e CMES 1041)(ROGÉRIO et al., 2017).

Os oligonucleotídeos iniciadores CLIRAP1 (5' CGTACGGAACACGCTACAGA 3') e CLIRAP4 (5' CTTTGTGACGAGGCCATGC 3') foram usados nas reações. As condições de amplificação foram de acordo com o descrito por SANTOS et al. (2012). As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100. Processou-se cada reação de amplificação com 12,5 μ L de Master Mix (Promega); 8,5 μ L de água livre de nuclease; 1 μ L de cada primer (10 mM); 2 μ L de DNA (± 25 ng μ L⁻¹), totalizando 25 μ L. As condições para amplificação consistiram de seis ciclos iniciais de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 2 min a 72 °C. Outros 24 ciclos foram adicionados a esses seis ciclos iniciais, sendo que a cada seis ciclos, 30 s foram adicionados ao tempo de extensão. A extensão final foi de 10 min a 72 °C.

O produto da PCR foram separados por eletroforese a 100 V por 3 h em gel de agarose (1,5 %) e analisado juntamente com o marcador de massa molecular DNA Ladder de 1Kb (Invitrogen). As análises foram feitas em duplicada para confirmar a reprodutibilidade do perfil de bandas de cada isolado.

O tamanho dos fragmentos foram utilizados para criar uma matriz binária. As bandas obtidas foram classificadas com o número 1 (presença) ou 0 (ausência) entre os diferentes isolados. A reprodutibilidade dos perfis de bandas foi testada por duas repetições da PCR com todas as amostras. Apenas bandas reprodutíveis foram consideradas para análise. O dendrograma (bootstrap com 1000 réplicas) foi construído pelo método da ligação média entre grupos não ponderado (UPGMA) usando o pvclust do pacote R software. O índice de diversidade de Nei foi calculado usando o POPGENE.

2.2.3. Taxa de crescimento micelial e esporulação *in vitro* dos isolados

Os isolados obtidos de plantas assintomáticas foram comparados com dez obtidos de plantas sintomáticas incluindo aqueles analisados por ROGÉRIO et al. (2017) (CMES 286, CMES 1034, CMES 1040, CMES 1059, CMES 1069, CMES 1075 e CMES 1076), avaliando-se a taxa de crescimento micelial, a esporulação e as características morfológicas da colônia de cada isolado. Os isolados foram cultivados em meio BDA e mantidos a 24 °C sob fotoperíodo de 12 h de luz por 5 dias. Após, discos de micélio (≈ 5 mm), retirados da borda das colônias, foram transferidos para o centro de placas contendo meio BDA e SNA (Sintético- Pobre em Nutriente-Ágar). As placas foram mantidas à 24 °C e fotoperíodo de 12 h de luz.

A medição do crescimento micelial foi feita após 3, 5, 7 e 9 dias, medindo-se o diâmetro da área da colônia em dois eixos ortogonais. As médias dos diâmetros foram utilizadas para o cálculo da taxa de crescimento micelial (mm dia^{-1}). No 9º dia, observou-se a morfologia das colônias e avaliou-se a esporulação, para tal, a colônia de cada parcela foi raspada superficialmente com alça de Drigalsky e a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze. Quantificou-se a concentração de esporos em câmara de Neubauer. A quantidade total de esporos foi dividida pela área aproximada da colônia, obtendo-se esporos mm^{-2} de colônia.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições por isolado (uma placa = unidade experimental). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e agrupados pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$).

Após ser evidenciadas diferenças a partir das análises genéticas e fisiológicas, os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 foram caracterizados novamente quanto à taxa de crescimento micelial e a esporulação conforme descrito acima.

2.2.4. Caracterização de conídios, porcentagem de germinação e formação de apressórios

Os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 foram caracterizados morfolologicamente em meio BDA, sendo avaliados o comprimento e a largura dos conídios e a relação entre esses dois. Para tal, preparou-se suspensões de 10^4 conídios mL^{-1} de cada isolado a partir de cultura com 20 dias. Após, 200 μL da suspensão de cada isolado foi colocada em lâmina microscópica e sobreposta com lamínula para avaliação em microscópio ótico. Foram avaliados no mínimo 50 esporos por isolado.

Para avaliar a germinação e formação de apressório, foram depositadas três gotas de 20 μL por placa de poliestireno, sem meio de cultura. As placas foram vedadas e mantidas em BOD a 25 °C por 12 h. O processo de germinação foi interrompido pela adição de 5 μL de solução de azul de Amann. A quantificação de conídios germinados e a formação de apressórios foram realizadas com auxílio de microscópio óptico. Como conídio germinado, foram considerados aqueles cujo tubo germinativo era maior que seu comprimento. Foram avaliados no mínimo 100 esporos de cada gota (uma placa de poliestireno contendo três gotas = uma unidade experimental), sendo três repetições por isolado.

Em uma outra análise, os conídios germinados foram caracterizados quanto a presença de apressórios, número de apressórios formados e se os mesmos eram melanizados ou não. Para tal, 50 conídios germinados foram analisados de cada gota (uma placa de poliestireno contendo três gotas = uma unidade experimental), sendo três repetições por isolado.

2.2.5. Caracterização dos isolados por meio da avaliação de produção de enzimas hidrolíticas

2.2.5.1. Caracterização enzimática dos isolados usando o Sistema API-ZYM®

Os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 foram analisados quanto à produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. O sistema API-ZYM® foi utilizado para diferenciação intraespecífica dos isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja. O sistema permite a análise semiquantitativa da produção de enzimas hidrolíticas, sendo, constituído de galerias contendo 19 cúpulas de reação enzimática, cada uma contendo um substrato diferente que detecta as seguintes enzimas: fosfatase alcalina, esterase, esterase

lipase, lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, α -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase.

Para a análise, cinco discos de 5 mm de diâmetro de micélio de cada isolado, retirado de culturas com 5 dias de idade, foram cultivados em 100 mL de meio líquido de batata-dextrose (BD) por 8 dias a 27 °C e fotoperíodo de 12 h. O micélio foi filtrado em membrana de 0,22 μ m (Millipore). Em cada cúpula de reação colocaram-se 65 μ L do filtrado, sendo posteriormente incubados à 37 °C por 4 h no escuro. Adicionaram-se 3 μ L dos reagentes Zym A e Zym B nas cúpulas. As leituras foram feitas 10 min após. O meio BD foi usado como controle. Atribuíram-se notas de 0 (zero) a 5, conforme recomendações do fabricante, sendo 0 = ausência de reação; 1 = 5 nmol de substrato hidrolisado; 2 = 10 nmol de substrato hidrolisado; 3 = 20 nmol de substrato hidrolisado; 4 = 30 nmol de substrato hidrolisado e 5 = $\geq$ 40 nmol de substrato hidrolisado.

2.2.5.2. Produção de pectina liase

Os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 foram comparados quanto à atividade *in vitro* de pectina liase pelo método do ácido tiobarbitúrico (OLUTIOLA; AKINTUNDE, 1979). Um disco de micélio ($\varnothing \approx 4,76$ mm) de cada isolado, retirado de culturas com 5 dias de idade, foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio líquido (10g de pectina de citros; 4 g de asparagina mono-hidratada; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de H_2KPO_4 ; 0,6 g de HK_2PO_4 ; 4 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,09 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,07 mg de H_3BO_3 ; 0,02 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 mg de FeCl_3 ; 3,5 mg de ZnCl_2 ; 0,1 mg de cloridrato de tiamina; 1 L de água destilada; com pH final de 3,5). Os frascos foram mantidos em condição imóvel a 24 °C sob fotoperíodo de 12 h de luz por 14 dias, que corresponde ao pico de produção de pectina liase definido por RAMOS et al. (2010).

Uma alíquota do substrato foi retirada para avaliar a esporulação. Após, as culturas foram filtradas em funil de Buchner com papel de filtro Whatman e secas overnight a 70 °C. A massa seca do micélio dos diferentes isolados foi determinada e os filtrados foram utilizados como fonte da enzima.

A mistura da reação continha 3 ml de pectina (1,2 % em tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,0) e 2 ml do filtrado de cada cultura, que foi incubada durante 1 h a 40 °C. Após incubação, adicionou-se 1,5 ml de 1N HCl e 3 ml de 0,04 M ácido tiobarbitúrico e manteve-se a 100 °C por 20 min. A absorbância foi medida a 550 nm. Misturas aquecidas de enzimas e

com meio líquido foram usados como controle em todos os ensaios. Uma unidade de atividade da pectina liase foi definida como a quantidade de enzima que ocasiona o aumento de 0,01 na absorbância durante 30 min. O experimento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por isolado.

2.2.6. Pareamento de cultura e compatibilidade micelial

Avaliou-se o potencial de antagonismos entre os isolados RB 3, RB 5, RB 10, RB 15, RB 17 e CMES 1059 por meio de pareamento de culturas em BDA em placas de Petri de 9 cm. Multiplicaram-se os isolados em BDA sob fotoperíodo de 12 h a 24 °C durante 5 dias.

Discos de micélio ($\varnothing \approx 4,76$ mm) dos isolados foram pareados em todas as combinações possíveis em placas contendo meio BDA. Os discos foram colocadas à 2 cm de distância. Como testemunha, colocou-se um disco de micélio de cada isolado em uma extremidade da placa de Petri. As placas foram mantidas a 24 °C com fotoperíodo de 12 h.

O experimento foi inteiramente casualizado com três repetições por combinação. As placas foram avaliadas após 15 dias. A compatibilidade micelial foi caracterizada pela mistura micelial na zona de contato entre duas colônias. Avaliou-se o potencial de antagonismo dos isolados medindo-se o crescimento radial de cada isolado em cada combinação.

O ensaio foi em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por combinação (uma placa = uma unidade experimental).

2.2.7. Avaliação da patogenicidade dos isolados de *C. truncatum*

2.2.7.1. Efeito de *C. truncatum* na qualidade sanitária e fisiológica das sementes

Sementes de soja, não tratadas com fungicidas ou inseticidas, foram previamente submetidas à testes de germinação e sanidade, a fim de avaliar o potencial germinativo e se as mesmas estavam livres de *Colletotrichum* spp. Após essa verificação, procedeu-se à desinfestação superficial, em NaClO (1 %) por 3 min., e posterior secagem por 24 h em superfície asséptica.

Os isolados RB 3, RB 5, RB 10, RB 15, RB 17 e CMES 1059, selecionados a partir do teste de patogenicidade, foram repicados em meio BDA e mantidos por 5 dias a 24 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h. Discos de micélio ($\varnothing \approx 4,76$ mm) foram retirados das margens das

colônias e depositados no centro de placas de Petri com meio BDA acrescido de Manitol a -1,0 Mpa (COSTA et al., 2003). Após crescimento total sobre a superfície do meio, sementes de soja foram distribuídas em camada única sobre as colônias e, em seguida, mantidas a 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h por 72 h. Após, as sementes foram retiradas das placas para secagem de forma natural em superfície asséptica por 24 h. O controle foi o meio BDA com Manitol sem o fungo.

Para o teste de sanidade das sementes, utilizou-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009), em que três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada foram colocadas em placas de Petri plásticas de 9 cm de diâmetro e, sobre estas, 10 sementes separadas entre si. Em seguida, as placas foram mantidas a 20 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h de luz branca fluorescente e 12 h de escuro. As avaliações foram feitas após 7 dias de incubação, utilizando-se o microscópio estereoscópio e, quando necessário, microscópio óptico. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental composta por três placas contendo 10 sementes cada

O teste de germinação foi realizado pelo método do rolo de germinação (papel toalha), segunda as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), em que o papel toalha foi umedecido 2,5 vezes a massa seca do substrato com água destilada e foram distribuídas 50 sementes sobre dois papéis e coberto com um terceiro. Para cada tratamento, foram feitas quatro repetições (quatro rolos de germinação), acondicionados na posição vertical em germinador a 25 °C. As avaliações foram realizadas aos 5 e 8 dias da instalação do ensaio e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais germinadas.

2.2.7.2. Efeito da inoculação de *C. truncatum* em sementes na emergência e produção

Sementes inoculadas com os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 conforme descrito em 2.2.7.1 foram cultivadas em vasos de 5 L contendo solo autoclavado e deixadas em ambiente aberto até o fim do ciclo. Para cada tratamento, semearam-se cinco vasos, sendo 14 sementes por vaso. Avaliou-se a emergência e, quando em V1, as plantas foram desbastadas, deixando-se apenas duas plantas por vaso. Ao final, os grãos foram colhidos e pesados e as plantas avaliadas quanto à presença de sintomas típicos de antracnose.

2.2.7.3. Teste de patogenicidade em plantas de soja

Plantas no estágio de crescimento V1 foram inoculadas com os isolados RB3, RB5, RB10, RB15, RB17 e CMES1059 por atomização de suspensão com 10^4 esporos mL^{-1} dos isolados ou com ADE até o ponto de escorrimento. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida no escuro a 28 ± 2 °C por 72 h e em seguida sob fotoperíodo de 12 h. Após 5 dias, as plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas para identificação dos isolados patogênicos. O experimento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por isolado.

A avaliação da patogenicidade foi feita utilizando escala de notas, em que 0 = sem sintomas visíveis, 1 = 1 a 10 % da planta com sintomas (principalmente necrose nas nervuras das folhas), 2 = 11-35 % da planta afetada (principalmente folhas e algumas necroses nos pecíolos), 3 = 36 a 65 % da planta afetada (principalmente no pecíolo e algumas necroses nas hastes), 4 = 66 a 90 % da planta afetada (folhas expandidas, pecíolos e necroses nas hastes), e 5 = 91 a 100 % da planta afetada (necrose severa em toda a planta até a morte da planta) (YANG; HARTMAN, 2015).

2.3. Resultados

2.3.1. Filogenia e análise da diversidade genética

2.3.1.1. Análise filogenética com base na região ITS e de parte dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona 3 (HIS3) e β -tubulina (β -tub)

Obtiveram-se 17 isolados de folhas assintomáticas de soja, sendo oito de Santa Helena de Goiás/GO da cultivar NA 5909 RG e nove de Uberlândia/ MG da cultivar Tec 7849 IPRO. Três isolados foram obtidos em Piracicaba/SP, da cultivar Potência cujas vagens estavam com sintomas típicos de antracnose (Tabela 1). As relações genéticas entre esses (RB 1 a RB 20) e isolados sabidamente patogênicos (CMES 286, CMES 1034, CMES 1040, CMES 1059, CMES 1069 e CMES 1075) foram analisadas utilizando sequências da região ITS, GAPDH, HIS3 e β -tub, por meio da inferência Bayesiana e/ou análise de parcimônia.

As amplificações do DNA genômico dos isolados obtidos geraram um único produto com tamanho específico para os quatro genes analisados, com fragmentos de DNA da região com aproximadamente 540, 250, 490 pb e 430 pb, respectivamente.

A análise multigênica, formada pela concatenação dos genes ITS, GAPDH e HIS3, foi feita com sequências de 43 isolados de *Colletotrichum*, sendo 12 de isolados tipo de espécies de conídios curvos, outros dois representantes de *C. truncatum*, um de *C. gloesporioides*, sete de *C. truncatum* sabidamente patogênicos e o grupo externo (outgroup) *C. curcumae* (CBS IMI 288937) (Tabela 1). Um total de 1332 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 769 foram conservados, 476 sítios variáveis, 301 informativos para parcimônia e 156 foram singletos.

Para a inferência Bayesiana, o modelo de substituição, obtido por meio do Critério de Informação de Akaike, foi o GTR+I+G, o mesmo para os três genes. A árvore filogenética, gerada pela análise de parcimônia e a inferência Bayesiana, agrupou os isolados analisados em um clado monofilético, juntamente com a espécie tipo de *C. truncatum*, assim, uma única espécie de conídio curvo foi associada a cultura da soja nesse estudo (Figura 1).

Houve formação de três subclados bem diferenciados dentre os isolados estudados, evidenciando variação genética entre os isolados e homogeneidade dentro desses subclados. Sete isolados de Goiás (RB 1, RB 2, RB 4, RB 5, RB 6, RB 19 e RB 20) e os três de São Paulo (RB 12, RB 17 e RB 18) foram agrupados com CMES 286 e CMES 1075 com probabilidade a posteriori (PP) de 0,95 e valor de bootstrap (VP) de 80 %. RB 3, também de Goiás, se agrupou com CMES 1034 e CMES 1069 com PP de 1 e VP de 99 %. Os isolados de Minas Gerais RB 7, RB 8, RB 9, RB 10, RB 11, RB 13, RB 14, RB 15 e RB 16 se agruparam (VP = 90 %), porém com nenhum dos sabidamente patogênicos (Figura 1). Observou-se correlação entre o local de origem dos isolados obtidos de plantas assintomáticas e os subclados, visto que a maioria foi agrupada em função da área de coleta. No entanto, houve agrupamento desses com os sabidamente patogênicos, independente dos locais de origem.

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. usados no estudo filogenético com detalhes sobre localização, hospedeiro, cultivar e códigos de acessos no GenBank das sequências geradas.

Espécie	Código ¹	Local	Hospedeiro	Cultivar	Acesso no Genbank ²			
					ITS	GAPDH	HIS3	b-tubulina
<i>C. truncatum</i>	RB1	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB2	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB3	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB4	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB5	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB6	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB7	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB8	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB9	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB10	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB11	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB12	São Paulo	Glycine max/ antracnose	Potência	-	-	-	-
	RB13	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB14	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB15	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB16	Minas Gerais	Glycine max/ folhas assintomáticas	Tec 7849 IPRO	-	-	-	-
	RB17	São Paulo	Glycine max/ antracnose	Potência	-	-	-	-
	RB18	São Paulo	Glycine max/ antracnose	Potência	-	-	-	-
	RB19	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-
	RB20	Goiás	Glycine max/ folhas assintomáticas	NA 5909 RG	-	-	-	-

Tabela 1. (Continuação) Isolados de *Colletotrichum* usados no estudo filogenético com detalhes sobre localização, hospedeiro, cultivar e códigos de acessos no GenBank das sequências geradas.

Espécie	Código	Localização	Hospedeiro	Cultivar	Acesso no Genbank			
					ITS	GAPDH	HIS3	β-tubulina
<i>C. truncatum</i>	CMES286	Mato Grosso	Glycine max/antracnose	-	KJ614335	KJ614383	KJ614290	-
	CMES1034	Mato Grosso	Glycine max/antracnose	-	KJ614302	KJ614345	KJ614252	-
	CMES1040	Bahia	<i>Glycine max</i> /antracnose	-	KJ614306	KJ614348	KJ614257	-
	CMES1059	Paraná	<i>Glycine max</i> /antracnose	-	KJ614328	KJ614374	KJ614281	-
	CMES1069	Bahia	<i>Glycine max</i> /antracnose	-	KJ614293	KJ614337	KJ614244	-
	CMES1075	Pará	<i>Glycine max</i> /antracnose	-	KJ614314	KJ614356	KJ614264	-
	CBS34570	Dinamarca	<i>Glycine max</i>	-	GU227867	GU228259	GU228063	-
	CBS15135	Estados Unidos	<i>Phaseolus lunatus</i>	-	GU227862	GU228254	GU228058	-
<i>C. anthrisci</i>	CBS 125334	Holanda	<i>Anthriscus sylvestris</i>	-	GU227845	GU228237	GU228041	-
<i>C. chlorophyti</i>	IMI 103806	Índia	<i>Chlorophytum sp.</i>	-	GU227894	GU228286	GU228090	-
<i>C. circinans</i>	CBS 221.81	Servia	<i>Allium cepa</i>	-	GU227855	GU228247	GU228051	-
<i>C. curcumae</i> (outgroup)	IMI 288937	Índia	<i>Curcuma longa</i>	-	GU227893	GU228285	GU228089	GU228187
<i>C. dematium</i>	CBS 125.25	França	<i>Eryngium campestre</i>	-	GU227819	GU228211	GU228015	-
<i>C. fructi</i>	CBS 346.37	Estados Unidos	<i>Malus sylvestris</i>	-	GU227844	GU228236	GU228040	-
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS112999	Itália	<i>Citrus sinensis</i>	-	JQ005152	JQ005239	JQ005413	JQ005587
<i>C. lineola</i>	CBS 125337	República Tcheca	<i>Apiaceae</i>	-	GU227829	GU228221	GU228025	-
<i>C. liriopes</i>	CBS 119444	México	<i>Liriope muscari</i>	-	GU227804	GU228196	GU228000	-
<i>C. rusci</i>	CBS 119206	Itália	<i>Ruscus</i>	-	GU227818	GU228210	GU228014	-
<i>C. spaethianum</i>	CBS 167.49	Alemanha	<i>Hosta sieboldiana</i>	-	GU227807	GU228199	GU228003	-

Tabela 1. (Continuação) Isolados de *Colletotrichum* usados no estudo filogenético com detalhes sobre localização, data de coleta, hospedeiro, cultivar e códigos de acessos no GenBank das sequências geradas.

Espécie	Código	Localização	Hospedeiro	Cultivar	Acesso no Genbank			
					ITS	GAPDH	HIS3	β -tubulina
<i>C. verruculosum</i>	IMI45525	Zimbábue	<i>Crotalaria juncea</i>	-	GU227806	GU228198	GU228002	-
<i>C. lindemuthianum</i>	CBS 151.28	Reino Unido	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	GU227800	GU228192	GU227996	GU228094

¹ CBS: Coleção de culturas do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; IMI: Coleção de culturas do CABI Europe UK Centre, Egham, UK.² ITS: Espaço Interno Transcrito; GAPDH: Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase; HIS3: Histona 3 e β -tub: β -tubulina.

Figura 1. Árvore filogenética gerada por Parcimônia e por Inferência Bayesiana da região ITS e de parte dos genes Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase (GAPDH) e histona 3 (HIS3) de isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja. *C. curcumae* foi usado como grupo externo. Os valores de probabilidade posterior $\geq 0,90$ e de bootstrap $\geq 70\%$ estão anotados acima dos nós. A barra de escala representa o número de substituições por sítio. Isolados em negrito foram obtidos nesse estudo. Isolados com iniciais CMES foram os estudados por Rogério et al. (2017).

A análise multigênica, formada pela concatenação dos quatro genes (ITS, GAPDH, HIS3 e β -TUB), foi feita com sequências de 12 isolados de *Colletotrichum*, uma de *C. gloeosporioides*, uma de *C. lindemuthianum*, quatro de *C. truncatum* sabidamente patogênicos e o grupo externo (outgroup) *C. curcuma* (CBS IMI 288937) (**Figura 2**). Um total de 1760 nucleotídeos foram alinhados, dos quais 1159 foram conservados, 416 sítios variáveis, 114 informativos para parcimônia e 297 foram singletos.

Novamente, houve formação de três subclados bem diferenciados dentre os isolados estudados. RB5 e RB17 se agruparam com CMES 1059 com VP de 97%. CMES 1059 foi caracterizado por ROGÉRIO ET AL. (2017) como sendo altamente agressivo quando inoculados em sementes e por aspersão na parte aérea de plantas de soja. RB 10 e RB 15 se agruparam (VP = 100%), porém com nenhum dos sabidamente patogênicos. RB3 não se agrupou com outros isolados (Figura 2).

Figura 2. Árvore filogenética gerada por Parcimônia da região ITS e de parte dos genes Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase (GAPDH), histona 3 (HIS3) e β -tubulina (β -tub) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB3, RB5, RB10, RB15) e sintomáticas de soja (RB17 e CMES1059). *C. curcuma* foi usado como grupo externo. Os valores de bootstrap $\geq 70\%$ estão anotados acima dos nós. A barra de escala representa o número de substituições por sítio. Isolados em negrito foram obtidos nesse estudo.

¹ Agressividade do isolado quando inoculado por aspersão na parte aérea de plantas de soja: A: alta, M: média, B: baixa e AV: avirulento.

² Agressividade do isolado quando inoculado em sementes: A: alta, M: média e B: baixa.

2.3.1.1. Análise do marcador IRAP

O DNA de 37 isolados de *C. truncatum* foi analisado com o marcador IRAP. Um total de sete loci foi amplificado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados tiveram alta

reprodutibilidade e geraram amplicons em todos os isolados utilizados (Figura 3). Foi obtido um total de oito haplótipos, com suporte de bootstrap altos, acima de 99%, evidenciando a variabilidade genética entre os isolados e homogeneidade dentro desses grupos de haplótipos (Figura 4). Observou-se correlação entre o local de origem dos isolados obtidos de plantas assintomáticas e os haplótipos, visto que a maioria foi agrupada em função da área de coleta. No entanto, houve agrupamento desses com os sabidamente patogênicos, independente dos locais de origem (Índice de Shannon = 0.4055).

Figura 3. Perfil eletroforético da amplificação do DNA de isolados de *Colletotrichum truncatum* gerado por IRAP. À direita de cada gel, o marcador de massa molecular de DNA de 1Kb. “A” representa os isolados obtidos nesse estudo e “B” isolados estudados por Rogério et al. (2017)

Sete isolados de Goiás (RB 1, RB 2, RB 4, RB 5, RB 19 e RB 20) e os de São Paulo (RB 12, RB 17 e RB 18) foram agrupados com os isolados CMES 286, CMES 1040, CMES 1069, CMES 1070, CMES 1072 e CMES 1075. O isolado RB 3, também de Goiás, se agrupou com CMES 1034, CMES 1051, CMES 1059, CMES 1063, CMES 1080 e CMES 1182. Os isolados de Minas Gerais RB 7, RB 9, RB 13, RB 14, RB 15 se agruparam, porém com nenhum dos sabidamente patogênicos. RB 11 agrupou-se com CMES 1044, CMES 1067, CMES 1076 e CMES 1141. RB 10 agrupou-se com CMES 1041. Os isolados RB 6, RB 8 e

RB 16 não se agruparam com outros, sendo considerados haplótipos únicos e com baixa representatividade nesse estudo (Figura 4).

Figura 4. Dendrograma de distância genética (UPGMA) baseado nos locos obtidos por IRAP. Isolados em negrito foram obtidos nesse estudo.

2.3.2. Taxa de crescimento micelial e esporulação *in vitro* dos isolados

A taxa de crescimento micelial dos 20 isolados obtidos nesse estudo e mais sete isolados sabidamente patogênicos foram comparadas em meio BDA e SNA. Em relação à taxa de crescimento, para o meio SNA, os isolados foram separados em seis grupos, de acordo com o teste de Scott & Knott, com médias dentro dos grupos variando de 2,3 a 9,5 mm dia⁻¹. Para o meio BDA, foram quatros grupos, em que as médias variaram de 3,3 a 8,1 mm dia⁻¹. Não houve distinção entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e aqueles de plantas sintomáticas, visto que ambos os tipos de isolados foram encontrados na maioria dos grupos (Tabela 2). Assim como houve semelhanças morfológicas nas culturas de isolados de plantas assintomáticas e sintomáticas, apesar da variabilidade observada (Figuras 5 e 6).

Tabela 2. Agressividade e taxa de crescimento micelial (mm dia⁻¹) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos nesse estudo (RB 1 a RB 20) e estudados por Rogério et al. (2017) (demais isolados).

Isolado	Agressividade ^{1/2}	Taxa de crescimento (mm dia ⁻¹) (Média ± DP)					
		SNA			BDA		
RB6	-	2,31	± 0,10	a	3,66	± 0,335	a
RB4	-	2,48	± 0,02	a	3,33	± 0,109	a
RB20	-	2,56	± 0,11	a	3,67	± 0,321	a
RB5	M/M	2,61	± 0,10	a	4,13	± 0,128	a
RB2	-	2,63	± 0,25	a	4,46	± 0,175	b
RB1	-	2,63	± 0,34	a	4,51	± 0,191	b
RB12	-	2,67	± 0,09	a	4,52	± 0,197	b
RB18	-	2,85	± 0,08	a	4,53	± 1,303	b
RB17	A/A	3,17	± 0,09	a	4,67	± 0,213	b
CMES1059	A/M	3,91	± 0,66	b	4,96	± 0,266	b
CMES1075	-	5,35	± 0,27	c	5,00	± 0,435	b
CMES286	-	7,00	± 0,15	d	5,16	± 0,143	b
RB19	-	7,02	± 0,13	d	5,21	± 0,009	b
CMES1040	-	7,51	± 0,06	d	5,22	± 0,193	b
RB3	AV/B	8,01	± 0,14	e	5,66	± 0,384	c
RB8	-	8,10	± 0,14	e	5,82	± 0,233	c
CMES1076	-	8,40	± 0,02	e	6,02	± 0,081	c

Tabela 2. (Continuação) Agressividade e taxa de crescimento micelial (mm dia⁻¹) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos nesse estudo (RB 1 a RB 20) e estudados por Rogério et al. (2017) (demais isolados).

Isolado	Agressividade ^{1/2}	Taxa de crescimento (mm dia ⁻¹) (Média ± DP)	
		SNA	BDA
RB9	-	8,48 ± 0,13 e	6,07 ± 0,152 c
RB11	-	8,52 ± 0,07 e	6,17 ± 0,272 c
CMES1034	-	8,54 ± 0,18 e	6,24 ± 0,226 c
RB13	-	8,62 ± 0,16 e	6,31 ± 0,187 c
RB15	AV/B	8,78 ± 0,19 f	6,52 ± 0,566 c
CMES1069	-	8,82 ± 0,13 f	6,75 ± 0,080 c
RB7	-	8,84 ± 0,08 f	6,82 ± 0,243 c
RB16	-	8,85 ± 0,16 f	7,67 ± 0,514 d
RB10	B/B	9,13 ± 0,09 f	7,78 ± 0,374 d
RB14	-	9,49 ± 0,14 f	8,11 ± 0,354 d

*Meios de cultura: BDA= Batata-Dextrose-Ágar e SNA = Sintético- Pobre em Nutriente-Ágar. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento de Scott & Knott ($P > 0.05$) ($n=3$).

¹ Agressividade do isolado quando inoculado por aspersão na parte aérea de plantas de soja: A: alta, M: média, B: baixa e AV: avirulento. ²Agressividade do isolado quando inoculado em sementes: A: alta, M: média e B: baixa.

Figura 5. Colônias de *C. truncatum* em meio Batata-Dextrose-Ágar com 9 dias. Isolados obtidos a partir de folhas sintomáticas de plantas soja. Isolado assinalado em vermelho foi o usado nos demais estudos.

Figura 6. Colônias de *C. truncatum* em meio Batata-Dextrose-Ágar com 9 dias isolados nesse estudo. Isolados assinalados em vermelho foram os usados nos demais ensaios.

Assim como a taxa de crescimento, a esporulação variou entre os isolados. Em meio SNA, foram quatro grupos com médias variando de 0,54 a 3909,06 conídios mm^{-2} . Para o meio BDA foram três grupos com média variando de 0 a 170009,35 esporos mm^{-2} . Não houve distinção entre isolados obtidos de plantas assintomáticas e os de sintomáticas (Tabela 3).

Tabela 3. Agressividade e esporulação (conídios mm⁻²) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos nesse estudo (RB 1 a RB 20) e sabidamente patogênicos a soja (demais isolados).

Isolado	Agressividade ^{1/2}	Esporos.mm ⁻²	
		SNA	BDA
RB16	-	0,54 a	0 a
RB10	B/B	5,51 a	574,44 b
RB3	AV/B	11,16 a	0 a
RB7	-	16,37 a	45,36 b
RB13	-	21,4 a	13,55 a
RB15	AV/B	28,78 a	51,62 b
CMES1034	-	60,19 b	515,99 b
RB8	-	74,33 b	20,44 a
RB11	-	114,05 b	2321,97 b
CMES1069	-	123,47 b	162,81 b
CMES1076	-	124,66 b	1109,68 b
RB9	-	125,7 b	18,8 a
RB14	-	224,92 c	1124,68 b
RB1	-	263,67 c	311,1 b
CMES1075	-	395,41 c	86224,95 c
CMES1040	-	561,24 c	6843,15 c
RB19	-	603,21 c	170009,35 c
RB4	-	625,07 c	6800,03 c
RB2	-	657,18 c	84,83 b
RB18	-	734,56 c	82,62 b
CMES286	-	819,52 c	45006,22 c
RB12	-	967,61 c	324,81 b
CMES1059	A/M	1059,49 d	2122,38 b
RB20	-	1434,53 d	2609,56 c
RB17	A/A	1950,65 d	355,68 b
RB5	M/M	2385,57 d	6259,98 b
RB6	-	3909,06 d	5772,13 c
CV (%)		29,16	37,93

*Meios de cultura: BDA= Batata-Dextrose-Ágar e SNA = Sintético- Pobre em Nutriente-Ágar. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento de Scott & Knott (P > 0.05) (n=3). 1 Agressividade do isolado quando inoculado por aspersão na parte aérea de plantas de soja: A: alta, M: média, B: baixa e AV: avirulento. 2 Agressividade do isolado quando inoculado em sementes: A: alta, M: média e B: baixa.

Após as análises genéticas e fisiológicas, os isolados RB 3, RB 5, RB 10, RB 15 e RB 17 foram selecionados para as demais análises. A partir dos resultados obtidos por ROGERIO et al. (2017), selecionou-se também o isolado CMES 1059 por ser o mais agressivo. Assim, esses isolados foram caracterizados separadamente quanto à esporulação em meio BDA e SNA. Em meio BDA, os isolados RB 5 e RB 17 tiveram maiores produções de esporos mm⁻² da colônia, se diferenciando estatisticamente dos isolados RB 3 e RB 15 que tiveram a menor produção. Os demais isolados não diferiram entre si. Em meio SNA, o

isolado RB 17 teve a maior média de produção de esporos, diferenciando-se de RB 3, RB 10, RB 15 e CMES 1059, porém teve média igual a RB 5 (Figura 7).

Figura 7. Produção de esporos mm⁻² em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e SNA (Sintético- Pobre em Nutriente-Ágar) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059). Colunas com as mesmas letras minúsculas para meio BDA e maiúsculas para meio SNA diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para a taxa de crescimento micelial, em meio BDA, os isolados RB 3, RB 10, RB 15 e CMES 1059 tiveram as maiores taxas de crescimento, se diferenciado estatisticamente do isolado RB 5 e RB 17. Em meio SNA, os isolados RB 3, RB 10 e RB 15 tiveram as maiores taxas de crescimento, seguido de CMES 1059, RB 17 e RB 5 com as menores taxas (Figura 8).

Figura 8. Taxa de crescimento micelial em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e SNA (Sintético- Pobre em Nutriente-Ágar) de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB17 e CMES 1059). Colunas com as mesmas letras minúsculas para meio BDA e maiúsculas para meio SNA não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

2.3.3. Caracterização de conídios, porcentagem de germinação e formação de apressórios

Em meio BDA, todos os isolados produziram conídios hialinos, asseptados e levemente curvados com paredes paralelas, falcados, com ápice agudo e conteúdo granular. O comprimento dos conídios variou de 20,37 a 23,53 μm e a largura de 2,64 a 3,39 μm . A razão entre o comprimento e largura variou de 6,51 a 8,25 (Tabela 4). Houve diferença estatística entre essas medições, no entanto, não foi possível agrupar os isolados em relação a origem dos mesmos, como sendo de plantas assintomáticas ou sintomáticas de soja.

Tabela 4. Médias do comprimento, largura e da razão entre o comprimento e largura de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Isolado	Agressividade ^{1/2}	Comprimento (μm)			Largura (μm)			C/Largura		
RB17	A/A	23,5	$\pm$ 1,8	a	3,4	$\pm$ 0,3	a	7,1	$\pm$ 0,8	bc
RB10	B/B	22,9	$\pm$ 1,9	a	2,9	$\pm$ 0,4	c	8,2	$\pm$ 1,3	a
RB15	AV/B	21,7	$\pm$ 1,6	b	3,4	$\pm$ 0,5	a	6,5	$\pm$ 0,9	d
RB3	AV/B	21,5	$\pm$ 1,8	b	2,6	$\pm$ 0,3	d	8,3	$\pm$ 1,1	a
RB5	M/M	21,0	$\pm$ 1,6	bc	2,9	$\pm$ 0,4	bc	7,2	$\pm$ 0,9	b
CMES1059	A/A	20,4	$\pm$ 2,1	c	3,1	$\pm$ 0,3	b	6,6	$\pm$ 0,8	cd
Média		21,9	$\pm$ 2,1		3,1	$\pm$ 0,5		7,3	$\pm$ 1,2	

¹ Agressividade do isolado quando inoculado por aspersão na parte aérea de plantas de soja: A: alta, M: média, B: baixa e AV: avirulento. ²Agressividade do isolado quando inoculado em sementes: A: alta, M: média e B: baixa.

Os conídios originários de colônias de 20 dias dos diferentes isolados também foram analisados quanto à taxa de germinação e de formação de apressórios. Houve diferença significativa entre os isolados, sendo que a taxa de germinação variou de 61,7 a 93 % e a de formação de apressórios de 27,3 a 87,4 %. RB 3, RB 5, RB 10 e RB15 tiveram as menores taxas de germinação quando comparados a RB 17 e os isolados RB 17 e CMES 1059 tiveram as maiores taxas (Figura 9).

Os isolados também se diferenciaram quanto à formação de apressórios. CMES 1059 e RB17 foram significativamente superiores aos demais, com respectivamente, 77,1 e 87,4 % dos conídios com formação de apressórios. RB15 teve a menor porcentagem média, com apenas 27,3 % de conídios com apressórios. RB 5, RB 3 e RB 10 tiveram taxas intermediárias variando de 43 a 49,2 % (Figura 9).

Figura 9. Porcentagem de conídios germinados e com formação de apressórios de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Uma segunda avaliação foi feita para caracterizar os tipos de apressórios formados. Os conídios foram agrupados como formando: i. um apressório melanizado; ii. Um apressório hialino; iii. Dois apressórios melanizados e iv. Um apressório melanizado e um hialino. CMES 1059 e RB 10 se diferenciaram de RB 15 por produzirem mais conídios com um apressório melanizado. RB15 produziu mais esporos hialinos quando comparado a CMES 1059, RB 10 e RB 17. RB 3 e RB 5 tiveram médias de conídios melanizados e hialinos iguais aos demais. Verificou-se que RB 10 e RB 17 além de produzirem um único apressório por conídio, produziram conídios com dois apressórios, podendo ser um hialino e um melanizado ou os dois melanizados (Figura 10).

Figura 10. Tipos de apressórios formados pelos diferentes isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059). Letras maiúsculas para apressório melanizado e minúsculas para apressório hialino diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

2.3.4. Caracterização dos isolados por meio da avaliação de produção de enzimas hidrolíticas

2.3.4.1. Caracterização enzimática dos isolados usando o Sistema API-ZYM®

Houve uniformidade entre os perfis enzimáticos dos seis isolados obtidos de plantas assintomáticas e sintomáticas de soja analisados pelo uso do kit API-ZYM®. Para todos os isolados, foram quatro reações positivas para as 19 enzimas testadas (Figura 11). As enzimas detectadas foram: esterase, esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Não se observou diferença significativa na produção dessas diferentes enzimas pelos isolados.

Figura 11. Ensaio enzimático com Sistema Api-Zym® utilizando filtrados de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15), sintomáticas de soja (CMES1059 e RB 17). O controle é o meio não inoculado.

2.3.4.2. Produção de pectina liase

Os isolados RB 3, RB 5, RB 10, RB 15, RB 17 e CMES 1059 foram testados quanto às produções de pectina liase, de micélio e de esporos em meio à base de pectina como fonte de carbono. RB 3, RB 10 e RB 15 produziram mais pectina liase quando comparados com RB 5, RB 17 e CMES 1059 (Figura 12). A massa micelial foi proporcional à quantidade de pectina-liase ($R = 0,95$) (Figura 13), sendo a maior massa produzida por RB 3, RB 10 e RB 15, com 42 a 53,7 mg de micélio 20 mL⁻¹. Para a esporulação, a relação foi negativa, assim, quanto maior a produção de esporos, menor a produção de pectina liase ($R = -0,060$) (Figura 14). Consequentemente, quanto maior a produção de micélio, menor a esporulação, ($R = -0,69$).

Figura 12. Produção de pectina liase *in vitro* por isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059) crescidos em meio a base de pectina como fonte de carbono. Colunas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 13. Massa micelial de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059) crescidos em meio a base de pectina como fonte de carbono. Colunas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 14. Esporulação de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES1059) crescidos em meio a base de pectina como fonte de carbono. Colunas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

2.3.5. Pareamento de cultura e compatibilidade micelial

Não houve antagonismo *in vitro* entre os isolados testados. CMES 1059, RB 3 e RB 15 cresceram de forma uniforme em meio BDA, assim não houve isolados que tiveram crescimento mais intenso ou que inibiram o crescimento do outro. Além disso, todos os isolados tiveram compatibilidade micelial, visto que houve mistura de micélio na zona de contato entre os diferentes isolados (Figura 15).

Figura 15. Pareamento de cultura em meio batata-dextrose-água com o isolado patogênico CMES 1059 versus os isolados obtidos de plantas assintomáticas, RB 3 (A) e RB 15 (B).

2.3.6. Patogenicidade dos isolados de *C. truncatum*

2.3.6.1. Efeito de *C. truncatum* na qualidade sanitária e fisiológica das sementes, emergência e produção

Houve alta incidência de *C. truncatum* nas sementes inoculadas com os diferentes isolados, com porcentagem média de incidência 89,4 %, constatando a eficiência da inoculação. Não houve diferença estatística para incidência entre os diferentes isolados.

Houve decréscimo na germinação das sementes inoculadas com os diferentes isolados quando comparados ao controle sem inoculação. CMES 1059 foi o mais agressivo, ocasionando média de 14 % de sementes germinadas, diferindo de todos os demais. O isolado RB 17 diferiu do RB 15, com 38,5 % de sementes germinadas. A germinação no controle foi de 84,5 %. Para a emergência, os isolados RB17 e CMES 1059 diferiram do controle, com 25 e 31,4 % de plantas emergidas, respectivamente. No controle, a emergência foi de 62,9 % e os isolados RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15, não diferiram do mesmo (Figura 16).

Figura 16. Porcentagem de germinação e emergência de plântulas obtidas de sementes inoculadas com isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB3, RB5, RB10, RB15) e sintomáticas de soja (RB17 e CMES1059). Colunas de mesma cor com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística ao avaliar a produção de plantas crescidas a partir de sementes inoculadas com os diferentes isolados de *C. truncatum*. A média de produção de grãos por planta foi de 9,1 g.

2.3.6.2. Patogenicidade em plantas de soja

Os isolados RB 3, RB 5, RB 10, RB15, RB 17 e CMES 1059 foram testados quanto à patogenicidade em plantas de soja. Houve isolados que não ocasionaram sintomas visíveis nas plantas no estágio V1 de crescimento, outros ocasionaram sintomas menos severos (Tabela 5 e Figura 17). CMES 1059 e RB 17, obtidos de plantas sintomáticas, foram os mais agressivos, com nota média de severidade igual 5, ocasionando necrose severa em toda a planta chegando a causar até a morte da mesma (Tabela 5 e Figura 17.A). RB 5 causou necroses nos pecíolos e nas hastes (Figura 17.B), sendo classificado com a nota média igual a 4 (Tabela 5). RB 10 causou necrose nas nervuras das folhas (Figura 17.C), com nota média igual a 1 para severidade. Já os isolados RB 3 e RB 15 não causaram sintomas necróticos nas plantas de soja da cultivar AMS Tibagi (Figura 17.D). Foi possível o re-isolamento a partir de folhas sintomáticas e assintomáticas de todos os isolados inoculados.

Tabela 5. Classificação visual da severidade 10 dias após a inoculação por aspersão de suspensão de 10^4 conídios mL^{-1} de isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de plantas assintomáticas (RB 3, RB 5, RB 10 e RB 15) e sintomáticas de soja (RB 17 e CMES 1059).

Isolado	Severidade*
CMES 1059	5
RB17	5
RB 5	4
RB 10	1
RB 3	0
RB 15	0

*Escala de notas: 0 = sem sintomas visíveis, 1 = 1 a 10 % da planta com sintomas (principalmente necrose nas nervuras das folhas), 2 = 11-35 % da planta afetada (principalmente folhas e algumas necroses nos pecíolos), 3 = 36 a 65 % da planta afetada (principalmente no pecíolo e algumas necroses nas hastes), 4 = 66 a 90 % da planta afetada (folhas expandidas, pecíolos e necroses nas hastes), e 5 = 91 a 100 % da planta afetada (necrose severa em toda a planta até a morte da planta)(YANG; HARTMAN, 2015)

Figura 17. Plantas e folhas de soja com ou sem sintomas típicos de antracnose 10 dias após a inoculação por aspersão de suspensão de 10^4 conídios mL^{-1} de diferentes isolados de *Colletotrichum truncatum*. A. Necrose severa em toda a planta e morte da planta ocasionada por CMES 1059 ou RB17. B. Necroses nos pecíolos causada por RB5. C. RB10 causando necrose nas nervuras da folha. D. Folha assintomática obtida a partir da inoculação de RB3 ou RB15.

2.4. Discussão

Nesse estudo foi possível o isolamento de *Colletotrichum truncatum* de plantas assintomáticas de soja de duas cultivares (NA 5909 RG e Tec 7849 IPRO), corroborando com estudos de outros autores, que também obtiveram esse fungo a partir de folhas de plantas de soja, embora nenhum sintoma de antracnose tenha sido observado na cultura (CERKAUSKAS; SINCLAIR, 1982; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001; LEITE et al., 2013; PIMENTEL et al., 2006). Com os testes de patogenicidade, verificou-se que alguns desses isolados podem ser endofíticos, como os nomeados RB 3 e RB 15, os quais não causaram sintomas típicos da doença quando re-inoculados em plantas de soja, sendo possível também o re-isolamento a partir de folhas assintomáticas.

No entanto, o fato de *C. truncatum* vir a ser isolado como endofítico, não exclui a possibilidade dos mesmos serem patogênicos, como os isolados RB 5 e RB 10, que causaram sintomas na parte aérea e afetaram a germinação e a emergência de plântulas obtidas a partir de sementes inoculadas. Sabe-se que *C. truncatum* pode ter diferentes graus de patogenicidade, com isolados mais ou menos agressivos (ROGÉRIO et al., 2017). No entanto, não haviam estudos com uma abordagem mais profunda sobre a possibilidade desse fungo colonizar plantas de soja e permanecer assintomático. Assim, nesse estudo, foi possível verificar dois estilos de vida dentro da espécie *C. truncatum*: endofítico e patogênico, este último causando severidade variável.

De acordo com SCHULZ; BOYLE (2005), fungos endofíticos podem colonizar plantas sem causar sintomas, não somente devido às adaptações do hospedeiro, mas também à virulência inata contudo variável do microrganismo, em conjunto com as respostas de defesa do hospedeiro e as condições ambientais. Para desvendar os mecanismos dessa interação, estudos sobre endofitismo, assim como os aspectos moleculares, fisiológicos e bioquímicos relacionados, são cada vez mais frequentes. Deste modo, diferentes comparações foram feitas a fim de identificar possíveis aspectos que distingam isolados de *C. truncatum* endofíticos e patogênicos.

Na abordagem filogenética, com a análise concatenada dos genes ITS, GAPDH e HIS3, houve formação de três subclados, todos esses com isolados obtidos tanto de plantas assintomáticas quanto de sintomáticas, não sendo possível diferenciá-los quanto ao estado do tecido vegetal de origem. No entanto, ao analisar alguns desses isolados com a inclusão do gene β -tub e correlacionando-os com a agressividade dos mesmos, foi possível verificar que isolados caracterizados como hipovirulentos e endofíticos foram alocados em um mesmo clado, assim como os mais agressivos também se agruparam. Portanto, os mais agressivos RB5, RB17 e CMES1059 formaram um subclado separado de RB 3, RB 10 e RB 15 (avirulentos/endofíticos ou hipovirulento). DELAYE; GARCÍA-GUZMÁN; HEIL (2013) verificaram que *Colletotrichum* spp. endofíticos tinham relação estreita com espécies de estilo de vida necrotrófico. Dessa forma, é possível que os isolados patogênicos podem ser originários de uma população avirulenta pré-existente ou que isolados patogênicos perderam a patogenicidade ao longo da evolução da espécie, justificando a relação filogenética entre esses isolados.

Na análise do marcador molecular IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) não se verificaram diferenças entre os isolados endofíticos e patogênicos. No entanto, alguns autores caracterizaram diferenças genéticas que causam alteração de estilos de vida de fungos. Um exemplo disso é o mutante *C. magna*, deficiente na produção de pectato liase que foi capaz de colonizar plantas hospedeiras de forma assintomática (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993). Essa mudança foi devida a mutação em um único gene do isolado patogênico (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001). Aparentemente, esse fenômeno é comum entre espécies de *Colletotrichum* spp. (RAI; AGARKAR, 2016). Portanto, é possível que o surgimento de sintomas e o aparecimento de doenças possam estar relacionadas à expressão de alguns genes. A partir da presente análise, não foi possível detectá-las, necessitando-se de novas abordagens que detectem diferenças que levam as alterações na agressividade de *C. truncatum* em soja.

As características morfológicas de *C. truncatum* observadas nesse estudo estão de acordo DAMM et al., (2009). Verificaram-se diferenças nas colônias e tamanhos de conídios, no entanto, não foi possível correlacionar essas variações com a agressividade dos isolados. Ressalta-se, portanto, a importância de uma abordagem polifásica baseada não somente em caracteres morfológicos, mas também em caracteres moleculares, informações sobre o ciclo de vida do fitopatógeno e patogenicidade para apoiar a identificação de isolados de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009).

Para a taxa de crescimento micelial e esporulação, verificou-se que em meio SNA (Sintético - Pobre em Nutriente-Ágar) isolados mais agressivos tiveram as menores taxas de crescimento, porém, esporulação em maiores quantidades. Ao contrário dos avirulentos e hipovirulentos, que tiveram maiores taxas de crescimento micelial e menor esporulação *in vitro*. A germinação de conídios dos isolados agressivos foi maior quando comparada à dos endofíticos e hipovirulentos, assim como a porcentagem de conídios formando apressório. BUCHWALDT et al. (2004) identificaram duas raças patogênicas em população de *C. lentis*, uma mais virulenta e outra menos virulenta. A raça hipovirulenta, conforme esses autores, teve menor porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios, e também diferenças na velocidade e extensão da colonização durante a fase necrotrófica em comparação com isolados da raça mais virulenta (ARMSTRONG-CHO et al., 2012). *C. truncatum*, mutante em MAPKs relacionadas a CtPMK1, mostrou perda completa de patogenicidade para folhas de soja com baixa esporulação e formação de apressórios e menos melanina (XIONG et al., 2015). Dessa forma, as diferenças de agressividade entre os isolados podem estar relacionadas à esporulação, a taxa de germinação e a formação de apressórios.

O sistema API-ZYM® foi avaliado quanto ao potencial uso como ferramenta auxiliar na caracterização de diferentes fenótipos de *C. truncatum*. Em relação à atividade enzimática *in vitro* dos isolados com diferentes graus de patogenicidade, não foi possível a diferenciação dos mesmos utilizando-se esse sistema. Sabe-se que enzimas extracelulares produzidas por fungo estão intimamente relacionadas ao estabelecimento da doença (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Nesse estudo, todos os isolados obtidos produziram as enzimas esterase e esterase-lipase, importantes na quebra de ligações éster, que ligam os monômeros que formam os ácidos graxos da cutina, indicando sua importância no processo de penetração (PASCHOLATI; DALIO, 2018). A fosfatase ácida e a naftol-AS-BI-fosfohidrolase também foram detectadas. Essas enzimas estão envolvidas na degradação de compostos orgânicos de fósforo, componente da camada lipídica da membrana plasmática encontrada nas células vegetais (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Para a atividade de pectina-liase, isolados mais agressivos produziram menos pectina liase que os não agressivos, ao contrário do que RAMOS et al., (2010) propõe, ao relatar que a pectina liase está correlacionada a fase necrotrófica e, portanto, isolados mais agressivos produzem mais pectina liase. Apesar dos resultados obtidos, salienta-se que a produção *in vitro* de enzimas não se constitui em prova definitiva da importância das mesmas na patogênese, pois pode estar mais ligada à obtenção de nutrientes do que a patogenicidade (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Ainda, STONE et al (1994) sugere que microrganismos endofíticos e patógenos possuem muitos dos mesmos fatores de virulência, como exoenzimas e micotoxinas. Isso pode justificar o fato de não haver diferença entre as enzimas detectadas ou mesmo que essas não sejam relevantes no processo de patogênese de *C. truncatum* em soja.

Outros fatores podem estar relacionados à agressividade de *C. truncatum* em soja. BHADARIA et al. (2015) verificaram que os níveis de expressão do gene ClToxB variaram entre as raças de *C. lentis*, anteriormente designados por *C. truncatum*. Esse gene é responsável pela produção de toxina B, que é bem caracterizada em patossistemas necrotróficos. Na raça mais virulenta o nível de transcritos foi mais elevado na transição da fase biotrófica para a necrotrófica em relação à raça menos virulenta. Sugere-se que o ClToxB pode estar envolvido na amplificação dos sinais de morte celular durante essa transição e, portanto, pode contribuir para diferenças quantitativas na virulência entre as raças de *C. lentis*. Assim, uma abordagem mais profunda em relação a genes relacionados à patogenicidade já descritos pode ser usada a fim de avaliar as diferenças entre os fenótipos e consequentemente, uma possível explicação para avirulência dos isolados endofíticos. Ainda, STONE et al (1994) sugere que reações de defesa da planta, desencadeadas pela infecção, são responsáveis por restringir a colonização endofítica. SCHULZ; BOYLE, (2005). Assim, uma abordagem mais ampla se faz necessário para verificar se há diferença na resposta da planta frente a infecção e colonização de endofíticos e patógenos.

Alguns autores estudaram o ciclo de relação entre *C. truncatum* em hospedeiros e não hospedeiros. RANATHUNGE; SANDANI, (2016) verificaram que *C. truncatum* pode sobreviver em plantas não hospedeiras sem ocasionar doença e que o re-isolamento do fungo, a partir de tecidos inoculados, foi possível por várias semanas depois da inoculação. Observaram-se apressórios na primeira semana, porém hifas de infecção e apressórios secundários só foram observadas seis semanas depois, quando as folhas atingiram a senescência. RANATHUNGE et al. (2012) verificou que *C. truncatum* também pode permanecer em plantas hospedeiras sem causar doença, e que quando inoculado na parte

aérea, os sintomas só aparecem quando as folhas estão senescendo. No presente estudo, *C. truncatum* endofítico permaneceu assintomático quando as plantas estavam submetidas às condições favoráveis para o desenvolvimento de antracnose (YANG; HARTMAN, 2015), ao contrário dos patógenos que ocasionaram morte da planta em até dez dias. No entanto, não foi feita a avaliação até o fim do ciclo a fim de verificar se na fase final seria possível observar estruturas do endofítico em função da senescência dos tecidos.

Alguns autores perceberam que algumas endofíticos causavam sintomas sob condições de casa de vegetação e testes de patogenicidade em fragmentos de planta, mas em campo não causavam, demonstrando que condições ambientais experimentais ou sub-ótimas podem estressar o hospedeiro, e assim debilitar o sistema de defesa (KULDAU; YATES, 2000; MOSTERT; CROUS; PETRINI, 2000; PHOTITA et al., 2004). Assim, não se exclui a possibilidade dos isolados patógenos obtidos de plantas assintomáticas não causarem danos no campo também.

Para o endofítico, as condições dadas para o desenvolvimento da doença em plantas também foram as ótimas, com temperatura e umidade adequadas, mas não houve desenvolvimento da doenças, evidenciando a adaptabilidade de alguns isolados a variedade de soja testada, no entanto, sugerem-se novos testes que comprovem que essa adaptação não é restrita a uma única variedade.

HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, (2002) verificaram que em interação endofítica entre plantas de pimenta, berinjela e tomate e *C. acutatum*, a colonização ficou restrita aos espaços intercelulares das primeiras camadas celulares do tecido infectado, sem causar danos visíveis (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002). *C. truncatum* transformado expressando GFP (green fluorescent protein) foi capaz de colonizar o tecido intercelular de pimentão de forma endofítica, sem produzir sintomas (AUYONG; FORD; TAYLOR, 2012). Nesse estudo, apesar de ter sido feito a assepsia do tecido hospedeiro, certificando-se que *C. truncatum* havia sido isolado do tecido interno da folha, é necessário estudos mais específicos que determinem até que ponto o endofítico realmente coloniza plantas de soja.

Para as plantas, a associação endofítica pode trazer benefícios como a indução de resistência a patógenos, a promoção do crescimento das plantas e uma maior tolerância à seca. Nessa interação, pode ocorrer um equilíbrio entre a atividade do hospedeiro e do endofítico, sendo uma estratégia de sobrevivência, no qual o endofítico aguarda quiescente para depois continuar como saprófita (REDMAN et al., 1999; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001). Nesse estudo, verificou-se *C. truncatum*, independente do estilo de vida, não afeta

produção de grãos de plantas de soja quando inoculado em sementes, no entanto, ressalta-se que os mais agressivos afetam a germinação e emergência de plântulas e, conseqüentemente, a produtividade de soja.

No ensaio de pareamento de culturas, não se verificou atividade antagônica *in vitro* entre isolados de *C. truncatum* com diferenças na agressividade, não sendo possível observar zonas antagônicas em meio de cultura BDA. A produção de tais zonas dever-se-á à produção de metabólitos inibitórios (antibiose) produzidos por um ou ambos os isolados, visto que os indivíduos podem reconhecer-se, causando auto inibição (JONKERS et al., 2012). Apesar da não haver antibiose *in vitro*, isso não exclui a possibilidade de ocorrer outras formas de interação, como a competição por espaço. Assim, novos estudos devem ser feitos a fim de verificar se a colonização por *C. truncatum* endofítico em soja traz outros benefícios à cultura.

Como também foi verificado, ressalta-se que isolados de plantas assintomáticas quando inoculados pelos métodos aqui utilizados podem causar sintomas em casa de vegetação. Esse estilo de vida pode dificultar a detecção e controle da doença. Assim, para esse caso, medidas de controle não devem ser restritas apenas a hospedeiros sintomáticos pois tecidos vegetais infectados podem não apresentar sintomas. Esse material pode ser potencial fonte de inóculo que representa risco no transporte de material vegetal para uma região diferente. Assim, o conhecimento dos diferentes estilos de vida da espécie deve ser incorporado nos processos de desenvolvimento de políticas de biossegurança e na estimativa adequada do risco envolvido no comércio e na importação de certos materiais vegetais.

Portanto, há necessidade de se continuar estudando os diferentes estilos de vida de *C. truncatum* a fim de se determinar a gravidade da doença e decidir quais tipos de relações representam risco significativo, em que, a identificação de uma espécie patogênica baseada exclusivamente em caracteres morfológicos e moleculares não é suficiente para determinar esse risco.

Referências

- ARMSTRONG-CHO, C. et al. The infection process of two pathogenic races of *Colletotrichum truncatum* on lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 58–67, 2012.
- AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 372–382, 2012.

- BHADAURIA, V. et al. Candidate effectors contribute to race differentiation and virulence of the lentil anthracnose pathogen *Colletotrichum lentis*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–21, 2015.
- BRASIL; BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNV/CLAV, 2009.
- BUCHWALDT, L. et al. Identification of lentil germ plasm resistant to *Colletotrichum truncatum* and characterization of two pathogen races. **Phytopathology**, v. 94, n. 3, p. 236–243, 2004.
- CAI L et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CERKAUSKAS, R. F.; SINCLAIR, J. B. Effect of paraquat on soybean pathogens and tissues. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, n. 3, p. 495–502, 1982.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, 2003.
- CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, n. May, p. 415–430, 2004.
- DABOUSSI, M.-J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 275–299, 2003.
- DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1802, p. 45–87, 2009.
- DE HOOG, G. S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous *Basidiomycetes*. **Mycoses**, v. 41, n. 5–6, p. 183–189, 1998.
- DELAYE, L.; GARCÍA-GUZMÁN, G.; HEIL, M. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens-are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal Diversity**, v. 60, n. 1, p. 125–135, 2013.
- FERNANDES, E. G. et al. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84–92, 2015.
- FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5104, p. 75–78, 1993.

- GONZAGA, L. L. et al. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 485–496, 2015.
- GUERBER, J. C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 872–895, 2003.
- HE, C. et al. CgT1: A non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular and General Genetics**, v. 252, n. 3, p. 320–331, 1996.
- HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, v. 92, n. 7, p. 743–749, 2002.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147–182, 2009.
- JONKERS, W. et al. Metabolome and transcriptome of the interaction between *Ustilago maydis* and *Fusarium verticillioides* *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 10, p. 3656–3667, 2012.
- KLINGELFUSS, L.; YORINORI, J. Latent infection by *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* in soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158–164, 2001.
- KULDAU, G. A.; YATES, I. E. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: **Microbial Endophytes**. [s.l.: s.n.].
- LEITE, T. S. et al. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 56–69, 2013.
- MANANDHAR, J.; HARTMAN, G. Anthracnose. In: HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul, MN: APS Press, 1999. p. 13–14.
- MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. **Sydowia**, v. 52, p. 46–58, 2000.
- OLUTIOLA, P. O.; AKINTUNDE, O. A. Pectin lyase and pectin methylesterase production by *Penicillium citrinum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 72, n. 1, p. 49–55, 1 fev. 1979.

- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5^a ed. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 390–423.
- PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p. 131–140, 2004.
- PIMENTEL, I. C. et al. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705–711, 2006.
- RAI, M.; AGARKAR, G. Plant-fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 428–438, 2016.
- RAMOS, A. M. et al. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, n. 4, p. 186–190, 1 out. 2010.
- RANATHUNGE, N. P. et al. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: Infection, colonization and defence mechanisms. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 463–473, 2012.
- RANATHUNGE, N. P.; SANDANI, H. B. P. Deceptive behaviour of *Colletotrichum truncatum*: strategic survival as an asymptomatic endophyte on non-host species. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 2, p. 157–162, 2016.
- REDMAN, R. S. et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant physiology**, v. 119, n. 2, p. 795–804, 1999.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: Who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, v. 151, n. 3, p. 705–716, 2001.
- ROGÉRIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402–415, fev. 2017.
- SANTOS, L. V. et al. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroC11 sequences. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1087–1095, 2012.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.

- SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, v. 75, n. 3, p. 220–224, 1991.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). . **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 315–322.
- XIONG, Q. et al. CtPMK1, a Mitogen-Activated-Protein Kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum* on soybean. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 1, p. 63–74, 2015.
- YANG, H.; HARTMAN, G. L. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 99, p. 143–148, 2015.
- ZHU, P.; OUDEMANS, P. V. A long terminal repeat retrotransposon *Cgret* from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. **Current genetics**, v. 38, n. 5, p. 241–247, 2000.

3. RESPOSTAS BÍOQUÍMICAS DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS COM *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM* ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO E CONTROLE DE MOFO BRANCO

RESUMO

Colletotrichum truncatum é um fitopatógeno de importância econômica para a cultura da soja, porém isolados desta espécie podem ser obtidos de plantas assintomáticas de soja, como endofíticos. Assim, esse estudo objetivou verificar a capacidade de *C. truncatum* endofítico ativar o sistema de defesa de plantas de soja e conferir proteção contra a antracnose e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Para tanto, plantas de soja foram inoculadas com um isolado endofítico e um patogênico de *C. truncatum*, separadamente, e com pré-inoculação com o endofítico seguido do patogênico após 5 dias. Essas plantas foram avaliadas quanto a atividade de proteínas relacionadas à patogênese – PR-proteínas (peroxidases - POX e fenilalanina amônia-liase-FAL), a quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeído (MDA), aos 3, 5 e 7 dias da primeira inoculação. Para verificar o efeito protetor contra *S. sclerotiorum*, plantas de soja foram pré-inoculadas com o endofítico seguido de inoculação desse fitopatógeno após cinco dias, sendo avaliada a severidade do mofo branco após 10 dias de sua inoculação. Plantas pré-inoculadas com *C. truncatum* endofítico e desafiadas com o *C. truncatum* patogênico tiveram aumento da atividade de POX e da FAL e da quantidade de H_2O_2 . No quinto dia, plantas expostas ao endofítico seguido do patogênico tiveram maior atividade de POX. No sétimo, a atividade da FAL do controle foi superior ao do endofítico e do patogênico, mas não diferiu do desafio. Nesse mesmo tempo, plantas inoculadas com o endofítico e desafiadas com o patogênico tiveram média de concentração de peróxido de hidrogênio superior aos demais. Quando inoculados separadamente, endofítico e patogênico, não houve aumento na atividade ou quantidade dessas moléculas. Para o MDA, não houve aumento na produção desse composto ao longo do tempo, porém a quantidade de MDA foi menor para plantas inoculadas com o isolado patogênico e maior para o endofítico no quinto dia. A inoculação prévia com o isolado endofítico reduziu em mais de 88 % a severidade do mofo-branco em plantas de soja. A redução da severidade do mofo-branco pode ser devida à capacidade dessas plantas em aumentar a resposta de defesa mais rapidamente e em níveis maiores do que quando expostas ao endofítico isoladamente.

Palavra-chave: Endofitismo; *Glycine max*; Proteção de plantas; Resposta bioquímica

ABSTRACT

Colletotrichum truncatum is a pathogen of economic importance for soybean cultivation, but isolates of this species can be obtained from asymptomatic soybean plants, such as endophytic. Thus, this study aimed to verify the ability of *C. truncatum* to activate the soybean defense system and provide protection against anthracnose and white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). For that, soybean plants were inoculated with an endophytic, a *C. truncatum* pathogenic, and an endophytic followed by the inoculation of the pathogen after 5 days. These plants were evaluated for the activity of proteins related to the pathogenesis - PR-proteins (peroxidases - POX and phenylalanine ammonia-lyase-FAL), the amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) at 3, 5 and 7 days after the first inoculation. To verify the protective effect against *S. sclerotiorum*, soybean plants were inoculated with the endophytic followed by inoculation of this phytopathogen after five days. The severity of the white mold was evaluated after 10 days of inoculation. Plants pre-inoculated with *C. truncatum* endophytic and challenged with pathogenic *C. truncatum* had increased POX and FAL activity and the amount of H_2O_2 . On the fifth day, plants exposed to the endophytic followed by the pathogen had higher POX activity. In the seventh, the FAL activity of the control was superior to that of the endophytic and the pathogenic, but did not differ from the challenge. At the same time, plants inoculated with the

endophytic and challenged with the pathogen had a higher concentration of hydrogen peroxide than the others did. There was no increase in the activity or quantity of these molecules when endophytic and pathogenic were inoculated separately. For MDA, there was no increase in the production of this compound over time, but the amount of MDA was lower for plants inoculated with the pathogenic isolate and higher for the endophytic on the fifth day. The pre-inoculation with the endophytic isolate reduced the severity of white-mold in soybean plants around 88%. The reduction of white-mold severity may be due to the ability of these plants to increase the defense response more rapidly and at higher levels than when they were exposed to the endophyte alone.

Keywords: Endophytism; *Glycine max*; Crop protection; Biochemical response

3.1. Introdução

Fungos se associam às plantas utilizando diferentes estratégias de sobrevivência; eles podem ser mutualísticos, simbióticos, endofíticos ou parasitários. A maioria dessas relações não prejudica as plantas, mas em alguns casos, podem causar doenças ou até mesmo a morte (RAI; AGARKAR, 2016). Espécies do gênero *Colletotrichum* são importantes patógenos para diferentes culturas (AGRIOS, 2005; CANNON et al., 2012; HYDE et al., 2009; UDAYANGA et al., 2013), porém, muitas de suas espécies foram identificadas como endofíticos durante parte ou em grande parte do ciclo de vida de diversas plantas (CANNON et al., 2012; FERNANDES et al., 2015; GONZAGA et al., 2015; MANAMGODA et al., 2013; ROJAS et al., 2010). Ainda que seja estudado como fitopatógeno, *C. truncatum* pode ser isolado como endofítico em plantas de soja (CERKAUSKAS; SINCLAIR, 1982; KLINGELFUSS; YORINORI, 2001; LEITE et al., 2013; PIMENTEL et al., 2006).

PETRINI (1991) definiu endofíticos como sendo microrganismos que colonizam tecidos internos do hospedeiro sem causar dano aparente, incluindo também aqueles que possuem uma fase epifítica ou são patógenos latentes vivendo de forma assintomática em seus hospedeiros. Outros autores sugerem que endofíticos são aqueles que podem ser detectados em um determinado momento dentro dos tecidos de um hospedeiro aparentemente sadio (SCHULZ; BOYLE, 2005). Outra definição, inclusiva e amplamente aceita, é a de que esses microrganismos colonizam os tecidos internos das plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato sobre o hospedeiro (BACON; WHITE, 2000).

Muitos fungos endofíticos tem forte relação mutualística com o hospedeiro. O fungo se beneficia por ter acesso a nutrientes e um nicho de proteção contra as condições ambientais adversas e contra outros microrganismos, enquanto o hospedeiro, devido à presença dos endofíticos, pode ter o seu crescimento favorecido e se tornar mais tolerante ao estresse abiótico e mais resistente ao ataque de herbívoros e de patógenos (ARNOLD et al., 2003;

BUSBY; RIDOUT; NEWCOMBE, 2016; HERRE et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2009; VERMA; GANGE, 2014)

Ao tentar infectar plantas, os microrganismos podem encontrar mecanismos de defesa pré-formados como parede celular espessa e lignificada e também mecanismos químicos como a presença de fitoalexinas, compostos tóxicos produzidos pelas plantas. Adicionalmente, o sistema imune inato da planta pode reconhecer o padrão molecular deste microrganismo (PAMPS/MAMPS) promovendo a ativação de mecanismos de defesa pós-formados, como o desenvolvimento de camada de cortiça, a lignificação das paredes celulares, respostas de hipersensibilidade e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, os quais podem impedir a infecção (MYSORE; RYU, 2004). Destaca-se que, os microrganismos podem produzir moléculas efetoras que, a princípio, evitam seu reconhecimento ou minam o sistema de defesa da planta. O hospedeiro, por sua vez, pode passar a reconhecer esses efetores e ativar outros mecanismos de defesa detendo a colonização do então patógeno (resistência qualitativa). Ainda, o grau de ativação de defesa do vegetal pode ser variável, resultando numa reação de compatibilidade de intensidade também variável, com graus de resistência, ou resistência quantitativa (JONES; DANGL, 2006).

Endofíticos e patógenos possuem muitos dos mesmos fatores de virulência que são combatidos pelos mecanismos de defesa das plantas. A hipótese do "antagonismo equilibrado" propõe que a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre o hospedeiro e o endofítico. Se a planta sucumbe à virulência do fungo, esse desequilíbrio da relação levaria à doença, mas se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, a doença não ocorrerá. Por outro lado, se a virulência fúngica e a defesa das plantas estão em equilíbrio, essa associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta, no caso, a interação será endofítica (SCHULZ et al., 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Quando uma planta é atacada, seu sistema de defesa é ativado levando à síntese e/ou acúmulo de substâncias de baixo peso molecular conhecidas como fitoalexinas, principalmente do grupo dos flavonóides como a gliceolina. Tal efeito pode ser sistêmico, durável e inespecífico. Quando o sistema de defesa é ativado por microrganismos não-patogênicos, como os endofíticos, essa resistência é denominada sistêmica adquirida (SAR) e uma de suas vantagens é o efeito *priming*, pois a planta fica em estado de alerta e reage mais rápida e intensamente ao segundo ataque (CONRATH et al., 2015).

Diversos autores vem estudando a capacidade de endofíticos em induzir o sistema de defesa de plantas contra patógeno (KAVROULAKIS et al., 2007; REDMAN et al., 1999; WALLER et al., 2005). Assim, reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro podem produzir substâncias tóxicas aos patógenos ou criar condições adversas para o seu crescimento. Essas substâncias quando presentes em concentrações adequadas e em formas acessíveis ao patógeno, contribuem significativamente para a resistência, sendo relacionadas com mudanças na expressão de doenças (PIASECKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015).

Nesse contexto, o trabalho tem como objetivos: i. comparar a atividade de peroxidases, da fenilalanina amônia-liase, a concentração de H_2O_2 e de malondialdeído em plantas de soja inoculadas com isolados de *C. truncatum* endofítico e patogênico e ii. Verificar se *C. truncatum* promove proteção contra *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco, muito importante a cultura da soja

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Aspectos bioquímicos de plantas de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum* endofítico e patogênico

Selecionarem-se um isolado de *C. truncatum* endofítico (RB3), obtido de planta assintomática de soja e não patogênico a cultivar de soja AMS Tibagi, e um outro da mesma espécie porém patogênico (CMES 1059). Os isolados foram cultivados em meio BDA e mantidos a 24 °C sob fotoperíodo de 12 h de luz por 15 a 20 dias para proceder com os ensaios.

O bioensaio foi realizado com plantas de soja no estágio de crescimento V1. Os tratamentos foram definidos da seguinte forma: i. Controle (água destilada estéril - ADE); ii. Endofítico; iii. Patogênico; iv. Endofítico seguido de inoculação de patogênico após 3 dias.

As plantas foram inoculadas por atomização de uma suspensão com 10^4 esporos.mL⁻¹ dos isolados endofítico e/ou patogênico ou com ADE até o ponto de escorrimento. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida no escuro a 28 ± 2 °C por 72 h e em seguida sob fotoperíodo de 12 h.

Para a realização das análises bioquímicas, coletaram-se amostras foliares (primeiro trifólio) aos 3, 5 e 7 dias após a inoculação. As folhas foram colocadas em envelopes de papel

alumínio e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado com três repetições por tratamento.

3.2.1.1. Análises enzimáticas

3.2.1.1.1. Atividade de guaiacol peroxidases (POX) (EC 1.11.1)

Para a determinação da atividade da guaiacol peroxidases, um unifólio de soja de cada parcela foi macerado em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo polivinilpirrolidona (0,5 % m/v). Os macerados foram transferidos para microtubos de 2 mL e centrifugados a 20.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, constituindo assim o extrato proteico da amostra.

A atividade de peroxidases foi mensurada a partir da reação de 2 µL do extrato proteico adicionados em 2,998 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol (0,25 % v/v) e peróxido de hidrogênio (0,1 M), a 40 °C. A reação foi monitorada por 3 min, com medições da densidade ótica a 470 nm registradas a cada 30 s em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470nm min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.2.1.1.2. Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5)

A atividade da FAL foi determinada pela quantificação do ácido trans-cinâmico liberado a partir da fenilalanina (UMESHA, 2006). Para tal, 100 µL de extrato foi misturado com 450 µL de tampão borato de sódio a 100 mM (pH 8,8) e 3,717 mg de fenilalanina, e, em seguida, incubado a 40 °C por 1 h. A reação foi paralisada com adição de 200 µL de HCl (5 M) seguido de resfriamento durante 5 min no gelo e, em seguida, adicionaram-se 300 µL de água destilada autoclavada. A leitura da reação foi feita em leitora de microplacas a 290 nm e os valores interpolados em curva-padrão de ácido trans-cinâmico (Sigma-Aldrich) (0-1500 µg.mL⁻¹; R²=0,9975). Os resultados foram expressos em µg de ácido trans-cinâmico min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.2.1.1.3. Proteínas totais

A determinação de proteína foi realizada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o kit da Bio-Rad Protein Assay, segundo recomendação do fabricante. A reação consistiu de 15 µL de extrato proteico, 785 µL de água ultra-pura estéril e 200 µL do reagente. Os valores de absorbância foram verificados em espectrofotômetro a 595 nm. Esses valores foram interpolados em curva padrão de albumina de soro bovino (0–15 µg; $R^2=0,9895$) (Sigma-Aldrich).

3.2.1.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio

Para quantificação de peróxido de hidrogênio se utilizou o método descrito por ALEXIEVA et al. (2001), com algumas adaptações. Para a extração, o tecido de um unifólio de soja foi pesado, macerado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1 % (m/v) contendo polivinilpirrolidona a 1 % (m/v). Os macerados foram transferidos para microtubos de 2 mL e centrifugados a 20.000 g por 30 min a 4 °C.

A reação ocorreu pela adição de 0,2 mL do extrato foliar em 0,2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,8 mL de reagente iodeto de potássio (1 M). O branco consistiu dos mesmo volumes descritos, porém, no lugar do extrato foliar foi utilizado o mesmo volume de tampão de extração. A reação ocorreu durante 1 h no escuro e a absorbância mensurada a 390 nm. Os valores de absorbância foram interpolados em uma curva padrão (0-3 µg.mL⁻¹; $R^2=0,9983$) preparada com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (Merck).

3.2.1.3. Quantificação de malondialdeído (MDA)

Para verificar danos causados em lipídios utilizou-se o método de HEATH; PACKER, (1968). Para quantificação do MDA, uma alíquota de 250 µL do extrato foliar obtido no item anterior foi adicionado em 1 mL de solução contendo ácido tricloroacético (20 %) e ácido 2-tiobarbitúrico (0,5 %). A mistura foi incubada a 95 °C durante 30 min, resfriada em banho de gelo por 10 min e mantida em temperatura ambiente por 15 min, no escuro. A absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 e 600 nm e a quantificação de MDA realizada considerando o coeficiente de extinção ($\epsilon= 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.2. Proteção de plantas de soja por *Colletotrichum truncatum* endofítico contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Colletotrichum truncatum endofítico (RB3) foi testado quanto sua capacidade de proteger plantas de soja contra *S. sclerotiorum*. Assim, plantas de soja foram expostas aos seguintes tratamentos: i. Controle (água); ii. Endofítico; iii. Endofítico seguido de inoculação de *S. sclerotiorum* após cinco dias. iv. *S. sclerotiorum* aos 5 dias.

Para tal, plantas de soja no estágio de crescimento V2 foram previamente inoculadas por atomização de uma suspensão com 10^4 esporos mL^{-1} dos isolados endofíticos até o ponto de escorrimento. O controle foram plantas aspergidas com ADE até o ponto de escorrimento. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72h.

Após cinco dias da primeira inoculação, as plantas foram desafiadas com *S. sclerotiorum*. Discos de micélio (≈ 5 mm) de colônias com 5 dias de idade de *S. sclerotiorum* foram colocadas com a face micelial voltada para baixo sobre o centro do primeiro trifólio, na face adaxial. Os controles foram plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* ou com ADE até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 h.

As avaliações ocorreram após 10 dias da segunda inoculação. Para avaliar a severidade de *S. sclerotiorum*, os folíolos inoculados foram coletados e escaneados a uma resolução de 300 dpi. Em seguida, cada folha foi analisada quanto à proporção de área lesionada em relação a área sadia, utilizando-se o programa Quant (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), obtendo-se a severidade da doença em porcentagem.

O experimento foi inteiramente casualizado com três repetições de três plantas por tratamento.

3.3. Resultados

3.3.1. Aspectos bioquímicos de plantas de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum* endofítico e patogênico

3.3.1.1. Análises enzimáticas

3.3.1.1.1. Atividade de guaiacol peroxidases (POX) (EC 1.11.1)

Houve aumento significativo da atividade de peroxidases ao longo do tempo em plantas submetidas a todos os tratamentos. Dentro do quinto dia, plantas expostas ao

endofítico seguido do patogênico (Desafio) tiveram maior atividade de peroxidases, sendo superior a do controle, mas não diferindo daquelas inoculadas com o endofítico e patogênico, separadamente. No terceiro e sétimo dia, não houve diferença entre os tratamentos (Figura 18).

Figura 18. Atividade de peroxidases em folhas de soja. A inoculação do isolado endofítico e do patogênico foi feita no dia “0”. Para o desafio, inoculou-se o endofítico no dia “0” e após 3 dias foi feita a inoculação do patogênico. Para cada tratamento (letras maiúsculas) e cada tempo de avaliação (letras minúsculas), médias seguida de diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) com base no teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão da média.

3.3.1.1.2. Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) (EC 4.3.1.5)

Para a FAL, o aumento significativo da atividade ocorreu para o controle, para o endofítico e para o tratamento “desafio” (endofítico x patogênico) ao longo do tempo. Não houve acréscimo na atividade da FAL quando o isolado patogênico foi inoculado isoladamente. No sétimo dia, a média do controle foi superior ao isolado endofítico e patogênico, mas não diferiu do desafio (Figura 19).

Figura 19. Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja. A inoculação do isolado endofítico e do patogênico foi feita no dia “0”. Para o desafio, inoculou-se o endofítico no dia “0” e após 3 dias foi feita a inoculação do patogênico. Para cada tratamento (letras maiúsculas) e cada tempo de avaliação (letras minúsculas), médias seguida de diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) com base no teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão da média.

3.3.1.2. Quantificação de peróxido de hidrogênio

Para o peróxido de hidrogênio, houve aumento significativo na concentração ao longo do tempo apenas para o tratamento no qual se inoculou o isolado endofítico seguido do patogênico. No último dia, a planta desafiada com esse tratamento teve média na concentração de peróxido de hidrogênio superior aos demais. Nos dias 3 e 5, não houve diferença entre os tratamentos (Figura 20).

Figura 20. Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas de soja. A inoculação do isolado endofítico e do patogênico foi feita no dia “0”. Para o desafio, inoculou-se o endofítico no dia “0” e após 3 dias foi feita a inoculação do patogênico. Para cada tratamento (letras maiúsculas) e cada tempo de avaliação (letras minúsculas), médias seguidas de diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) com base no teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão da média.

3.3.1.3. Quantificação de malondialdeído (MDA)

Ao quantificar o MDA, não houve aumento significativo da concentração ao longo do tempo. No entanto, no quinto dia, a quantidade de MDA foi menor para plantas inoculadas com o isolado patogênico e maior para o endofítico. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à peroxidação de lipídeos para os demais tempos (Figura 21).

Figura 21. Concentração de malondialdeído (MDA) em folhas de soja. A inoculação do isolado endofítico e do patogênico foi feita no dia “0”. Para o desafio, inoculou-se o endofítico no dia “0” e após 3 dias foi feita a inoculação do patogênico. Para cada tempo de avaliação, médias de cada tratamento seguido de diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste de Dunn ($p > 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

3.3.2. Proteção de plantas de soja por *Colletotrichum truncatum* endofítico contra *Sclerotinia sclerotiorum*

A severidade do mofo branco foi em média 88 % menor nas folhas pré-inoculadas com o isolado endofítico de *C. truncatum* em relação àquelas onde não ocorreu a pré-inoculação (Figura 22). No primeiro caso, os sintomas necróticos, circundados por um halo amarelado, concentraram-se no centro do limbo foliar, onde foi feito o depósito do disco micelial de *S. sclerotiorum* (Figura 22 A). Nas folhas onde não houve pré-inoculação de *C. truncatum*, os sintomas de *S. sclerotiorum* se alongaram a partir do local de inoculação, principalmente no sentido da ponta foliar.

Figura 22. Severidade do mofo branco em folhas de soja pré-inoculadas com *C. truncatum* endofítico (A) e com água (B). Médias de cada tratamento seguido de letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) com base no teste de Tukey.

3.4. Discussão

Atualmente, muitas pesquisas estão sendo feitas para a descoberta de novas opções mais eficientes, econômicas e de baixo impacto ambiental para o controle de fitopatógenos. Uma abordagem promissora é o uso de indutores de resistência, isoladamente ou em combinação com pesticidas ou microrganismos benéficos (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Esses indutores normalmente tem ação sistêmica e de amplo espectro, com redução significativa de sintomas causados por diferentes tipos de patógenos (WALTERS; FOUNTAINE, 2009). São classificados em dois grupos principais, moléculas que são ou imitam fito-hormônios, como o produto comercial Bion® ou compostos que se assemelham a presença de um inimigo de planta, como um PSP1, uma protease extracelular produzida por *Acremonium strictum* (CHALFOUN et al., 2018).

O controle de doenças de plantas e a indução de respostas de defesa mediados por fungos avirulentos tem sido descritos para vários patossistemas (REDMAN et al., 1999; SALAZAR et al., 2013; SILVAR; MERINO; DÍAZ, 2009; VELOSO; DÍAZ, 2012). Para verificar se *Colletotrichum truncatum* endofítico é capaz proteger plantas de soja contra patógenos foram realizadas duas abordagens: a primeira utilizando técnicas de bioquímica fitopatológica por meio de análises quantitativas relacionadas a respostas de defesa de plantas e na segunda, avaliou-se em casa de vegetação a severidade do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em plantas pré-inoculadas com isolado endofítico de *C. truncatum*.

Quando plantas pré-inoculadas com o endofítico foram desafiadas com o isolado patogênico houve aumento da atividade de proteínas relacionadas à patogênese – PR-proteínas (peroxidases - POX e da fenilalanina amônia-liase - FAL) e da quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de soja. Quando inoculados separadamente, endofítico e patogênico não foram capazes de aumentar a atividade ou quantidade dessas moléculas, sugerindo o efeito conhecido na literatura como *priming*. Nesse estado, as plantas respondem em níveis baixos quando inoculadas pelo agente indutor, porém, quando posteriormente inoculadas com um agente patogênico, o seu sistema de defesa responde de forma rápida e intensa. Esse efeito pode estar relacionado tanto à resistência local quanto à sistêmica contra estresses bióticos e abióticos (CONRATH et al., 2015). Efeito semelhante foi observado por FREEMAN; RODRIGUEZ (1993) que demonstraram que o mutante não patogênico de *C. magna* foi capaz de proteger as plântulas de melancia do isolado patogênico da mesma espécie, além de de *F. oxysporum*, causador de murcha, e também contra *C. orbiculare*, patógeno foliar de cucurbitáceas. O controle foi correlacionado com a capacidade

dessas plantas em aumentar a resposta de defesa mais rapidamente em níveis iguais ou maiores do que quando expostas ao mutante isoladamente.

Para o controle de *C. truncatum* patogênico, não foi possível verificar a redução da severidade da antracnose pelo isolado endofítico. Houve dificuldade em quantificar a severidade da doença de forma precisa. Notou-se baixa severidade, mas não a ponto de afirmar que o controle foi efetivo (dados não mostrados). A fim de contornar essa limitação e verificar o efeito protetor do isolado endofítico, optou-se por estudar a interação entre esse e *Sclerotinia sclerotiorum*, devido à precisão na avaliação da severidade e também pela característica do processo de indução de resistência de conferir proteção contra uma ampla gama de patógenos (JONES; DANGL, 2006). Assim, demonstrou-se que *C. truncatum* endofítico reduziu a severidade de *S. sclerotiorum* em folhas de soja em mais de 88 %.

Uma das possíveis explicações para esse controle pode estar relacionada ao aumento da concentração de peroxidases. Sabe-se que essas enzimas são ativadas em resposta a ataques de microrganismos às plantas e várias funções têm sido atribuídos a elas na interação planta-patógeno. Em seu ciclo catalítico regular, peroxidases catalisam reações de oxidação-redução envolvendo H_2O_2 como doador de elétrons a várias moléculas, como compostos fenólicos, precursores de lignina, auxina ou metabólitos secundários (HIRAGA, 2001). A síntese da peroxidases pode resultar em defesa da planta com formação de paredes lignificadas mais fortes, resistentes à degradação enzimática e à penetração por patógenos. Quando o patógeno consegue superar as barreiras das plantas e as penetram, as peroxidases podem desempenhar um papel importante ao isolar ou eliminar esse patógeno (PASSARDI et al., 2005). BILES; MARTYN (1993) relacionaram a indução de resistência por *F. oxysporum* f.sp. *niveum* avirulento em melancia ao aumento da atividade de peroxidases. HE; HSIANG; WOLYN (2002) verificaram que *F. oxysporum* não patogênico induziu resistência sistêmica em aspargos (*Asparagus officinalis*), mas nenhum aumento de peroxidases foi observado antes da inoculação com desafio, indicando que se tratou de uma resposta à inoculação; plantas induzidas com *Fusarium oxysporum* não patogênico e desafiadas com *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* tiveram maior atividade de peroxidases do que aquelas onde os fungos foram inoculadas separadamente. REDMAN et al. (1999) também correlacionam o aumento da atividade de peroxidases e da FAL com o controle de fitopatógenos. Assim, sugere-se que o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* por *C. truncatum* endofítico pode ser devido à indução do sistema de defesa da planta.

A inferência de que o controle do mofo-branco pela pré-inoculação com o isolado endofítico de *C. truncatum* estar relacionado a repostas bioquímicas foi reforçada pelos

resultados da atividade de FAL. A FAL é uma enzima chave relacionada à biossíntese de monolignóis a partir da fenilalanina. Ainda, a conversão de fenilalanina ao intermediário ácido cinâmico pela FAL pode conduzir à formação de moléculas antimicrobianas de baixo peso molecular conhecidas como fitoalexinas principalmente pertencente à classe dos flavonóides (GROSSKINSKY; VAN DER GRAAFF; ROITSCH, 2012). Gliceolinas são fitoalexinas produzidas por soja podem se acumular em resposta a diferentes fatores. LYGIN et al. (2009) demonstrou que após infecção por *Phakpsora pachyrhizi*, plantas de soja resistentes tiveram maiores teores de gliceolinas quando comparadas a cultivares não resistentes. Em outro estudo, uma mistura de gliceolinas purificadas inibiu o crescimento de *Cercospora sojina*, *Diaporthe phaseolorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (LYGIN et al., 2010). No presente estudo, o aumento da atividade da FAL e controle de *S. sclerotiorum* pode estar relacionada à produção de gliceolinas, novos estudos são necessários para demonstrar o quadro completo das respostas fisiológicas que levam à indução de resistência por *C. truncatum* endofítico, com análises moleculares, com avaliação de expressão de genes ligadas ao sistema de defesa, e bioquímicas que elucidem o mecanismo de defesa.

Assim como o incremento na concentração de PR-proteínas, o acúmulo de H_2O_2 desencadeado após o reconhecimento de um patógeno pode atuar na defesa das plantas. Essa espécie reativa de oxigênio (ERO) está envolvida, por exemplo, no reforço da parede celular, uma vez que o H_2O_2 é necessário para a biossíntese de lignina, ou mesmo agindo como um agente antimicrobiano direto (ALLAN, 1997; SUTHERLAND, 1991). Sendo uma ERO relativamente estável e ausente de carga, sua passagem através da camada lipídica da membrana celular é facilitada, funcionando como um sinalizador para a rápida ativação das respostas de defesa vegetais (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989). Essa sinalização pode ocorrer no local de inoculação (local primário) ou sistemicamente (*Systemic Acquired Resistance*: SAR) (TORRES, 2010). Na SAR, o H_2O_2 aumenta a atividade da enzima ácido benzóico 2-hidrolase, necessária para a síntese do ácido salicílico, e consequente ativação do sistema de defesa (LAMB; DIXON, 1997). SHETTY et al., 2003 avaliaram a indução de resistência por um isolado não patogênico de *Septoria tritici* em trigo (*Triticum aestivum*) contra o isolado patogênico, observando-se correlação entre o aumento de H_2O_2 e a restrição do crescimento do patógeno. Morangos pré-inoculados com *C. fragariae* avirulento foram resistentes à *C. acutatum* virulento e *Botrytis cinerea*. Marcadores bioquímicos, morfológicos e moleculares indicaram que a forte resposta de defesa estava associada a uma explosão

oxidativa com acúmulo de H_2O_2 e O_2^- e um acúmulo transitório de ácido salicílico (SALAZAR et al., 2013), como já supracitado, envolvido em respostas sistêmicas de defesa.

A reação de hipersensibilidade (HR) é um dos principais mecanismos de defesa contra patógenos, podendo ser definida como uma área de morte celular no local da infecção que se correlaciona com a resistência (MUR et al., 2008). RANCE; FOURNIER; ESQUERRE-TUGAYE, (1998) correlacionaram a HR a peroxidação de lipídeos ao verificar que linhagens de tabaco com expressão da lipoxigenase suprimida tiveram reduzida morte celular quando inoculadas com *P. parasitica* var. *nicotianae* avirulento. Sabe-se que lipídeos são degradados em uma grande variedade de compostos como aldeídos, porém, um dos mais estudados é o malondialdeído (MDA). Nesse estudo, plantas inoculadas com o endofítico tiveram quantidade maior de MDA que as inoculadas com o isolado patogênico. Assim a redução do mofo-branco pode ser relacionada a HR, no entanto novos ensaios são necessários para demonstrar que os mecanismos de defesa induzidos por *C. truncatum* endofítico se correlacionam a HR, como análises bioquímicas e de expressão de genes ligados ao sistema de defesa.

REDMAN et al. (1999) caracterizaram o efeito de *C. magna* endofítico como sendo sistêmico, visto que o controle foi observado em folhas distantes do ponto de inoculação, o que sugeriu indução sistêmica de resistência por esse isolado. Neste estudo, tanto a inoculação do endofítico quanto a dos patógenos foram feitas na mesma folha, sugerindo-se o efeito indutor localmente, porém não sendo possível afirmar respostas de defesa sistêmicas. Assim a redução da doença pode ser devida à indução de resistência, mas também ao micoparasitismo, à antibiose e à competição por espaço e nutrientes não avaliados neste estudo.

Demonstrou-se que *C. truncatum* endofítico reduz a severidade de mofo-branco em folhas de soja e aumenta a síntese de compostos envolvidos no sistema de defesa quando desafiadas com o isolado patogênico. Nesse sentido, a descoberta do fator que estimula o sistema de defesa por *C. truncatum* endofítico bem como a prospecção de possíveis moléculas elicitoras se torna uma alternativa para o controle de doenças na cultura da soja.

Referências

- AGRIOS, G. N. Anthracnose Diseases caused by Ascomycetes and Deuteromycetes (Mitosporic fungi). In: AGRIOS, G. N. (Ed.). . **Plant Pathology**. 5. ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2005. p. 483–500.
- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- ALLAN, A. C. Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. **the Plant Cell Online**, v. 9, n. 9, p. 1559–1572, 1997.
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells: Role in Defense and Signal Transduction. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 109–16, 1989.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 2003.
- BILES, C.; MARTYN, R. Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. **Plant physiology and biochemistry**, v. 4, n. 31, p. 499–506, 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 645–55, 2016.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CERKAUSKAS, R. F.; SINCLAIR, J. B. Effect of paraquat on soybean pathogens and tissues. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, n. 3, p. 495–502, 1982.
- CHALFOUN, N. R. et al. Elicitor-Based Biostimulant PSP1 Protects Soybean Against Late Season Diseases in Field Trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. June, p. 1–14, 2018.
- CONRATH, U. et al. Priming for Enhanced Defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 97–119, 2015.
- FERNANDES, E. G. et al. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84–92, 2015.

- FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5104, p. 75–78, 1993.
- GONZAGA, L. L. et al. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 485–496, 2015.
- GROSSKINSKY, D. K.; VAN DER GRAAFF, E.; ROITSCH, T. Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? **Plant Science**, v. 195, p. 54–70, 2012.
- HE, C. Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D. J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**, v. 51, n. 2, p. 225–230, 2002.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1 abr. 1968.
- HERRE, E. A. et al. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 550–558, 2007.
- HIRAGA, S. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147–182, 2009.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KAVROULAKIS, N. et al. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 14, p. 3853–3864, 2007.
- KLINGELFUSS, L.; YORINORI, J. Latent infection by *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* in soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 158–164, 2001.
- LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 251–275, 1997.
- LEITE, T. S. et al. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 56–69, 2013.
- LYGIN, A. V et al. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v. 99, n. 12, p. 1412–20, 2009.

- LYGIN, A. V et al. Response of soybean pathogens to glyceollin. **Phytopathology**, v. 100, p. 897–903, 2010.
- MANAMGODA, D. S. et al. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 107–115, 2013.
- MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: How much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 2, p. 97–104, 2004.
- PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.). . **Microbial ecology of leaves**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 179–197.
- PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 948–964, 2015.
- PIMENTEL, I. C. et al. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705–711, 2006.
- RAI, M.; AGARKAR, G. Plant-fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 428–438, 2016.
- RANCE, I.; FOURNIER, J.; ESQUERRE-TUGAYE, M.-T. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6554–6559, 1998.
- REDMAN, R. S. et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant physiology**, v. 119, n. 2, p. 795–804, 1999.
- RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **The New phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.
- ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010.
- SALAZAR, S. M. et al. Avirulent strain of *Colletotrichum* induces a systemic resistance in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 4, p. 877–888, 2013.

- SCHULZ, B. et al. The endophyte-host interaction: A balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 103, n. 10, p. 1275–1283, 1999.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.
- SHETTY, N. P. et al. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 6, p. 333–346, 2003.
- SILVAR, C.; MERINO, F.; DÍAZ, J. Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. **Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 68–74, 2009.
- SUTHERLAND, M. W. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 79–93, 1991.
- UDAYANGA, D. et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 165–179, 2013.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68–71, 2006.
- VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT. A software plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, n. February, p. 105, 2003.
- VELOSO, J.; DÍAZ, J. *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 281–288, 2012.
- VERMA, V. C.; GANGE, A. C. **Advances in Endophytic Research**. [s.l: s.n.].
- WALLER, F. et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13386–13391, 2005.
- WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions. **Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 5, p. 523–535, 2009.
- WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 2013.