



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS



ÉLIDA FERNANDA CAVALCANTI MARINS

**ETIOLOGIA DA ANTRACNOSE DA FAVA E RESISTÊNCIA DE
GENÓTIPOS A DOENÇA**

RIO LARGO - AL

2016

ÉLIDA FERNANDA CAVALCANTI MARINS

**ETIOLOGIA DA ANTRACNOSE DA FAVA E RESISTÊNCIA DE
GENÓTIPOS A DOENÇA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Dr. Gildemberg A. Leal Júnior.

Coorientador: Dr. Gaus Silvestre de A. Lima.

Colaborador: Dr. Leonardo da F. Barbosa.

RIO LARGO - AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

M337e Marins, Élida Fernanda Cavalcanti.

Etiologia da antracnose da fava e resistência de genótipos a doença /
Élida Fernanda Cavalcanti Marins. – 2015.
55 f. : il.

Orientador: Gildemberg A. Leal Júnior.

Coorientador: Gaus Silvestre de A. Lima.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de
Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Bibliografia: f. 44-55.

1. *Colletotrichum truncatum*. 2. *Phaseolus lunatus*. 3. GAPDH.
4. Patogenicidade. I. Título.

CDU: 635.653:616-092.8

ÉLIDA FERNANDA CAVALCANTI MARINS

ETIOLOGIA DA ANTRACNOSE DA FAVA E RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS A DOENÇA

Dissertação submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Proteção de
Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas e aprovada em
17 de Fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Universidade Federal de Alagoas (Coorientador)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

Profª Drª. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)

RIO LARGO - AL

2016

*Aos meus pais Fernando e Eulalia
por todo incentivo e apoio.
Aos meus irmãos Fernando e Elaine
pela paciência e compreensão.
À minha sobrinha Júlia
por me dar dias felizes.*

*Aos meus queridos avós
Arlindo (in memorian) e Celina (in memorian)
Aurora e Gilberto (in memorian)
Alzira e Pedro (in memorian)*

*À vocês eu dedico esta obra por terem abdicado de
muitas coisas por mim e se dedicarem
sempre em me ajudar.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em minha vida e sempre me dar a oportunidade do recomeço, proporcionando-me forças em cada caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias por tornar possível essa conquista. À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Gildemberg A. Leal Jr. pela amizade, orientação e ensinamentos.

Aos Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima e Dr^a Iraildes Pereira de Assunção pela amizade, apoio, disponibilidade e auxílio compartilhando comigo momentos difíceis.

Aos professores Dr. Siumar Tironi pelo incentivo em participar do programa, Dr. Júlio Alves Cardoso Filho, Dr^a. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, Dr^a. Maria de Fátima S. Muniz e Dr. Paulo Vanderlei dos quais tive apoio e pude recorrer em momentos de dúvidas e aos demais que fazem parte do programa pela dedicação e ótimo trabalho que desempenham.

Ao Dr. Leonardo da Fonseca Barbosa por me auxiliar exaustivamente em todos os momentos na execução deste trabalho, pela paciência e por suas valiosas sugestões.

À todos os funcionários e colaboradores do CECA em especial Michelle.

À todos os amigos que me ajudaram nesta caminhada que fizeram uso e aos que fazem parte do Laboratório de Microscopia, Genética e Clínica Fitossanitária do Centro de Ciências Agrárias: Ana Paula Silva, Ana Paula Vieira, Anderson Barcelos, Anny Lucena, Erika Sáles, Fabiano Leite, Gabriel Faustino, Ivanildo Silva, Janyne Rocha, Karollina Moura, Khayke Medeiros e em especial Livoney Goes por seu companheirismo desde a minha matrícula, dedicação, incentivo e apoio sempre que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias: Frederico Feijó, Janaíne Rossane, Mayra Ferro e Roberto Ramos.

Aos colegas de turma Manoel Azevedo, Mayara Castro e Jean Jardel pela identificação que tivemos durante o curso, ao Jadson e ao amigo Alisson Van Der Linden.

À minhas famílias Cavalcanti e Marins das quais tenho imenso orgulho e sem os quais não teria chegado onde estou. Obrigada a todos os tios (as) que tanto amo. Aos primos (as) e compadres sempre presentes. A Berenice Pastor por sempre ajudar em tudo. São muitos nomes a ser citados, mas cada qual sabe a importância que teve para mim ao longo desta etapa profissional da minha vida. Agradeço de forma especial a tio Lucas de Oliveira (*in memoriam*) pelo exemplo de fé, força, coragem e superação e ao primo Denilson (*in memoriam*) por acreditarem sempre no meu potencial. Deixo aqui o meu muito obrigada pelas orações, carinho e incentivo de todos!

“Na natureza, resistência é a regra”

Agrios, 2005

RESUMO

A patogenicidade de fungos pode estar associada à adaptação em determinada condição geográfica e à alta variabilidade genética que possuem. O estudo avaliou a patogenicidade de doze isolados de *Colletotrichum truncatum* contra sete genótipos de *Phaseolus lunatus* com resistência conhecida à antracnose em campo. Os isolados coletados em cinco municípios de Alagoas, Messias (01 e 17) São José da Laje (03 e 04), União dos Palmares (05 e 06), Murici (07,11,12,13) e Rio Largo (18 e 20) foram inoculados em folhas saudáveis de feijão-fava. O inóculo consistiu por discos de micélio contendo estruturas do patógeno. A avaliação da patogenicidade foi avaliada pela média ponderada da lesão nos três folíolos após sete dias de inoculação. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições e submetidas à análise de variância pelo programa SISVAR 5,6 e teste de Tukey com probabilidade de 5%. As folhas utilizadas apresentaram lesões com manchas de coloração marrom-escuras e deprimidas, ou manchas marrom-avermelhadas e deprimidas com aspecto encharcado e com formação de frutificações negras do patógeno e crescendo ao longo das nervuras da folha. Todos os isolados testados foram patogênicos nos ensaios de resistência ao hospedeiro. Após inoculação do patógeno nas folhas com ferimento, os sintomas apareceram três ou quatro dias após inoculação nos genótipos G10 (AS) e G65 (AR), respectivamente. Através da análise filogenética do gene GAPDH foi possível identificar a espécie *C. truncatum* nos 12 isolados obtidos no Estado de Alagoas. O índice de crescimento micelial variou de 3,7 cm a 7,9 cm. Na avaliação cultural os micélios apresentam com coloração marrom, cinza, verde escuro e creme no centro. Bordas com coloração branca, creme, verde e verde-escuro e peritécios em aglomerado em algumas. O tipo crescimento observado foi o setorial com áreas intercaladas de micélios claro e escuro. O crescimento tipo estrelar foi observado em uma das culturas. Na topografia variaram em micélio reduzido, moderado, abundante e aéreo. No teste de patogenicidade, foi possível observar que o isolado ICT20 foi o que proporcionou menor tamanho de lesão no genótipo G65, e os isolados ICT03, ICT07, ICT11, ICT12 e ICT13 foram os que causaram maiores lesões. Quando comparamos os mesmos isolados inoculados em genótipos diferentes, observamos que o genótipo G65, considerado resistente, apresentou menor tamanho de lesões comparando com todos os isolados, e os tamanhos das lesões diferiram estatisticamente para os isolados ICT01, ICT03, ICT05, ICT07, ICT11, ICT12, ICT13 e ICT20. Foi possível selecionar para avaliação da resistência em cinco genótipos de fava os isolados ICT 07 e ICT 12 (ambos de Murici). Na análise da resistência com isolados dos *C. truncatum* mais agressivos, verifica-se que os genótipos G17, G22, G32 obtiveram lesões menores quando inoculados o isolados ICT07, e os genótipos G62, G69 obtiveram as maiores lesões. O isolado ICT12 foi menos agressivo aos genótipos G32 e G69. O genótipo G17 foi o mais suscetível para o isolado ICT12 apresentando as maiores lesões. O tamanho da lesão só diferiu estatisticamente para G17. E o único genótipo que se comportou resistente nos dois isolados foi G32, podendo ser indicada para posteriores estudos de resistência à antracnose.

Palavras-chave: *Colletotrichum truncatum*. *Phaseolus lunatus*. GAPDH. Patogenicidade.

ABSTRACT

The pathogenic fungi may be associated with adaptation in a given geographical condition and the high genetic variability that have. The study evaluated the pathogenicity twelve *Colletotrichum truncatum* against seven genotypes of *Phaseolus lunatus* with known resistance to anthracnose in the field. The isolates collected in five municipalities of Alagoas, Messias (01, 17) São José da Laje (03, 04), União dos Palmares (05, 06), Murici (07, 11, 12, 13) and Rio Largo (18, 20) they were inoculated in healthy leaves of lima bean. The inoculum consisted of mycelium discs containing pathogen structures. Assessment of pathogenicity was assessed by the weighted average injury to three leaflets seven days after inoculation. The design was completely randomized with five repetitions and subjected to analysis of variance by the program SISVAR 5,6 and testing *Tukey* with a probability of 5 %. The leaves used showed lesions with dark brown coloring and depressed spots, or reddish-brown and depressed spots with soaked appearance and with black fruiting bodies of the pathogen training and growing along the leaf veins. All isolates tested were pathogenic in endurance tests to the host. After inoculation of the pathogen on leaves with injury, symptoms appeared three or four days after inoculation the genotypes G10 (AS) and G65 (AR), respectively. Through phylogenetic analysis of GAPDH gene it was possible to identify the species *C. truncatum* in the 12 isolates obtained in the state of Alagoas. The mycelial growth it has variation of 3.7 cm to 7.9 cm. Cultural assessment mycelia present with brown coloring, gray, dark green and cream in the center. Edges with white color, cream, green and dark green and perithecia in agglomerate in some. Growth type observed was the sector with interspersed areas of light and dark mycelia. The star type growth was observed in an isolated. Topography varied in small, moderate, abundant and aerial mycelium. In the pathogenicity test, it was possible to observe isolated ICT20 caused smaller size on G65 genotype, and The Isolated ICT03, ICT07, ICT11, ICT12 and ICT13 LARGEST caused injuries. WHEN we compare ourselves Isolated inoculated IN Different genotypes, What we observe the G65 genotype, considered resistant, showed less damage size compared to all isolates, and the sizes of the lesions differed significantly for ICT01, ICT03, ICT05, ICT07, ICT11, ICT12, ICT13 and ICT20. It was possible to select for resistance evaluation in five genotypes of fava isolated ICT ICT07 and ICT12 (Murici). In the resistance analysis of the isolated *C. truncatum* more aggressive, the genotypes G17, G22, G32 had minor lesions when inoculated ICT07 the isolates and genotypes G62, G69 had the highest lesion. The ICT12 was less aggressive to G32 and G69 genotypes. The G17 genotype was more susceptible to the isolated ICT12 presenting the larger lesions. Lesion size only differed statistically for G17 and the only genotype that behaved in both resistant isolates was G32, which may be indicated for further anthracnose resistance studies.

Keywords: *Colletotrichum truncatum*. *Phaseolus lunatus*. GAPDH. Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sintomatologia da antracnose na fava. A – folhas, B - vagem e C - sementes.	16
Figura 2 -	Ciclo evolutivo do patógeno causador da antracnose da fava. A – órgãos infectados, ciclo primário da doença, B – sobrevivência e dispersão dos esporos do patógeno, C – fase biotrófica, D – fase necrotrófica e reinício do ciclo.	18
Figura 3 -	Disposição dos blocos para avaliação da patogenicidade em câmara úmida. A – montagem dos blocos, B – câmara úmida, AR- genótipo altamente resistente G65, AS – genótipo altamente suscetível G10, ICT – isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., T – testemunhas.	28
Figura 4 -	Aspecto morfo culturais das colônias de <i>Colletotrichum</i> spp. cultivadas em meio BDA. A – ICT01 e ICT17 (Messias), B – ICT03 e ICT04 (São José da Laje), C – ICT05 e ICT06 (União dos Palmares), D – ICT7 e ICT11 (Murici), E – ICT12 e ICT13 (Murici), F – ICT18 e ICT20 (Rio Largo).	31
Figura 5 -	Estruturas de <i>Colletotrichum</i> spp. Setas (A), conídios (B).	32
Figura 6 -	Árvore filogenética dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	34
Figura 7-	Folíolos de fava apresentando sintoma causado pelo fungo <i>C. truncatum</i> apresentando lesões foliares de coloração marrom, deprimida crescendo ao longo das nervuras após inoculação dos discos de micélio com fermento.	36
Figura 8-	Folíolos de fava apresentando sintoma causado pelo fungo <i>C. truncatum</i> apresentando formação conidial a partir do disco e nas nervuras.	37
Figura 9-	Lesões provocadas pelos isolados ICT07 e ICT12 nos genótipos de feijão-fava G10 (AS) e G65 (AR) ao sétimo dia após inoculação por discos de micélio em folhas destacadas com fermento. A - isolado ICT07. B - isolado ICT12 e respectivas testemunhas.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Procedência dos genótipos de <i>P. lunatus</i> .	21
Tabela 2 -	Descrição dos Isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	22
Tabela 3 -	Descrição do <i>primer</i> GAPDH usado para identificação do gênero <i>Colletotrichum</i> .	25
Tabela 4 -	Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.	25
Tabela 5 -	Índice de crescimento micelial, cor da colônia, topografia de <i>Colletotrichum spp.</i>	30
Tabela 6 -	Tamanho médio de lesão causado por 12 isolados de <i>C. truncatum</i> em dois genótipos contrastantes de <i>P. lunatus</i> , um altamente suscetível e outro altamente resistente.	38
Tabela 7 -	Tamanho médio de lesão causado por 2 isolados mais patogênico de <i>C. truncatum</i> em 5 genótipos <i>P. lunatus</i> classificados em avaliação de campo como Resistente (R), Altamente suscetível (AS) e Suscetível (S).	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Phaseolus lunatus</i>	14
2.2	Antracnose	15
2.3	<i>Colletotrichum</i> spp.	17
2.4	Manejo da Antracnose	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Material Vegetal.	21
3.2	Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	22
3.3	Caracterização Morfocultural dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	23
3.4	Caracterização Molecular dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	23
3.5	Teste de Patogenicidade	27
3.6	Teste de Resistência nos Genótipos de Feijão-fava	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Caracterização Morfocultural dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	30
4.2	Caracterização Molecular dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	33
4.3	Teste de Patogenicidade	35
4.4	Teste de Resistência em Genótipos de Feijão-fava	40
	REFERENCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O feijão-fava, *Phaseolus lunatus*, pertence ao gênero *Phaseolus* (1988), subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales* e família *Fabaceae*. O gênero possui aproximadamente 50 espécies, todas originárias do Continente Americano. As espécies mais cultivadas *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (CRONQUIST, 1988; DEBOUCK, 1991; MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 1998). O *P. lunatus* é uma leguminosa proteagínosa com grande diversidade genética e potencial de produção. É considerada depois do feijão comum (*P. vulgaris* L.), a espécie mais importante do gênero por ser mais tolerante à seca, ao excesso de calor e umidade (IPGRI, 2001; MAQUET; VEKEMANS; BAUDOUIN 1999; VIEIRA, 1992).

Em 2013 o Brasil teve uma produção de 7.957 toneladas de feijão-fava, sendo a maior parte dessa produção concentrada na região Nordeste do Brasil que produziu 7.693 toneladas, o equivalente a 96,6% da produção nacional, sendo a maior parte produzida no estado da Paraíba que produziu 4.421 toneladas, equivalente a 55,5% do total nacional, seguido de Ceará (1.620 toneladas), Pernambuco (906 toneladas), Piauí (266 toneladas), Sergipe (175 toneladas), Maranhão (163 toneladas), Rio Grande do Norte (95 toneladas) e Alagoas (47 toneladas) que ocupa o oitavo lugar do Nordeste na produção do grão (IBGE, 2013).

A fava (*P. lunatus*) é uma importante fonte de renda e de alimentação, sobretudo na região Nordeste, tendo em vista seu valor nutricional e potencial rústico que faz com que se adapte às condições ambientais locais, além de possibilitar uma colheita prolongada (AZEVEDO; FRACO; ARAÚJO, 2003). Apesar do Nordeste ser um importante produtor de feijão-fava e da importância que a cultura apresenta, principalmente para a agricultura familiar da região, diversos problemas tem interferido na produção de *P. lunatus*. Dentre estes fatores destacam-se a seca, ocorrência de insetos pragas e a incidência de doenças. Dentre as doenças destacam-se as de origem fúngica, como a Antracnose (CTSBF, 2012; RIBEIRO, 2009; KIMATI, et al, 1997).

A antracnose é causada por várias espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*. *Colletotrichum* spp. tem sido relatado como parasita de uma gama de hospedeiros, dentre as quais leguminosas e solanáceas (SUTTON, 1992), ocorrendo por todo o mundo (DAMM et al., 2009). É considerada uma das doenças de maior importância para muitas plantas cultivadas. No Brasil, é frequentemente encontrada em plantios de feijão-fava e o fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw.) tem se destacado como principal agente causal da doença na região Nordeste (THAN et al, 2008; COSTA et al., 2006; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR,

2006; CHONGO; GOSSEN; BERNIER, 2002; PAULA JÚNIOR, 1995). A diversidade de espécies e a falta de informações sobre as relações com determinados hospedeiros tornam sua taxonomia e nomenclatura bastante confusa (GUIMARÃES, 2011; GUERBER et al, 2003), pois, forma clássica de classificação dos fungos era baseada apenas nos caracteres morfológicos e fisiológicos (COLATTO, 2010), causando discordâncias no seu estudo taxonômico dificultando (CAI et al., 2009; ANDRADE et al., 2007).

Para reduzir as discordâncias na identificação e taxonomia do gênero *Colletotrichum*, características moleculares têm sido levadas em consideração além das características morfológicas, culturais e fisiológicas já empregadas no estudo (SCHENA et al., 2014; DAMM et al., 2013; LIMA, N. et al., 2013; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; BONETT et al. 2010; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE et al., 2007). Assim, são incluídos vários marcadores filogenéticos na identificação das espécies do gênero *Colletotrichum*. Os genes mais utilizados são actina (ACT), quitina sintetase (CHS-1), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona (HIS3), glutamina sintetase (GS) e a região *Internal transcribed spacer* (ITS) (SHARMA et al., 2013; CANNON et al., 2012; WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012a; PENG et al., 2012).

As populações naturais de plantas geralmente são polimórficas para a resistência a diversos fungos patogênicos. Os patógenos também são polimórficos para a virulência, podendo vencer a resistência da planta, estas normalmente produzem uma grande variedade de produtos naturais que podem funcionar como agentes químicos na resistência. Variações de patogenicidade acontecem por causa da variação da sensibilidade do fungo para os agentes químicos lançados pela planta na sua defesa e aos diversos mecanismos envolvidos nessa síntese e liberação dos mesmos (BELL, 1981; FRANK, 1992 *apud* MATIELLO, 1997; BEDENDO, 1995). O controle genético é recomendado como busca e obtenção de cultivares resistentes em programas de melhoramento, ajudando a diminuir os custos de produção e reduzindo os impactos negativos causados ao meio ambiente pelo uso e aplicação de agrotóxicos (CAVALCANTE et al, 2012; SPONHOLOZ et al, 2006; BEDENDO, 1995).

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar por meio do sequenciamento do gene GAPDH as espécies de *Colletotrichum* associadas à cultura da fava no Nordeste do Brasil, verificar a patogenicidade dos isolados e a resistência de genótipos de fava aos isolados mais agressivos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Phaseolus lunatus*

O *Phaseolus lunatus* L. também conhecido por feijão-fava, feijão-de-lima, fava-de-lima, feijão-espadinho ou fava é uma proteaginosa anual, trepadeira, bem adaptada às zonas tropical e originária da América Latina, sendo também cultivada em regiões temperadas ou subtropicais de outros continentes. Apresenta uma rusticidade que muito se adapta às condições climáticas encontradas na região Nordeste no Brasil onde a maior parte do seu plantio se concentra no Estado da Paraíba, seguido de Ceará, Pernambuco, Piauí, ocupando Alagoas o oitavo lugar na produção do grão (IBGE, 2013; AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO, 2003; IPGRI, 2001; VIEIRA, 1992).

É considerada a espécie mais importante do gênero depois do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) por ter elevada diversidade genética e elevado potencial de produção se adaptando às mais diferentes condições ambientais, com melhor desempenho nos trópicos quentes e úmidos (MAQUET; VEKEMANS; BAUDOIN, 1999).

A cultura apresenta baixa produtividade, pelo seu plantio ser geralmente realizado por pequenos agricultores em consórcio com outras culturas como milho e mandioca, utilizando-as como suporte para seu crescimento. Suas vagens são achatadas, curvas, coriáceas, pontiagudas, de coloração bege quando secas, contendo de duas a quatro sementes por vagem e tem variação em relação a cor do tegumento e tamanho do grão (SANTOS et al, 2002; AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO, 2003). A planta apresenta ciclo anual, bianual ou perene, germinação epígea e hábito de crescimento indeterminado ou determinado (BEYRA & ARTILES, 2004).

A fava tem sido uma das alternativas de renda e alimento para a população do Nordeste por apresentar maior potencial de proteína vegetal (VIEIRA, 1992), apresentando um percentual superior ao encontrado em variedades de feijão comum como observado por Antunes et al (1995) avaliando o teor nutricional do *P. vulgaris* nas variedades rico, carioca, piratã e rosinha onde a quantidade de proteínas variou entre 23,37 % a 25,77 % e Azevedo, Franco e Araújo (2003), avaliando a composição química de sete variedades de fava encontrou variedades com teores de proteína de 26,70 % e 26,19 %, o que demonstra a sua importância como fonte alternativa de proteína de origem vegetal para a população.

2.2 Antracnose

Os sintomas da antracnose são visualizados em todas as partes da planta. A doença pode causar morte em plântulas, necrose de pecíolos, nas hastes, folhas e vagens. Em geral, os sintomas da doença são caracterizados por manchas foliares, necróticas, podridão e queda de flores e frutos, cancro e secamento de ramos e tombamento de plantas jovens. É uma doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, caracterizado por lesões de formato elíptico, arredondadas, de coloração pardo-escura, deprimidas na região central com uma massa de coloração rósea ocasionada pela produção de esporos do patógeno (SPONHOLZ et al, 2006; ABREU, 2005; AGRIOS, 2005; HENNING et al, 2005; KIMATI, 1997).

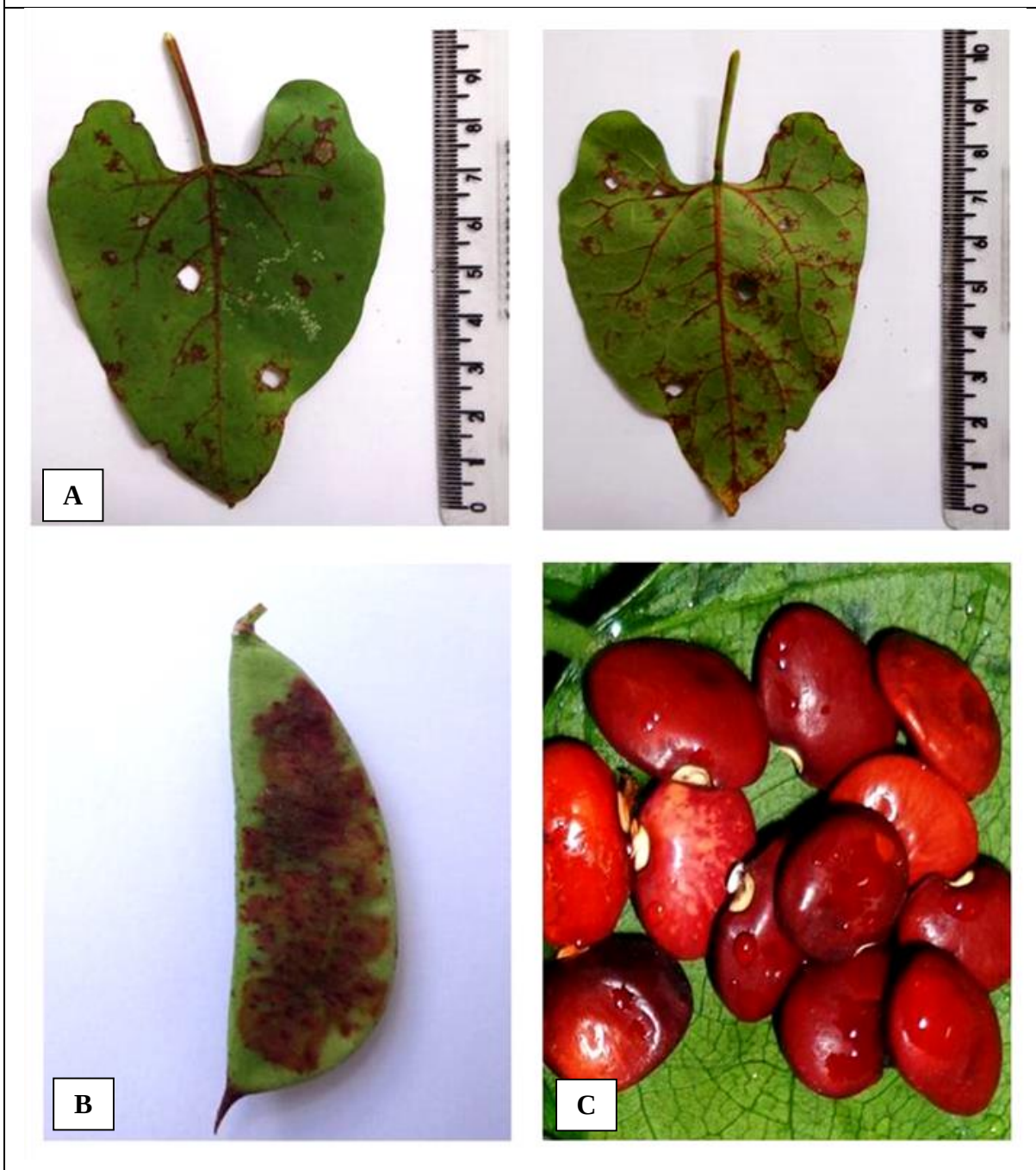
O fungo ocorre em diversas espécies hospedeiras no Brasil e no mundo como na *Jatropha curcas* (ELLISON, 2015), *Glycine max* L. (NOETZOLD, 2014; COSTA et al, 2009a), *Solanum esculentum* (DIAO et al., 2014), pimenta, *Capsicum annum* L. (MAHMODI; KADIR; PUTEH, 2014a), *Cicer arietinum* (MAHMODI et al, 2013), *Mangifera indica* L. (SERRA et al, 2011), *Psidium guajava* L. (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008), *Coffea arabica* L. (LINS; ABREU; ALVES, 2007), *Lens culinaris* (CHONGO; GOSSEN; BERNIER, 2002), *Phaseolus vulgaris* L. (PARRELLA, 2008) e *Phaseolus lunatus* L. (CARMO et al, 2015; CAVALCANTE et al, 2012; CARVALHO, 2009) entre outras. O patógeno *Colletotrichum* é capaz de infectar diferentes hospedeiros, evidenciando sua inespecificidade e ocorrência generalizada em vários hospedeiros (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; CANNON et al., 2012).

Temperaturas moderadas entre 20°C e 30°C associadas ao aumento do volume de precipitação e umidade relativa do ar, são condições favoráveis para ocorrência da doença, sendo mais severas principalmente em cultivares suscetíveis e tecidos jovens, onde as perdas na produção podem ser mais acentuadas (ABREU, 2005; HENNING et al, 2005; HADDAD; MAFFIA; MIZUBUTI, 2003; KIMATI, 1997). Em cultivar suscetível o tempo de aparecimento das lesões varia de 72 a 144 horas e de até 14 dias após a inoculação, em cultivar resistente (CHONGO; GOSSEN; BERNIER, 2002).

Os sintomas pré e pós-colheita incluem lesões têm formato elíptico, deprimidas e escuras no caule e no pecíolo. As vagens apresentam lesões arredondadas, de coloração escura, deprimidas e no centro uma massa de coloração rósea ou alaranjada ocasionada pela produção de esporos do fungo e presença de setas. As sementes infectadas apresentam lesões escuras e deprimidas de tamanhos variáveis apresentando-se com lesões marrom-escuras ou negras nos cotilédones após a emergência de plântulas. As folhas iniciam com manchas irregulares e de

coloração parda quando jovens, tornando-se avermelhadas à medida que envelhecem, com escurecimento ao longo das nervuras, na parte inferior e necrose (figura 1) (FERRARI, 2011; AGRIOS, 2005; PAULA JÚNIOR, 1995; KIMATI, 1997).

Figura 1- Sintomatologia da antracnose na fava. A – folhas, B - vagem e C - sementes.



Fonte: o autor.

A disseminação da doença de um plantio ao outro e por longas distâncias pode ocorrer pela sobrevivência do inóculo em restos culturais e no interior das sementes. Sendo motivo de preocupação não apenas pelo seu efeito negativo no rendimento, mas também por ser facilmente disseminada entre as regiões produtoras. (KIMATI, 1997; ABREU, 2005; HENNING et al, 2005; SPONHOLZ et al, 2006).

2.3 *Colletotrichum* spp.

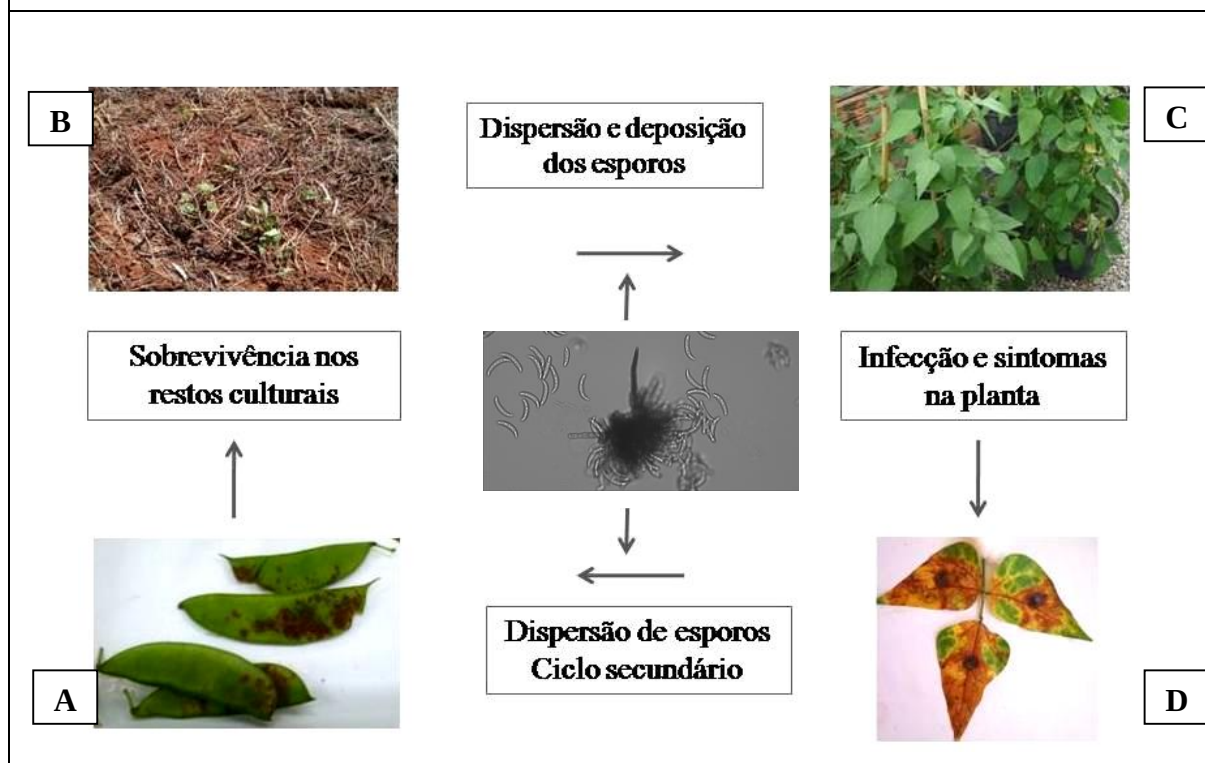
O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella* Stonem.) foi estabelecido por Corda, em 1831. Sua estrutura é formada por acérvulos, ou seja, células conidiogênicas, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou rósea. Os conídios são ovais a oblongos ou ovais ou falcados, produzidos nos acérvulos e estão envolvidos por uma matriz gelatinosa que os protege da dissecação. Apresentam setas que podem ser longas, septadas de pigmentação escura com tons amarronzados. Seu micélio é hialino e septado, o apressório se forma na extremidade do tubo germinativo do conídio ou das hifas e podem ser hialinos ou melanizados, atuam como órgãos de sobrevivência. A reprodução pode ocorrer pelo processo sexual, homotáticos (auto-fértil) ou assexual, heterotáticos (auto-estéril). Seu teleomorfo *Glomerella* pode ter reprodução auto-fértil e fertilização cruzada dentro de uma mesma espécie (MENEZES, 2006; VAILLANCOURT et al., 2000).

O ciclo de vida do patógeno é hemibiotrófico, com o estabelecimento de uma fase biotrófica seguida da fase necrotrófica (figura 2). Para estabelecer uma relação de parasitismo compatível, o fungo produz inicialmente sobre a cutícula do hospedeiro, um apressório melanizado e após a penetração, hifas primárias, sem causar a morte das células (fase biotrófica). Posteriormente, hifas secundárias são formadas e se espalham matando as células do hospedeiro (fase necrotrófica) com início entre 48 a 72 horas após a inoculação dependendo das condições ambientais serem favoráveis ou não. O tempo para aparecimento de sintomas está relacionado com o comportamento hemibiotrófico do gênero resistência do hospedeiro e virulência do isolado (MÜNCH et al., 2008; CHONGO; GOSSEN; BERNIER, 2002).

A colonização ocorre por meio de enzimas e toxinas excretadas pelo micélio que degradam os componentes da parede celular, causando decomposição e promovendo o desenvolvimento de sintomas e das estruturas de reprodução do patógeno (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). A disseminação do patógeno na cultura pode ocorrer de forma rápida quando não se tem um controle efetivo da doença visando reduzir o potencial

de inóculo. Ventos, respingos de chuva e irrigação por aspersão são fatores favoráveis à dispersão de esporos dos órgãos infectados (YANG et al, 2009; KIMATI,1997).

Figura 2 – Ciclo evolutivo do patógeno causador da antracnose da fava. A – órgãos infectados, ciclo primário da doença, B – sobrevivência e dispersão dos esporos do patógeno, C – fase biotrófica, D – fase necrotrófica e reinício do ciclo.



Fonte: o autor.

Algumas espécies de *Colletotricum* em fava tem sido identificadas no Nordeste do Brasil pelas suas características culturais, morfológicas e moleculares. Isolados de *C. truncatum* obtidos de folhas de feijão-fava no Estado do Piauí foram identificados pelas suas características morfológicas e culturais. Os isolados apresentaram conídios hialinos, unicelulares, falcados com ápices afilados e dispostos em acérvulos com setas asseptadas de coloração marrom escuro, o tamanho dos conídios variando de 18,31–26,63 μm de comprimento e 2,01–4,06 μm de largura (CARVALHO, 2009).

O gênero possui grande plasticidade morfo cultural e fisiológica. A ocorrência de variabilidade entre isolados de uma mesma espécie quando cultivados no mesmo substrato pode estar relacionada com a presença de raças fisiológicas (COUTO e MENEZES 2004; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006). Devido a essa diversidade genética e

possíveis raças fisiológicas (MEDEIROS et al., 2008), esses fungos tem a possibilidade de aumentar a sua variabilidade patogênica, mudando a reação das cultivares de resistente para suscetível (SPONHOLZ et al., 2006).

A identificação de espécies realizada pela observação das características morfológicas e culturais não tem sido eficientes para identificar espécies do gênero *Colletotrichum* devendo ser associadas a técnicas moleculares e teste de patogenicidade. Mesmo a combinação de ambos, apresenta limitações por não permitir a identificação de raças fisiológicas. (CAI et al, 2009; THAN et al., 2008; ANDRADE et al., 2007; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; MENEZES, 2006). O gene GAPDH tem sido utilizado em muitos trabalhos como medida inicial de diversidade de espécie do gênero *Colletotrichum* (LIMA, N. et al., 2013; COSTA, 2014) e tem sido indicado como *barcode* secundário na identificação de espécies, visto que sua combinação com outros genes pode ser utilizado para distinguir de forma confiável a maioria dos táxons (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

O estudo dos complexos dentro do gênero e através das análises multilocus (CHS-1, ACT, TUB2 e ITS) podem separar espécies em complexos principais que são estabelecidos com base na análise filogenética, onde os clados distintos são formados, com espécies geneticamente próximas entre si e cada clado corresponde a um complexo. As análises moleculares *multilocus* utilizando os genes GAPDH, ACT, CHS-1, TUB2, CAL, HIS3, GS e a região ITS (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al.; 2012a; DAMM et al. 2012b; DAMM et al., 2014; CANNON et al., 2012) associados com os métodos clássicos de taxonomia, tem possibilitado a identificação de novas espécies.

2.4 Manejo da Antracnose

O controle químico pode apresentar pouca eficiência principalmente em condições ambientais favoráveis ao estabelecimento da doença, além da resistência de espécies de *Colletotrichum* a alguns princípios ativos já relatados (TANAKA; PASSOS; BETTI, 1997; HADDAD; MAFFIA; MIZUBUTI, 2003). Outro problema é a existência de um complexo de espécies e raças de *Colletotrichum* para muitas hospedeiras (TANAKA; PASSOS, 2002).

A alta variabilidade inter e intraespecífica, associada ao perfil patogênico e gama de hospedeiras das espécies de *Colletotrichum*, dificultam o melhoramento genético, necessitando do desenvolvimento de cultivares que apresentem resistência estável. Por esta razão, a resistência genética é o melhor método de controle. Uma das alternativas para o controle de patógenos de alta variabilidade é a utilização de estratégias que aumentem a diversidade

genética da população hospedeira, por meio do uso de misturas genéticas, que estabilizam a população do patógeno e previnam o surgimento ou a seleção de novas raças (TAPSOBA; WILSON, 1999; GUIMARÃES et al., 1998).

As estratégias disponíveis para o manejo da resistência genética no patossistema são misturas de cultivares, mistura genética, piramidação de genes, multilinhas e rotação de genes. Porém, a elevada variabilidade apresentada pelo patógeno da antracnose e favoráveis condições climáticas dificulta o manejo da doença. Raças de alta virulência são identificadas em várias regiões do país, o que indica a necessidade de um contínuo monitoramento da população local do patógeno (COSTA et al., 2009b; SILVA et al., 2008; CASELA et al., 1997; CASELA et al., 2001; MENDONÇA, 1996).

É importante identificar fontes de resistência em bancos de germoplasma que possuam os genes da resistência de interesse (BEDENDO, 1995). Um gene na planta que confira resistência a um grupo de indivíduos na população do patógeno, mesmo com menor eficiência, é uma ótima estratégia de manejo da doença, pois é feita através de misturas genéticas em populações com hospedeiros de alto grau de resistência à antracnose foliar (TAPSOBA; WILSON, 1999; GUIMARÃES et al., 1998).

A resistência genética é considerada a estratégia de manejo mais eficiente da antracnose. Entretanto, seu uso é dificultado pela variabilidade patogênica apresentada pelo gênero *Colletotrichum*, determinando rápida adaptação do patógeno a cultivares resistentes tornando-os suscetíveis, sendo necessária a introdução de novos alelos de resistência (CHALA et al., 2011; COSTA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; LIMA e MENEZES, 2002; YOUNG e KELLY, 1996; PASTOR-CORRALES et al., 1995; CASELA e FREDERIKSEN, 1994).

Na avaliação da resistência em diversas cultivares, incluindo o feijão-fava, tem sido usada a técnica da folha destacada proporcionando melhor organização do espaço e controle das condições ambientais, não sendo os resultados influenciados pela época ou estação em que se realiza o experimento (SANTOS et al, 2015, CAVALCANTE et al, 2012; CARVALHO, 2009; MEDEIROS, 2009; BEDENDO, 1995; SALGADO; GEPTS; DEBOUCK 1995; RIOS; ANTONIO; RODRIGUES, 1994a; RIOS et al, 1994b). O método foi eficiente para selecionar subamostras de feijão-fava resistentes ou com algum grau de resistência à antracnose, uma amostra altamente resistente UFPI-503 e três amostras moderadamente resistentes UFPI-237, UFPI-466 e UFPI-134 (SANTOS et al., 2015). O método mostra-se mais eficiente que a avaliação de campo em discriminar genótipos com resistência (CARMO et al, 2015). As avaliações tem mostrado variabilidade para o caráter resistência em acessos de *Phaseolus lunatus* (CAVALCANTE et al, 2012; CARVALHO, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia, Genética e Clínica Fitossanitária do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) localizado no km 85 da BR 104 Norte em Rio Largo no período de Setembro de 2014 a Dezembro de 2015.

3.1 Material Vegetal

As sementes de *Phaseolus lunatus* (Feijão-fava) utilizadas neste estudo foram obtidas de produtores de Arapiraca/AL, São João/PE, Areia/PB e do banco ativo de germoplasma das Universidades Federais de Pernambuco – UFPE e do Piauí – UFPI (tabela 1). Todos os genótipos de feijão-fava utilizados no experimento foram caracterizados morfoagronomicamente segundo descritores para espécie e pela resistência a antracnose em campo (SILVA NETO, 2010).

Tabela 1- Procedência dos genótipos de *Phaseolus lunatus*

Genótipos	Resistência	Procedência
G 10	AS	Arapiraca, AL
G 17	AS	São João, PE.
G 22	S	Areia, PB
G 32	R	UFRPE ¹
G 62	R	UFRPE ¹
G 65	AR	UFPI ²
G 69	R	UFPI ²

¹Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

²Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

Os genótipos foram semeados em vasos contendo 4,0 Kg de terra não autoclavada, com três sementes por vasos, sendo mantida apenas uma após desbaste. Os vasos foram mantidos em condições de casa de vegetação. As folhas utilizadas nos testes foram obtidas após 50 dias da semeadura, sendo selecionadas folhas aparentemente saudáveis e sem apresentar sintomas de doença ou lesão aparente de cada vaso para realização dos ensaios.

3.2 Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados foram obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal da Universidade Federal de Alagoas. Foram coletados de plantas de feijão fava (*P. lunatus*) apresentando sintomas típicos de antracnose nas vagens, folhas e semente (tabela 2). O isolamento foi realizado no ano de 2012, a partir de coletas realizadas em cinco municípios produtores de feijão-fava do estado de Alagoas, Rio Largo, Murici, Messias, São José da Laje e União dos Palmares. Todos os isolados foram caracterizados morfológicamente segundo o aspecto da colônia, setas, conídios, apressórios e pela análise da sequência genômica da região ITS. As culturas monósporigas foram obtidas a partir do cultivo em BDA (batata 20%, dextrose 2% e ágar 1,5%, pH 7,0) e os isolados foram mantidos pelo método *castelani* (LIMA, J. 2013).

Tabela 2 - Descrição dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Local de origem	Lesão
ICT01	Messias	Vagem
ICT03	São José da Laje	Vagem
ICT04	São José da Laje	Vagem
ICT05	União dos Palmares	Vagem
ICT06	União dos Palmares	Vagem
ICT07	Murici	Folha
ICT11	Murici	Vagem
ICT12	Murici	Vagem
ICT13	Murici	Folha
ICT17	Messias	Vagem
ICT18	Rio Largo	Folha
ICT20	Rio Largo	Semente

A recuperação dos isolados foi realizada com a introdução dos discos contendo as estruturas dos isolados mantido no método *castelani* (CASTELANI, 1967) em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura BDA (DHINGRA e SINCLAIR, 1985) e foram mantidos em temperatura ambiente por oito dias após o qual foram utilizados para realização dos testes.

3.3 Caracterização Morfocultural dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

A caracterização morfológica foi realizada. A caracterização cultural foi realizada após o cultivo em meio BDA. Discos contendo micélio (5 mm) de cada isolado foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e foram mantidos em temperatura ambiente sob fotoperíodo de 12 horas. O aspecto morfológico das colônias foi observado no sétimo dia, levando-se em consideração a topografia da colônia, a coloração dos micélios na colônia e a posição do micelial em relação ao substrato.

A avaliação do índice de crescimento micelial foi realizada através das leituras diárias durante sete dias dos dois diâmetros ortogonais das colônias, com auxílio de um paquímetro. As médias obtidas dos diâmetros serviram para o cálculo no programa ASSISTAT Versão 7.7 beta criado por Silva, F. e Azevedo (2009).

3.4 Caracterização Molecular dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

3.4.1 Extração de DNA total dos isolados

A obtenção de micélios foi feita através do cultivo de discos de cinco milímetros de diâmetro contendo hifas ativas em 200 mL meio BD (20% batata, 2% dextrose) durante sete dias, mantidos à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12 horas. A coleta micelial de cada isolado foi feita por filtração seguida por duas lavagens sucessivas com ADE (água destilada esterilizada) gelada. Os micélios foram secos em papel filtro esterilizado em seguida armazenados em ultrafreezer a -80°C para extração de DNA.

A extração do DNA seguiu o protocolo Doyle-Doyle (1990) com modificações, foi utilizada 1g da massa micelial, transferida para almofariz separadamente, sendo pulverizado em nitrogênio líquido. 0,1g do material foi armazenado em *eppendorf* de 2 mL e adicionado 650 μL de tampão de extração (50 mM de Tris-HCl pH 7,2; 50 mM de EDTA e 3% de SDS) + 0,2% de β mercaptoetanol + 0,05% de proteinase K e colocados em tubos de *eppendorf* de 1,5 cada amostra. Em seguida as amostras foram agitadas vigorosamente e mantidas por 60 minutos em banho-maria a 65°C com agitação em intervalos de 10 a 15 minutos. Adicionou-se 650 μL de CIA (24:1) à mistura que foi centrifugada a 12.000 rpm por 8 minutos a 4°C . A fase aquosa (sobrenadante) foi retirada e colocada em novos tubos de 1,5 mL; com adição de 650 μL de CIA (24:1) + 200 μL de CTAB 10% (tampão de extração sem β mercaptoetanol e proteinase K) agitado vigorosamente; e mais uma vez centrifugado a 12.000 rpm por 8 minutos a 4°C . A

fase aquosa foi coletada e novamente transferida para tubos de 1,5mL; adicionado a 650 μ L de isopropanol gelado, repousando por 60 minutos a -20°C.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao tubo 1 mL de etanol 70%. Fez uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Retirou-se todo líquido dos tubos, sendo postos para secar em temperatura ambiente e invertidos sobre papel absorvente na capela para fluxo químico até evaporação completa do álcool. Logo em seguida, adicionou-se 30 μ L de TE com RNase, incubou-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos até dissolver o precipitado. O material foi etiquetado e armazenado no ultrafreezer a -20 °C até o momento da PCR. A qualidade do DNA foi determinada após eletroforese de 10% da amostra inicial em gel de agarose 0,8%. A eletroforese correu a 3Volts.cm⁻¹ durante 120 minutos. Os fragmentos foram visualizados após exposição em luz ultravioleta e arquivados digitalmente sob forma de imagens registradas através do sistema de foto documentação (Single UV M-20, UVP®).

3.4.2 Amplificação via PCR do gene GAPDH

O DNA obtido a partir de cada isolado foi utilizado em reações de amplificação por PCR da sequência que codifica para o gene GAPDH. As reações de PCR foram realizadas com tampão 2,5 μ L de 10X, MgCl₂ 50 mM, DNTP's 10 mM, 10 μ M de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1 μ L de DNA (25 ng. μ L⁻¹). O volume final das reações foi ajustado para 30 μ L com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems* (2720 *Thermal Cycler*) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 4 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento), e 72°C por 1 min (extensão); e um ciclo final à 72°C por 7 min, para o gene GAPDH. Para o gene TUB2, a desnaturação inicial consistiu em de 95°C por 4 min e 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 7 min por 72°C. E para a região ITS, a desnaturação inicial foi de 95°C por 2 min e 38 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 10 min por 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi enviado para purificação e sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados na amplificação.

3.4.3 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas após sequenciamento de cada isolado foram montadas com o software *Staden Package*, e composição de nucleotídeos analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Sequências parciais obtidas para o gene GAPDH foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), e também comparadas com sequências no banco de dados Q-Bank *Fungi* para determinar quais as espécies fúngicas compartilharam maior identidade de sequência. A identificação preliminar dos isolados aconteceu através da construção da árvore filogenética bayesiana com as sequências parciais do gene GAPDH (tabela 3) e sequências adicionais disponíveis no GenBank (tabela 4).

Tabela 3 - Descrição do *primer* GAPDH usado para identificação do gênero *Colletotrichum*.

Gene	Primer	Sequencia (5' - 3')	Referências
GAPDH	GDR	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003
	GDF	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	

O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foram preparados para o conjunto de dados GAPDH utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2011). A análise de Inferência Bayesiana (BI) para o conjunto de dados GAPDH do complexo *C. truncatum* foi realizada empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), no web portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012).

Tabela 4 - Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.

Espécies	Nº acesso da cultura	Nº de acesso do GenBank
		GAPDH
<i>C. aenigma</i>	C1256	JX009913
<i>C. aeschynomenes</i> *	3-1-3	JX009930
<i>C. alatae</i> *	C1275	JX009990
	C1276	JX010011
Continua		

Continuação da Tabela 4

	C824	JX010028
<i>C. alienum</i> *	C1189	JX010018
	C1315	JX010053
<i>C. asianum</i> *	C1187	JX009915
<i>C. xanthorrhoeae</i> *	CBS 127831	JX009927
<i>C. ti</i> *	ICMP 4832	JX009952
<i>Glomerella cingulata</i> f.sp. <i>camelliae</i> *	ICMP 10643	JX010119
<i>C. dianesei</i> *	CMM4083	KC517194
<i>C. endophytica</i>	DNCL075	KF242181
<i>C. grevilleae</i>	CBS 132879	KC297102
<i>C. gossypii</i>	CML 2379	JX847010
<i>C. gossypii</i>	CML 2374	JX8470091
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839	AFO60560
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN 3	GQ856759
<i>C. orbiculare</i>	CBS 107.17	KF178489
	CLTA-01	HM131501
<i>C. jasmini-sambac</i>	LLTA-01	HM131497
	C1266	JX010012
<i>C. kahawae</i> *	C1275	JX010042
	-	KF452016
<i>C. communis</i>	-	KF452017
	GZAAS5.09506	JQ247609
<i>C. murrayae</i> *	GZAAS5.09538	JQ247608
	CBS116870	JX010050
<i>C. musae</i> *	C1266.11	JX010015
	C1275.24	JX009972
<i>C. nupharicola</i> *	C1275.25	JX009936
<i>C. lindemuthianum</i>	CBS 131.57	JX546708
	CBS 132882	KC297009
<i>C. proteae</i> *	CBS 134301	KC842379
	ICMP 1778	JX009934
<i>C. queenslandicum</i> *	C956	JX010036
<i>C. salsolae</i> *	C1314	JX009916
	C1282.4	JX010005
<i>C. aotearoa</i> *		C296992
<i>C. clidemiae</i> *	C1317.1	JX009989
<i>C. fruticola</i> *	C1315.3	JX010033
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 95397	FJ972582
<i>C. siamense</i> *	C1315	JX009924
	C1316	JX010006
<i>C. theobromicola</i> *	C1275	JX010024
	C1270	JX009962

Continua

Continuação da Tabela 4

<i>C. tropicale</i> *	C5101	JX010007
	C1272	JX010020
<i>C. viniferum</i> *	YG4	JN412798
	GG4	JN412800
<i>C. truncatum</i> *	CBS 151.35	GU228254

* Espécie tipo. GAPDH: *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*.

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para os dados de cada região genômica usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações, para cada conjunto de dados. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise, como uma fase de *burn-in*. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA; YANG, 1996) foram determinados a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (beast.bio.ed.ac.uk/Tracer). As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

3.5 Teste de Patogenicidade

Nos testes de patogenicidade dos doze isolados de *C. truncatum* foram utilizados genótipos de fava com resistência conhecida à antracnose em campo. O genótipo G10 é altamente suscetível (AS) e genótipo G65 é altamente resistente (AR). As folhas trifolioladas destacadas e assintomáticas dos genótipos foram inoculados com a criação de lesões. Inicialmente foi feita uma seleção de isolados que apresentasse maior agressividade nos genótipos G10 (AS) e G65 (AR) em folhas destacadas a temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos seguindo a metodologia utilizada para folhas destacadas em câmara úmida (CARMO et al, 2015; CAVALCANTE et al, 2012; SERRA et al, 2011; CARVALHO; MCKAY et al, 2009; SILVA et al, 2006; ROCHA; OLIVEIRA; MENEZES, 1998).

As folhas selecionadas se caracterizaram por estarem completamente expandidas, sadias e com aproximadamente a mesma idade, retiradas de uma mesma altura de cada planta, algumas horas antes da inoculação, lavadas com sabão e água corrente, seguidas de duas lavagens em água destilada e secas a temperatura ambiente, acondicionadas sobre placas de Petri (90 x 90

milímetros) esterilizadas com chumaço de algodão no pecíolo umedecido com 50 mL água destilada e autoclavada (ADE) para evitar a murcha dos folíolos. Todos os folíolos foram dispostas em caixas plásticas medindo 40 x 28 cm fechada com tampa plástica transparente, ambas de polipropileno (PP), forrada com espuma umedecida com 200 mL de ADE para manter a umidade do local, constituindo um bloco formado pelos genótipos de fava G10 e G65 como os respectivos grupos de isolados avaliados e suas testemunhas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições (figura 3).

Figura 3 – Disposição dos blocos para avaliação da patogenicidade em câmara úmida. A – montagem dos blocos, B – câmara úmida, AR- genótipo altamente resistente G65, AS – genótipo altamente suscetível G10, ICT – isolados de *Colletotrichum* spp., T – testemunhas.



Fonte: o autor.

No ensaio foram utilizados doze isolados do gênero *Colletotrichum* patogênicos a *P. lunatus* mantidos em meio BDA por oito dias e transferidos para meio AA (20 g de ágar e água destilada, 1000 mL) para produção do inóculo. Os discos de micélio-ágar, colonizados pelo fungo medindo cinco milímetros e retirados da extremidade do crescimento micelial com dez dias de cultivo, foram depositados na superfície dos folíolos no teste de patogenicidade

(CORRÊA et al, 2011; NASCIMENTO; NERY; RODRIGUES, 2008; LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003; ROCHA; OLIVEIRA; MENEZES, 1998).

O inóculo foi colocado sobre a nervura central das folhas totalmente expandidas e sobre os ferimentos mecanicamente causados por agulha estéril. A folha controle foi mantida sob as mesmas condições, constando de áreas com ferimento somente como o disco de AA estéril visando à seguridade de já haver ou não a doença pré-instalada, em estado latente ou contaminação de algum dos meios utilizados (LOPES, 2013; JELEV et al, 2008; THAN et al, 2008; LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003; NECHET; ABREU, 2002).

O isolados coletados nos municípios de Messias (ICT01, ICT17), São José da Laje (ICT03 e ICT04), União dos Palmares (ICT05 e ICT06), Murici (ICT07, ICT11, ICT12, ICT13) e Rio Largo (ICT18 e ICT20) foram confrontados com os genótipos de fava G10 (AS) e G65 (AR) para obtenção de dois isolados mais agressivos. A severidade foi avaliada no sétimo dia pelas médias das medidas das lesões com paquímetro em dois eixos ortogonais da lesão e média ponderada dos três folíolos (LOPES, 2013; SERRA; COELHO; MENEZES, 2008; ALMEIDA; COELHO, 2007; MORAES, 2006; LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003). O experimento foi inteiramente casualizado e realizado em blocos de cinco repetições, analisado estatisticamente pelo programa de análise de variância ANAVA – SISVAR, versão 5,6 (FERREIRA, 2014) e teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade.

3.6 Teste de Resistência nos Genótipos de Feijão-fava

O teste de resistência foi conduzido com cinco genótipos de fava resistentes (G32, G62 e G69), suscetível (G22) e altamente suscetível (G17) e com dois isolados mais agressivos selecionado entre 12 isolados após avaliação em genótipos de fava altamente suscetível (G10) e altamente resistente (G65). O preparo do material vegetal, do inóculo e a montagem do experimento se deu como citado anteriormente para o teste de patogenicidade e sob as mesmas condições experimentais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfocultural dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

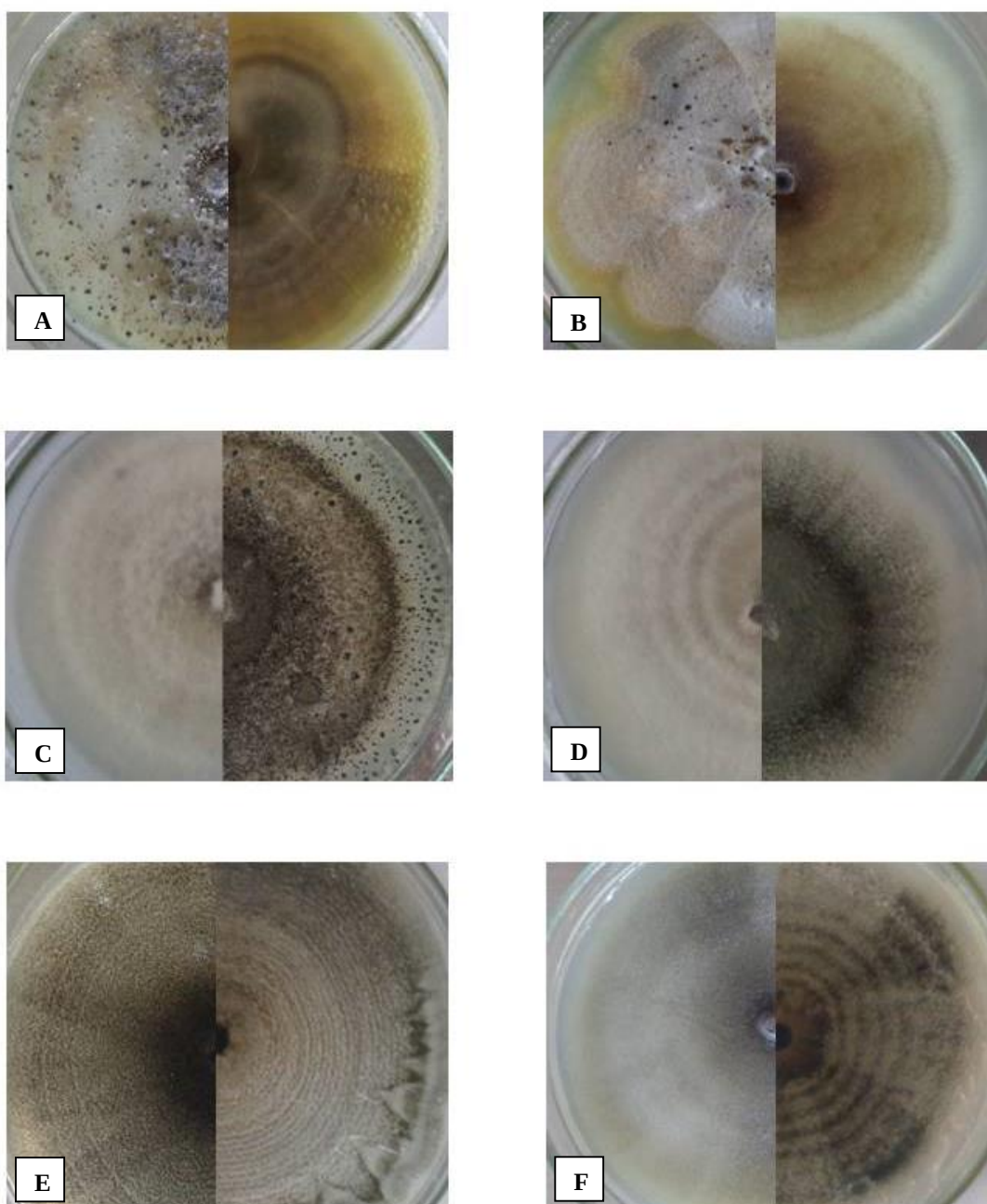
O índice de crescimento micelial dos isolados variou de 3,7 cm a 7,9 cm e foi observado nas culturas micélio com coloração marrom, cinza, verde escuro e creme no centro. As bordas apresentaram coloração branca, creme, verde e verde-escuro e algumas culturas com peritécios em aglomerado nas bordas. O tipo crescimento observado foi o setorial com áreas intercaladas de micélios claro e escuro. O crescimento tipo estrelar foi observado em uma das culturas. Na topografia as colônias variaram no tipo de micélio como reduzido, moderado, abundante e aéreo. (Tabela 5).

Tabela 5 - Índice de crescimento micelial, cor da colônia, topografia de *Colletotrichum* spp.

Isolado	ICM	Cor da colônia	Topografia
01	5.37	Marrom no centro, branco creme nas bordas, com esporulação nas bordas	Micélio reduzido
17	7.28	Marrom esverdeado no centro, creme nas bordas, esporulação nas bordas, crescimento setorial	Micélio moderado
03	5.70	Marrom creme no centro, creme nas bordas, esporulação nas bordas, crescimento setorial	Micélio abundante
04	4.20	Marrom no centro, branco creme nas bordas	Micélio aéreo
05	7.90	Creme no centro, branco nas bordas	Micélio aéreo
06	6.00	Cinza no centro, marrom e verde nas bordas, esporulação nas bordas	Micélio moderado
07	3.70	Creme no centro, branco nas bordas	Micélio moderado aéreo
11	6.53	Cinza no centro, verde nas bordas	Micélio moderado
12	5.53	Verde escuro no centro, branco nas bordas, esporulação nas bordas e crescimento setorial	Micélio reduzido
13	7.57	Creme no centro, verde nas bordas, crescimento estrelado	Micélio reduzido
18	6.30	Cinza no centro, branco nas bordas	Micélio moderado
20	6.91	Creme no centro, verde escuro nas bordas, crescimento setorial	Micélio reduzido
%CV = 2.71			

As colônias dos isolados ICT03, ICT12, ICT17 e ICT20 de *Colletotrichum* spp. apresentam a formação de crescimento setorial e o isolado ICT 13 forma estrelar nas bordas da colônia (figura 4).

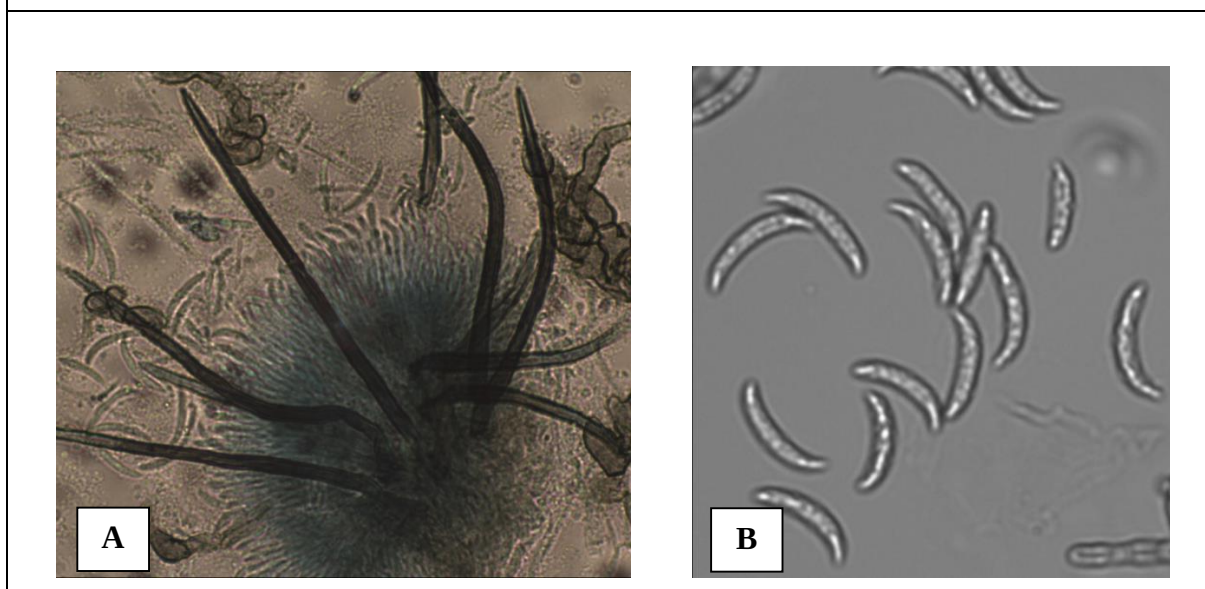
Figura 4 - Aspecto morfo culturais das colônias de *Colletotrichum* spp. cultivadas em meio BDA. A – ICT01 e ICT17 (Messias), B – ICT03 e ICT04 (São José da Laje), C – ICT05 e ICT06 (União dos Palmares), D – ICT7 e ICT11 (Murici), E – ICT12 e ICT13 (Murici), F – ICT18 e ICT20 (Rio Largo).



Fonte: o autor.

A heterogeneidade cultural foi observada quando os isolados foram cultivados em meio de cultivo BDA neste trabalho, o mesmo foi observado no crescimento em meio AVA (aveia, ágar) para estes isolados de *C. truncatum* e nas características morfológicas os conídios apresentaram tamanhos variando entre 17,18– 22,64 μm de comprimento por 2,19 - 2,47 μm de largura, hialinos, falcado, unicelular, com ápices afilados dispostos em acérvulos com setas. Os apressórios globosos, clavados e/ou ovalado, medindo 8,79 - 11,27 μm de comprimento e 5,22 - 7,88 μm de largura. Setas abundantes, de comprimento 2,75 - 5,35 por 50,70 - 83,95 μm , septadas de coloração marrom-escuro (Figura 5) (LIMA, J. 2013).

Figura – 5: Estruturas de *Colletotrichum* spp. Setas (A), conídios (B) Barra = 16 μm .



Fonte: LIMA, J. 2013

Na avaliação da diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum* em mangueira, observou-se em suas características culturais que os isolados apresentaram diversidade em relação à cor de suas colônias (SERRA et al, 2011). A diversidade morfológica e cultural é uma característica observada em isolados do agente causal da antracnose no feijão-fava. As características morfológicas e culturais dos isolados apresentam variação de acordo com o isolado e as condições de cultivo, sendo compatíveis com as descritas para a espécie (CARVALHO 2009).

A caracterização cultural em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* indica a formação de crescimento setorial mais claro e de superfície aveludada em sua colônia crescendo

em meio BDA e a forma perfeita *G. cingulata* f.sp. *phaseoli* mostra colônias apresentando peritécios em aglomerado (SOUZA; SOUZA; COSTA, 2007).

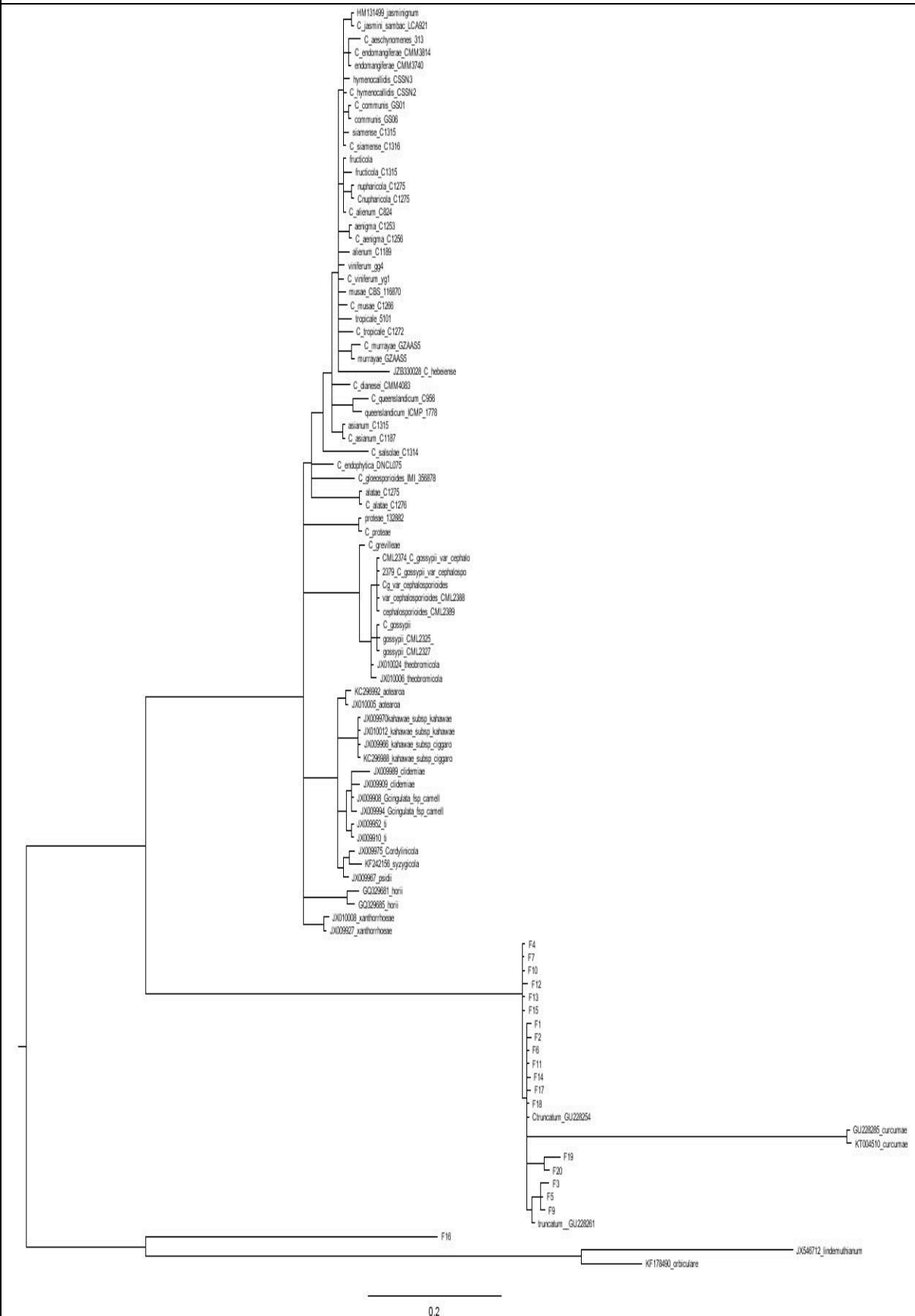
A diversidade nas cores das colônias, crescimento setorial e peritécios em aglomerado nas bordas também foram observados em culturas de *Colletotrichum sp* isoladps de fava e mangueira (SERRA el al, 2011; CARVALHO 2009; SOUZA; SOUZA; COSTA, 2007). A ocorrência de variabilidade entre isolados de uma mesma espécie quando cultivados no mesmo substrato pode estar relacionada com a presença de raças fisiológicas (COUTO E MENEZES, 2004). A identificação da(s) raça (s) predominante na região é importante para direcionar programa de seleção de genótipos resistentes (NECHET et al.,2004).

A coloração e morfologia das colônias dos isolados de *C. truncatum* variaram entre os meios de cultura (MAYONJO E KAPOORIA, 2003). Em BDA, apresentaram-se cinza-claro a cinza-esverdeado com reverso preto, micélio aéreo escasso e submerso com formato estrelar, com abundante produção de conídios em massa mucilaginosa de coloração variando de branca leitosa a amarelo pálido. O cultivo em meio FDA (feijão, dextrose, ágar), as colônias inicialmente apresentaram micélio aéreo cotonoso e branco acinzentado nas bordas e cinza escuro no centro; no reverso da colônia com pontuações escuras. Progressivamente com a idade da cultura, o micélio cobriu levemente os conídios em massa amarelo pálido a salmão.

4.2 Caracterização Molecular dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados utilizados foram inicialmente identificados a partir da análise da região ITS (LIMA, J. 2013) e foi verificado a presença de três espécies distintas de *Colletotrichum* spp. (*Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum dematium* e *Colletotrichum capsici*). A região ITS não tem resolução suficiente para distinção de espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo importante utilizar filogenia multigene para identificação precisa dos isolados deste gênero (WHITE et al., 1990; CAI et al., 2009). A análise com outros marcadores possibilitou a identificação com maior exatidão das espécies de *Colletotrichum* spp (Figura 6).

Figura 6 - Árvore filogenética dos isolados de *Colletotrichum* spp.



Através da análise filogenética da região ITS, do gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina (TUB2) foi possível identificar a espécie *C. truncatum* nos doze isolados obtidos no Estado de Alagoas. Todos os isolados pertencem ao complexo *C. truncatum*.

A análise filogenética com sequenciamento parcial do gene GAPDH de isolados obtidos Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí revelou a presença de múltiplas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da fava (CAVALCANTE et al, 2015). Os isolados estudados agruparam-se dentro dos complexos *C. dianesei*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. brevisporum* e *C. truncatum* sendo este último prevalente nas áreas estudadas. Observou-se que alguns isolados não agruparam-se em nenhum dos complexos existentes, evidenciando a grande diversidade que ocorre nesse patossistema. Na identificação de *Colletotrichum* spp. associados a leguminosas, a análise filogenética molecular multilocus de 50 isolados obtidos nessas culturas por comparações de sequências de DNA de seis genes (ITS, ACT, Tub2, CHS-1, GAPDH e HIS3) separou os isolados em três complexos distintas; *C. truncatum*, *C. dematium* e *C. gloeosporioides* (MAHMODI et al, 2014b).

Isolados causadores de antracnose foliar em mangueira foram identificados pelo sequenciamento de diferentes regiões genômicas (SALCEDO, 2013). A amplificação da região que codifica o GAPDH e permitiu associar os isolados em três complexos, são eles: complexo *C. Acutatum*, complexo *C. Gloeosporioides* e complexo *C. Boninense*. Na avaliação das espécies do complexo *C. Acutatum* foram utilizadas sequências ITS, sequências parciais dos genes da actina (ACT), beta-tubulina (TUB2), quitina sintase (CHS-1) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As espécies do complexo *C. gloeosporioides* e *C. boninese* utilizaram-se as regiões ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, e sequências parciais do gene da calmodulina (CAL).

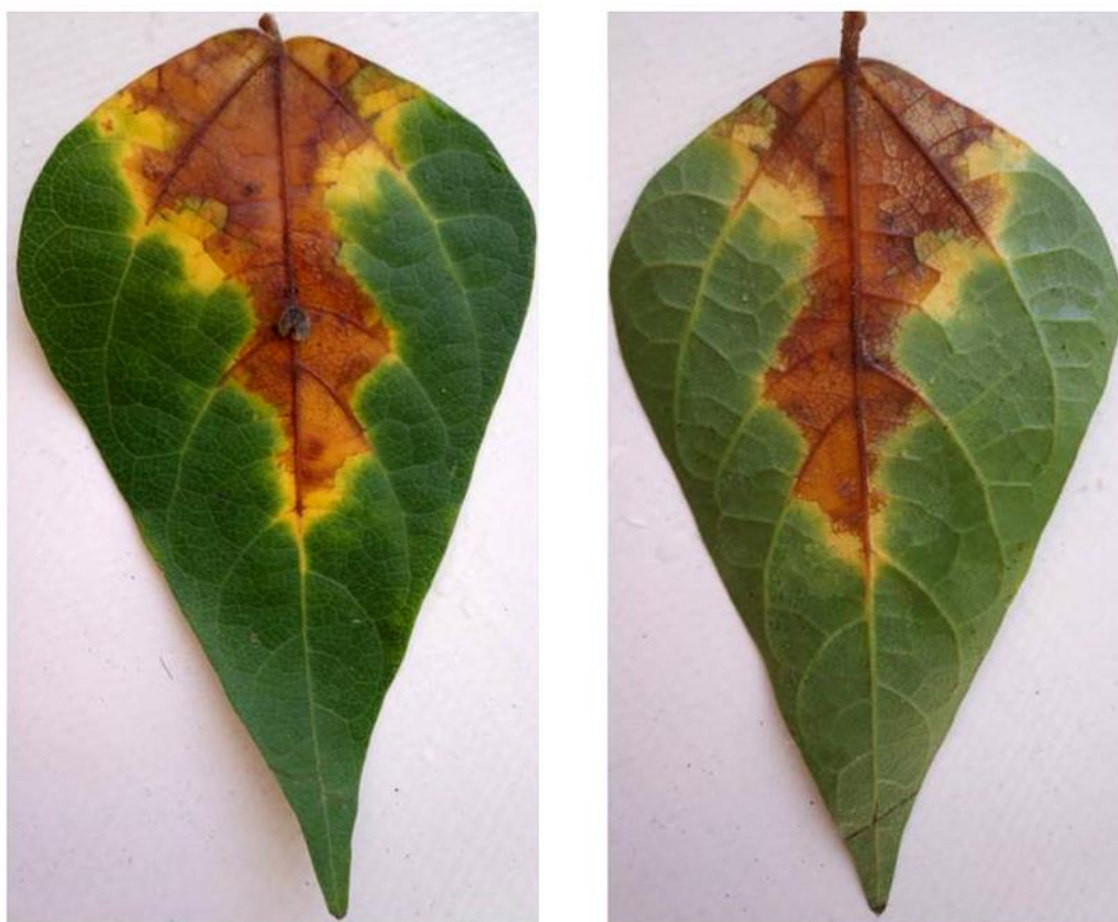
O sequenciamento parcial do gene da actina, β -tubulina, calmodulina, GAPDH e região ITS-rDNA, identificou quatro espécies já descritas (*Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum tropicale*, *Colletotrichum karstii*) e classificou uma nova espécie (*Colletotrichum dianesei*) (DAM et al., 2009). Todas porém, descritas pela primeira vez em manga no mundo.

4.3 Teste de Patogenicidade

No teste de patogenicidade, as folhas utilizadas apresentaram lesões típicas de antracnose. As lesões apresentaram tamanhos variáveis dependendo da agressividade apresentada pelo isolado. As manchas foliares se apresentam com manchas de coloração

marrom-escuro e deprimidas, ou manchas marrom-avermelhada e deprimidas no centro com aspecto encharcado (figura 7). Em soja os sintomas de antracnose nas folhas apresentaram lesões marrom-escuras e escurecimento ao longo das nervuras, na parte inferior e necrose (HENNIN et al (2005).

Figura 7 – Folíolos de fava apresentando sintoma causado pelo fungo *C. truncatum* apresentando lesões foliares de coloração marrom, deprimida crescendo ao longo das nervuras após inoculação dos discos de micélio com fermento.



Fonte: o autor.

Observou-se a formação de frutificações negras do patógeno, crescendo a partir do local onde se localizou o disco contendo as estruturas do patógeno e ao longo das nervuras da folha (figura 8). Lesões semelhantes com formação de massa conidial foram observadas sobre folhas destacadas de cajueiro e mangueira (SERRA; COELHO; MENEZES, 2008). Também em

feijão caupi foi observado as lesões causadas por *Colletotrichum truncatum* além das manchas de coloração marrom-escura nas folhas com a ocorrência de corpos de frutificações e presença de setas escuras (SPONHOLZ et al, 2006).

Figura 8 – Folíolos de fava apresentando sintoma causado pelo fungo *C. truncatum* apresentando formação conidial a partir do disco e nas nervuras.



Fonte: o autor.

Nos ensaios de patogenicidade do hospedeiro, todos os isolados apresentaram lesões de antracnose cerca de três e quatro dias após a inoculação do patógeno nas folhas com ferimento, nos genótipos G10 e G65, respectivamente, independente do isolado testado. Progredindo na severidade da doença nos demais dias de observações. O aparecimento dos primeiros sintomas é comum aos três dias após inoculação do fungo, seguido pelo progresso da doença com queda de folhas nos dias consecutivos (CARVALHO, 2009; JELEV et al, 2008; THAN et al, 2008).

Fatores como tempo de aparecimento dos sintomas e progresso da doença observados, ocorrem devido ao ciclo do patógeno que se caracteriza por ser hemibiotrófico onde o patógeno tem estágio de infecção biotrófico e necrotrófico. E as lesões marrons nas folhas, comuns da antracnose, apareceram no período de 48 a 72 horas, após a inoculação quando dá-se o início da fase necrotrófica, ocorrendo o aumento na severidade da doença, aos cinco ou sete dias após infecção (MUNCH et al, 2008; CHONGO; GOSSEN; BERNIER, 2002).

Na avaliação da patogenicidade dos diferentes isolados no mesmo genótipo é possível observar que o isolado ICT01 e ICT18 foram os que provocaram menores tamanhos de lesão no genótipo G10 (Tabela 6). Enquanto que os isolados ICT03, ICT07, ICT11 e ICT12 provocaram maiores tamanhos de lesão no genótipo G10, não diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 6 – Tamanho médio de lesão causado por 12 isolados de *C. truncatum* em dois genótipos contrastantes de *P. lunatus*, um altamente suscetível e outro altamente resistente.

Isolados	Região	Genótipos de Fava	
		G10 (AS)	G65 (AR)
ICT12	Murici	5,4 f B	4,28 e A
ICT11	Murici	4,94 ef B	3,96 de A
ICT07	Murici	4,92 ef B	4,32 e A
ICT03	São José da Laje	4,74 ef B	4,06 de A
ICT13	Murici	4,36 de B	3,50 de A
ICT04	São José da Laje	3,72 d A	3,26 cd A
ICT06	União dos Palmares	2,74 c A	2,46 c A
ICT05	União dos Palmares	2,62 bc B	1,44 ab A
ICT17	Messias	2,02 abc A	1,54 b A
ICT20	Rio Largo	1,88 ab B	0,66 a A
ICT01	Messias	1,66 a B	1,02 ab A
ICT18	Rio Largo	1,46 a A	1,26 ab A
CV = 13,20		DMS = 0,8426	Erro padrão = 0,1776

Valores seguidos da mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O isolado ICT20 foi o que proporcionou menor tamanho de lesão no genótipo G65, e os isolados ICT03, ICT07, ICT11, ICT12 e ICT13 foram os que causaram maiores lesões. Quando comparamos os mesmos isolados inoculados em genótipos diferentes, observamos que o

genótipo G65, considerado resistente, apresentou menor tamanho de lesões na comparação com todos os isolados, e os tamanhos das lesões diferiram estatisticamente para os isolados ICT01, ICT03, ICT05, ICT07, ICT11, ICT12, ICT13 e ICT20.

Nos cultivos destes mesmos genótipos de fava no campo, verificou-se a resistência do genótipo G65 e a suscetibilidade a antracnose do genótipo G10. Assim, foi possível selecionar os isolados ICT 07 e ICT 12 (ambos de Murici) (figura 7) para avaliação da resistência em cinco genótipos de fava por apresentarem os maiores tamanhos médios de lesões em teste de patogenicidade nos dois genótipos, onde o comportamento mais agressivo foi determinado pelo maior tamanho de lesão avaliado no teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

A variabilidade na patogenicidade é observada em isolados de *C. truncatum* que infectam pimenteiras (MAHMODI; KADIR; PUTEH, 2014a). A variabilidade também é observável em isolados *Colletotrichum* sp. que possuem diferentes níveis de agressividade em goiabeira (LOPES, 2013) e mangueira (SERRA et al, 2011). A variabilidade genética está associada a patogênica em *C. lindemuthianum* causador da antracnose em feijoeiro (BARCELOS; SOUZA; DAMASCENO E SILVA, 2011). Isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Gaultheria procumbens* L., que diferiam nas taxas de crescimento apresentam variabilidade de patogenicidade. O teste de patogenicidade permitiu realizar uma seleção dos altamente patogênicos para seleção de genótipos resistentes. (NEHRLICH et al, 2010). Isolados de *Colletotrichum falcatum* diferem também quanto a patogenicidade (KUMAR et al, 2010) e está associada com origem geográfica dos isolados. A variabilidade da patogenicidade também é observável entre espécies que apresentam um hospedeiro em comum. As espécies *C. kahawae*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* que causam a antracnose do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) apresentaram variabilidade patogênica e diferenças na sintomatologia (MARQUES, 2009). Isolados de *C. musae*, *C. acutatum* que infectam bananas ‘Prata anã’ diferenciam na patogenicidade enquanto um causa podridões no fruto com 100% de incidência, o outro limita-se a necrose em torno do ponto de inoculação. *C. musae* apresentou maior variabilidade patogênica em seu hospedeiro que foi avaliada pelas médias da área lesionada (MORAES, 2006).

A variabilidade pode estar relacionada com a origem geográfica. Isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo, coletados de três diferentes regiões produtoras do estado de Pernambuco apresentaram variabilidade no teste de patogenicidade associado a regiões onde foram coletados. O teste separou os isolados em dois grupos, um de alta agressividade e outro de baixa agressividade (ALMEIDA; COELHO, 2007). A patogenicidade varia de acordo com o órgão acometido. Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, em frutos verdes de cafeeiro

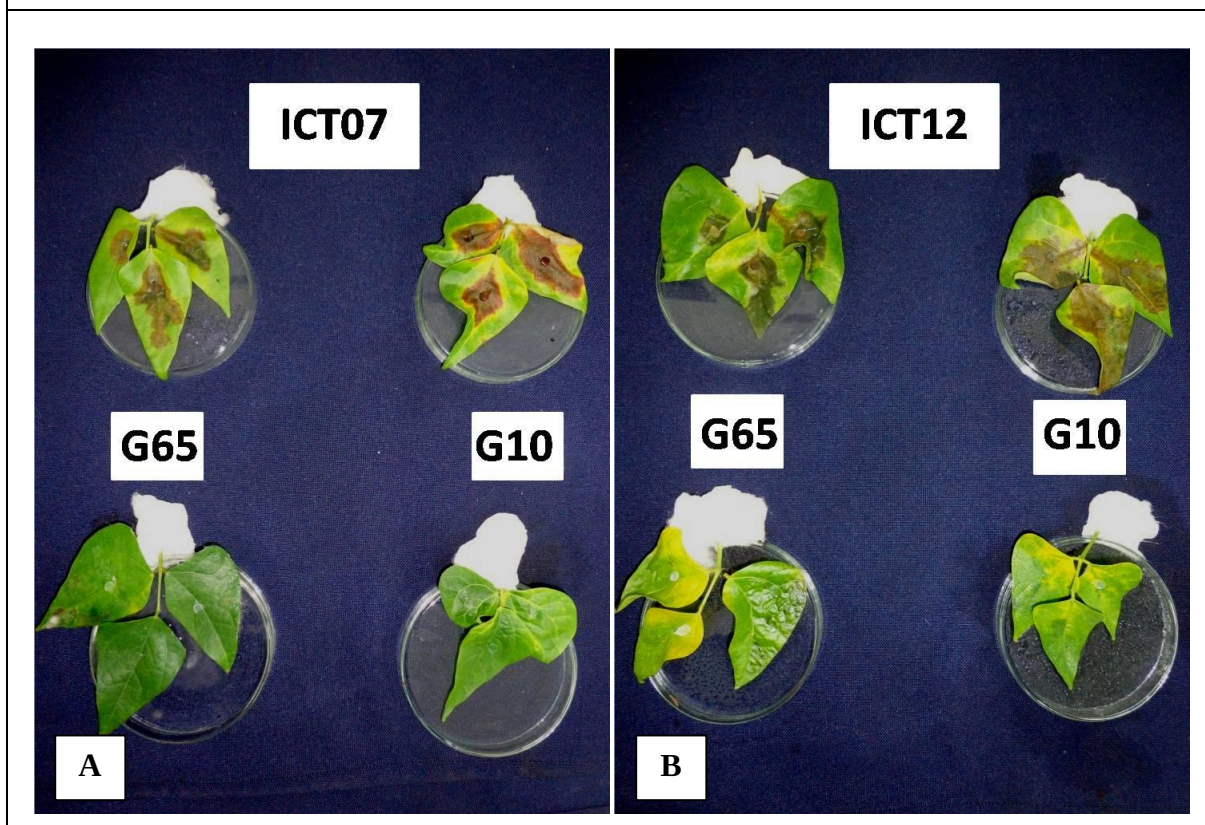
produziram sintomas típicos de antracnose nas bagas, porém, não apresentaram variabilidade estatística na infecção (NGUYEN et al, 2009).

4.4 Teste de Resistência nos Genótipos de Feijão-fava

Na avaliação da resistência utilizou-se cinco genótipos de fava (G17, G22, G32, G62, G69) (tabela 7) que foram desafiados no teste de patogenicidade com os dois isolados mais agressivos (ICT 07 e ICT 12; Murici) na avaliação contra os genótipos de fava G10 e G65 (figura 9). Todos os genótipos de fava desenvolveram os sintomas da doença após o terceiro dia de inoculação e a medida do diâmetro das lesões em dois eixos ortogonais foi realizado somente ao sétimo dia. As reações de feijão-fava à antracnose em genótipos de feijão-fava variaram de altamente resistente (AR) a altamente suscetível (AS), quando foram comparadas as medidas de suas lesões aos cinco e sete dias após a inoculação porque houve progresso da severidade da doença após o quinto dia (CAVALCANTE et al, 2012).

Apesar de terem suas resistências conhecidas à antracnose em campo, os genótipos de fava utilizadas neste estudo foram considerados como resistentes por apresentarem menor tamanho médio de lesões avaliadas no teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. O inverso para os genótipos aqui considerados como suscetíveis, obtendo as maiores lesões diante dos dois isolados utilizados no teste.

Figura 9 - Lesões provocadas pelos isolados ICT07 e ICT12 nos genótipos de feijão-fava G10 (AS) e G65 (AR) ao sétimo dia após inoculação por discos de micélio em folhas destacadas com ferimento. A - isolado ICT07. B - isolado ICT12 e respectivas testemunhas.



Fonte: o autor.

Na análise de patogenicidade com isolados de *C. truncatum* mais agressivos, verifica-se que o genótipo G17, G22, G32 desenvolveram lesões menores quando inoculados o isolados ICT07, e os genótipos G62, G69 obtiveram as maiores lesões. O isolado ICT12 foi menos agressivo aos genótipos G32 e G69. Os genótipos G22 e G62 obtiveram comportamento intermediário quanto a resistência em relação ao isolado ICT12. O genótipo G17 foi o mais suscetível para o isolado ICT12 apresentando as maiores lesões. Na comparação com os mesmos genótipos inoculados com os dois isolados, observamos que o tamanho da lesão só diferiu estatisticamente para o genótipo G17. O único genótipo que se comportou resistente nos dois isolados foi G32. As diferenças observadas atestam a resistência à antracnose do genótipo G32 (NETO, 2010). O genótipo de fava G32 de comportamento resistente em campo também apresenta resistência em teste de patogenicidade em folhas destacadas nas condições de laboratório, podendo ser indicada para posteriores estudos de resistência à antracnose. Nos

demais genótipos a avaliação de campo não foi confirmada. As avaliações de campo foram realizadas em Rio Largo e os isolados coletados nesta região são os menos patogênicos.

Tabela 7 - Tamanho médio de lesão causado por 2 isolados mais patogênico de *C. truncatum* em 5 genótipos *P. lunatus* classificados em avaliação de campo como Resistente (R), Altamente suscetível (AS) e Suscetível (S).

Genótipos	Resistência	Isolados	
		ICT07	ICT12
G62	R	3,30 ab A	2,76 ab A
G69	R	2,44 ab A	2,58 a A
G17	AS	2,14 a A	3,04 bc B
G22	S	1,70 a A	2,22 ab A
G32	R	1,64 a A	1,80 a A

Valores seguidos da mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliações de resistência utilizando 30 sub amostras de feijão-fava provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG de Feijão-fava) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), observaram que a maioria das favas apresentou baixo nível de resistência à antracnose e duas se apresentaram como resistente. Os genótipos foram agrupados em cinco classes de acordo com a resistência estimada por escala de notas (CAVALCANTE et al, 2012). A resistência à antracnose pode ser variável de acordo com as condições de cultivo e nota que em folhas destacadas as plantas foram mais suscetíveis do que no campo (CARMO et al., 2015). A resistência de lentilhas (*Lens culinaris* Medik.) ao *Colletotrichum truncatum* está associada ao desenvolvimento mais lento do patógeno no genótipo resistente e ao maior acúmulo depósitos de compostos fenólicos resultando em lesões menores (CHONGO GOSSEN; BERNIER, 2002). A resistência não altera a fase de infecção assintomática que durou três dias e uma fase destrutiva observada entre três e seis dias após a inoculação.

As plantas exibem resistência natural ao ataque dos patógenos e a ocorrência de doenças. A resistência ou a suscetibilidade de uma planta diante de um fungo e a virulência ou a avirulência do patógeno em relação ao hospedeiro ocorre pela expressão da interação do complexo gênico e citoplasmático de ambos no patossistema. Esta interação caracteriza-se pela luta à própria sobrevivência, em que as células vegetais reagem à penetração do fungo através de vários mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procurando se defender do ataque.

A complexa variabilidade patogênica, morfológica e cultural das espécies do gênero *Colletotrichum* denota a importância do estudo da variação desta interação englobando variados métodos de avaliação (CAI et al, 2009; MENEZES, 2006; PASCHOLATTI, 1995; BEDENDO, 1995; FLOR, 1956).

REFERENCIAS

ABREU, Â. de F. B. Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais. 2005. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**. ISSN: 1679-8869. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/referencias.htm> Acesso em: 30 jan. 2016.

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5 ed. Burlington: **Elsevier Academic Press**, 2005.

ALMEIDA, L.C.C.; COELHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, Recife. V.32, p.318-328, 2007.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.21-31, 2007.

ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C. & SOARES, G. J.D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, n. 1, p. 12-18, Abril 1995.

AZEVEDO, J. N. de.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. (Comunicado técnico 152). **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**. Teresina, p. 1-4, 2003.

BARCELOS, Q.L.; SOUZA, E.A.; DAMASCENO E SILVA, K.J. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.230-242, 2011.

BEDENDO, I.P. Manchas foliares. In: **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). 3 ed., Agronômica Ceres. São Paulo, p.848-858, 1995.

BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Ann. Rev. Plant Pathology**, Paio Alto, v. 32, p. 21-81, 1981.

BEYRA, A.; ARTILES, G.R. Revisión taxonômica de los gêneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae - Papilionoideae) em Cuba. **Anales del Jardín Botânico de Madrid**, v.61, p.135-154, 2004.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, 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.

CARMO, M.D.S.; CARVALHO, E.M.S.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; CAVALCANTE, G.R.S. Avaliação de acessos de feijão-fava, para resistência a *Colletotrichum truncatum*, em condições de folhas destacadas e campo. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.292-297, 2015.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): Caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009. 53 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, F. G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 217-219, 2001.

CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. A.; OLVEIRA, E.; FERREIRA, A. S. Sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, p. 1025-1064, 1997.

CASELA, C.R.; FREDERIKSEN, R.A. Pathogenic variation in monoconidial cultures of *Colletotrichum graminicola* from a single lesion and from monoconidial subcultures. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.149-153, 1994.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTE, G.R. dos S.; LIMA, W.G.; NASCIMENTO, E. de S.; MICHEREFF, S. J.; CAMARA, M. P. S. Complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* associados à antracnose em fava. 2015. Disponível em:

<<http://www.eventosufrpe.com.br/2015/cd/resumos/R1256-1.html>> Acesso em: 10 de Fev. 2016.

CAVALCANTE, G.R. dos S.; CARVALHO, E.M.S.; GOMES, R.L.F.; SANTOS, A.R.B.; SANTOS, C.M.P.M. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.4, p.329-333, 2012.

CHALA, A.; TRONSMO, A.M.; BRURBERG, M.B. Genetic differentiation and gene flow in *Colletotrichum sublineolum* in Ethiopia, the centre of origin and diversity of sorghum, as revealed by AFLP analysis. **Plant Pathology**, v.60, p.474-482, 2011.

CHONGO, G.; GOSSEN, B. D.; BERNIER, C. C. Infection by *Colletotrichum truncatum* in resistant and susceptible lentil genotypes. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 81-85, 2002.

COLATTO, U. L. D. **Reação de progênes de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2010.

CORRÊA, P. R. R.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. DOS; HIGA, A.R. Metodologia de avaliação da agressividade de isolados de *Sphaeropsis sapinea* A *Pinus taeda*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 41, n. 2, p. 347-354, abr./jun. 2011.

COSTA, J. F. de O. **Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas**. 2014. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas (CECA), Rio Largo, 2014.

COSTA, R.V. da; ZAMBOLIM, L.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.; RODRIGUES, J.A.S.; TARDIN, F.D.; CASELA, C.R. Genetic control of sorghum resistance to leaf anthracnose. **Plant Pathology**, v.60, p.1162-1168, 2011.

COSTA, I. F. D.DA; BALARDIN, R.S; MEDEIROS, L.A.M.; LENZ, G.; GULART, C.A.; ZEMOLIN, C.R.; SILVA, T.M.B. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum*. **Tropical Plant Pathology**, Santa Maria, v. 34 , n. 1, p. 47-50, Fev. 2009a.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; LANZA, F. B. Controle químico da antracnose do sorgo. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2009b. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 177).

COSTA, I. F. D. da; BALARDIN, R.S; MEDEIROS, L.A.; BAYER, T.M. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1684-1688, 2006.

COUTO, E.F., MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.406-412, Jul./Ago., 2004.

CRONQUIST, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. **The New York Botanical Garden**, Bronx - NY, p. 555. 1988.

CTSBF - COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira. Florianópolis: **Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de santa catarina - Epagri**, n. 2, p. 157, Mai., 2012. ISBN 978-85-85014-68-1.

DAMM, U. O'CONNELL, R.J.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 49–84, Sept., 2014.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; LIU, F.; BARRETO, R.W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29–59, Jul., 2013.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEMBERG, J.H.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.1-36, Feb, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEMBERG, J.H.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p. 37–113, Aug., 2012b.

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

DEBOUCK, D. G. Systematics and morphology. In: A. van Schoonhoven and O. Voysest (eds.). “Common beans: Research for crop improvement”. **Commonwealth Agricultural Bureaux International**, Wallingford - United Kingdom, 55-118, 1991.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. Boca Raton FL. **CRC Press**, 434 p. 1985.

DIAO, Y. Z.; ZHANG, C.; LIN, D.; LIU, X. L. *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Tomato in China. **Plant Disease**, Beijing - China, v. 98, n. 5, p. 687, Mai., 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. v. 12, n. Focus, p. 13-15, 1990.

EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, p.1-19, 2004.

ELLISON, C. A. et al. *Colletotrichum truncatum* Causing Stem Cankers on *Jatropha curcas* in Burkina Faso. **Plant Disease**, Burkina Faso, v. 99, n. 1, 14-20, 2015.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112 ISSN 1413-7054. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001> > Acesso em: 08 Set. 2014.

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

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. Adv. in Gen, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON, P.R. 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, 872-895, 2003.

GUIMARÃES, G. R. **Diversidade e caracterização morfo cultural, biológica, bioquímica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.** 2011. Monografia (Especialização) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Urutaí, 2011.

GUIMARÃES, F.B.; CASELA, C.R.; SANTOS, F.G. dos; FERREIRA, A.S. Controle da antracnose do sorgo através da utilização de mistura de cultivares. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.131-135, 1998.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de fungicidas para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cebola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 435-437, 2003.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. Manual de Identificação de Doenças da Soja. (Documento 256). **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja**: Londrina, v. 256, 72 p., Jul., 2005. ISSN 1516-781X.

IBGE. Produção Agrícola Municipal - Culturas Temporárias e Permanentes. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE**: Rio de Janeiro, v. 40, 1-102, 2013. ISSN 0101-3963.

INDEX FUNGORUM. 2016. Disponível em:
<<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>> Acesso em: 30 jan. 2015.

IPGRI. Descritores para *Phaseolus lunatus* (Feijão-espadinho). **International Plant Genetic Resources Institute**, Roma, 2001.

JELEV, Z. J.; BOBEV, S. G.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Bulgaria. **Journal of Phytopathology**, 156, 668–677, 2008.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 1997.

KUMAR, N.; JHANG, T.; SATYAVIR; SHARMA, T.R. Molecular and Pathological Characterization of *Colletotrichum falcatum* Infecting Subtropical Indian Sugarcane. **Journal of Phytopathology**, 2010.

LIMA, J. F. de. **Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* agente causal da antracnose do feijão-fava no estado de Alagoas**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. 2013.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.75-88, 2013.

LIMA FILHO, M.R.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.620-625, 2003.

LIMA, M.L.F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.12-16, 2002.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 32, p.488-496, 2007.

LOPES, M.E. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret.** 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MAHMODI, F.; KADIR, J.B.; PUTEH, A. Genetic Diversity and Pathogenic Variability of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Pepper in Malaysia. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 456-465, 2014a.

MAHMODI, F.; KADIR, J.B.; PUTEH, A.; POURDAD, S.S.; NASEHI, A.; SOLEIMANI, N. Genetic Diversity and Differentiation of *Colletotrichum* spp. Isolates Associated with Leguminosae Using Multigene Loci, RAPD and ISSR. **The Plant Pathology Journal**, 30 (1):10-24. doi:10.5423/PPJ.OA.05.2013.0054. 2014b.

MAHMODI, F.; KADIR, J.B.; NASEHI, A.; PUTEH, A. Occurrence of Anthracnose Caused by *Colletotrichum truncatum* on Chickpea (*Cicer arietinum*) in Malaysia. **Plant Disease**, v.97, p.1507, 2013.

MAYONJO, D.M.; KAPOORIA, R.G. Occurrence and variability of *Colletotrichum truncatum* on soybean in Zambia. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, v.33, p.339-341, 2003.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X.; BAUDOIN, J.P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, p. 43-54, 1999.

MARQUES, V.V. **Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. Plant resistance to fungal diseases. Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.161-168, 1997.

MCKAY, S.F.; FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; SEDGLEY, M., COLLINS, G.C.; SCOTT, E.S. Morphological, Genetic, and Pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the Cause of Anthracnose of Almond in Australia. **Ecology and Epidemiology**, Australia, v. 99, n.8, p. 985-995, 2009.

MEDEIROS, J. G. S. **Reação de genótipos de pessegueiro a bacteriose causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni***. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

MEDEIROS, L.A.M.; BALARDIN, R.S.; COSTA, I.F.D.; GULARD, C.A.; LENZ, G. Reação de germoplasma crioulo de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Colletotrichum lindemuthianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n.4, p.273-280, 2008.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

MERCADO-RUARO, PEDRO; DELGADO-SALINAS, ALFONSO. Karyotypic studies on species of *Phaseolus*. (*Fabaceae: Phaseolinae*). **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1–9, 1998.

MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. CIPRES. Website. Disponível em: <http://www.phylo.org/sub_sections/portal> Acesso em: 6 out. 2015.

MÜNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D.S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41–51, Jan., 2008.

NASCIMENTO L. C. DO; NERY, A.R.; RODRIGUES, L.N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 313-319, 2008.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; GIANLUPPI, V.; MEYER, M.C. Avaliação de genótipos de soja em relação à antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e mela (*Tanatephorus cucumeris*) nas condições de Roraima. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa**, Roraima, 2004. 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 02)

NECHET, K.L.; ABREU, M.S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1135-1142, nov./dez., 2002.

NEHRLICH, S.; PLASCHIL, S.; KRÄMER, R.; KÜHN, J. Evaluation of Resistance of *Gaultheria* to *Colletotrichum gloeosporioides*. Proc. 23rd Intl. Eucarpia Symp. (Sec. Ornamentals) on “Colourful Breeding and Genetics” Part II Eds.: J.M. van Tuyl and D.P. de Vries. **Acta Horticulturae**, Germany, 855, ISHS 2010.

NGUYEN, T. H. P.; SAÏLL, T.; BRYNGELSSON, T.; LILJEROTH, E. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, v. 58, p. 898–909, 2009.

NOETZOLD, R. et al. Variabilidade espacial de *Colletotrichum truncatum* em campo de soja sob três níveis de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 40, p. 16-23, Fev. 2014.

PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. In: PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 22, p. 417-453.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.182, p.63-71, 1995.

PENG, L.; YANG, Y.; HYDE, K.D.; BAHKALI, A.H.; LIU, Z. *Colletotrichum* species on citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, v.33, p.267-283, 2012.

PEREIRA, I.S.; SILVA, D. da D.; CASELA, C.R.; TARDIN, F.D.; ABREU, M. de S. Resistência de linhagens genitoras e híbridos simples de sorgo a *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose. **Revista Caatinga**, v.24, p.46-51, 2011.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v.53, p.793-808, 2004.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v.43, p.304-311, 1996.

RIBEIRO, F. E. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum nas regiões norte/nordeste brasileira 2006 - 2008. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**, Aracaju, p. 122, 2009. ISSN 1517-1329.

RIOS, G. P.; ANTONIO, F. G.; RODRIGUES, F. A. Enraizamento de folhas em vermiculita para estudos de doenças foliares. **Fitopatologia Brasileira**, v. v.19, n. (suplemento), p. 268, 1994a.

RIOS, G. P.; BOTELHO, S.A.; SOUZA, C.A.; WATANAKE, M.C. Utilização de folhas enraizadas em vermiculita para avaliação de resistência genética do feijoeiro a doenças da parte aérea. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. (suplemento), p. 315, 1994b.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P.V.M.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, Feb, 2012.

ROCHA, J. de R. de S.; OLIVEIRA, N. T. de; MENEZES, M. Comparison of inoculation methods efficiency for evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenicity on passion fruits (*Passiflora edulis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.41, n.1, p.140-148, mar., 1998.

SALCEDO, S. S. **Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2013.

SALGADO, A.G.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., In the Americas. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 15-28, 1995.

SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M. F.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.37, n.10, p.1407-1412, 2002.

SANTOS, A. R. B.; SIMEÃO, M.; BARROS, P. S.; CAVALCANTE, G. R. DOS S.; CARVALHO, E. M. S. Seleção de subamostras de feijão-fava para resistência à antracnose. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9(3), p. 268-278, 2015.

SCHENA et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. **Plant Pathology**, v. 63, p. 437–446, 2014.

SERRA, I.M.R. di S.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; MONTARROYOS, V.V.; SILVA, D.S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.42-51, 2011.

SERRA, I.M.R. di S.; COELHO, R.S.B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multiespóricos e de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.113-120, 2008.

SHARMA, G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 3, n. 2, p. 194–220. Oct., 2013.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA NETO, J. R. da. **Caracterização morfo-agronômica e avaliação da resistência em acessos de fava ao mosaico dourado e à antracnose Alagoas**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

SILVA, D.D.; CASELA, C.R.; CASTRO, H.A.; SANTOS, F.G.; FERREIRA, A.S. Diversidade populacional de *Colletotrichum sublineolum* em seis localidades no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.149-155, 2008.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P.; SÃO JOSÉ, A.B.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutífera. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 131-133, Abr., 2006.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Piracicaba - SP, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.

SOUZA, B.O. de; SOUZA, E.A.; COSTA, M.C.M. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1000-1006, jul/ago., 2007.

SPONHOLZ, C.; FREIRE FILHO, F.R.; MAIA, C.B.; RIBEIRO, V.Q.; CARDOSO, M. de O. Reação de genótipos de feijão-caupi a *Colletotrichum truncatum*. Teresina: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**, Meio-Norte, 2006. 18 p. (Embrapa Meio-Norte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum. Biology, Pathology and Control*, Wallingford. CAB International, p. 1-26, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p. 2731 – 2739, May, 2011.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 484-488, 2002.

TANAKA A. S.; PASSOS, F. A.; BETTI, J.A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no Estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p.139-146, 1997.

TAPSOBA, H.; WILSON, J.P. Increasing complexity of resistance in host populations through intermating to manage rust of pearl millet. **Phytopathology**, v.89, p.450-455, 1999.

THAN, P.P.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, s.; TAYLOR, P.W.J.; HYDE, K.D. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v. 57, p.562–572, 2008.

TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JUNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p. 77-79, 2006.

VIEIRA, C. Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, 16, v. 174, p. 5-11, 1992.

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

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOY, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: p. 315-322, 1990.

YANG, Y. L.; LIU, Z.Y.; CAI, L.; HYDE, K.D.; YU, Z.N.; MCKENZIE, E.H.C. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 123-146, 2009.