

**FESURV – UNIVERSIDADE DE RIO VERDE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A**  
*Colletotrichum truncatum* **E ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE**  
**ISOLADOS UTILIZANDO A TÉCNICA MOLECULAR RAPD**

**GEOVANA ELIZA GONÇALVES BARROS**  
*Magister Scientiae*

**RIO VERDE**  
**GOIÁS – BRASIL**  
**2008**

**GEOVANA ELIZA GONÇALVES BARROS**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A  
*Colletotrichum truncatum* E ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
ISOLADOS UTILIZANDO A TÉCNICA MOLECULAR RAPD**

Dissertação apresentada à Fesurv –  
Universidade de Rio Verde, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
graduação em Produção Vegetal, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*

**RIO VERDE  
GOIÁS – BRASIL  
2008**

Ficha catalográfica preparada pela Secção de Catalogação e Classificação da Biblioteca  
Central da FESURV

Barros, Geovana Eliza Gonçalves

Avaliação da resistência de genótipos de soja a *colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD. / por Geovana Eliza Gonçalves. 2008.  
63f.; 29,7 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Rio Verde – GO  
“Orientação: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos”

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

**GEOVANA ELIZA GONÇALVES BARROS**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A  
*Colletotrichum truncatum* E ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
ISOLADOS UTILIZANDO A TÉCNICA MOLECULAR RAPD**

Dissertação apresentada à Fesurv –  
Universidade de Rio Verde, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
graduação em Produção Vegetal, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*

**APROVADA: 09 de outubro de 2007**

---

Prof. Dr. Aloísio Sartorato  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Takeshi Kamada  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Alberto Leão Lemos Barroso  
(Banca examinadora)

---

Prof. Dr. Hércules Diniz Campos  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

À Deus,

Aos meus pais, Valdemar e Lúcia,

À minha irmã, Ana Heloísa,

Ao meu amado, Márcio,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hercules Diniz Campos, pelos ensinamentos e orientação.

Aos meus co-orientadores, Dr. Aloísio Sartorato, pesquisador da EMBRAPA e Dr. Takeshi Kamada, professor e pesquisador da FESURV – Universidade de Rio Verde.

Aos servidores da FESURV – Universidade de Rio Verde, Danilo Lima, Francisco, Geliane Cardoso, Lucélia e Rizzia, pela assistência, disposição e amizade.

Aos servidores da Fazenda YPAGEL, Natal e Agripino, pela assistência, disposição e amizade.

À doutoranda, Robertha Garcia, pelo auxílio durante a execução do trabalho de diversidade genética.

Ao meu orientador da graduação, Prof. Msc. Luis Henrique Carregal Pereira da Silva, pelo apoio e incentivo.

Ao CTPA, na pessoa do Dr. José Nunes Júnior, por sugerir e disponibilizar os genótipos utilizados nos ensaios.

À EMBRAPA, na pessoa do Dr. Aloísio Sartorato, por franquear o uso dos laboratórios de Fitopatologia e Biotecnologia.

À FESURV, por disponibilizar os laboratórios de Fitopatologia e de Patologia de Sementes, além da Casa de Vegetação para execução dos ensaios.

Aos meus pais, Valdemar Osvaldo Gonçalves e Lúcia Helena R. Gonçalves, por além de serem os melhores pais do mundo, são meus melhores amigos.

À minha irmã, Ana Heloísa Gonçalves, pela amizade e companheirismo.

Ao meu esposo, Márcio Barbosa de Barros, pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus tios, Jurandir Osvaldo Gonçalves e Elizabeth Lucas M. Gonçalves, pelo apoio e incentivo.

À família Giraldi, João Luiz, Luz Maria, Greice e Graciele, pela amizade e companheirismo.

## **BIOGRAFIA**

GEOVANA ELIZA GONÇALVES BARROS, filha de Lúcia Helena Radigonda Gonçalves e Valdemar Osvaldo Gonçalves, nasceu no dia 18 de novembro de 1983, em Palotina, Paraná. Em julho de 2000, ingressou no Curso de Agronomia da FESURV – Universidade de Rio Verde, graduando-se em Julho de 2004. Iniciou o Curso de Mestrado em Produção Vegetal também pela FESURV – Universidade de Rio Verde, em Julho de 2004, defendendo a dissertação no dia 20 de outubro de 2007.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 A doença – antracnose.....	2
2.2 Hospedeiros suscetíveis e ocorrências mundiais.....	3
2.3 Sintomas nas plantas.....	4
2.4 Condições favoráveis a doença.....	5
2.5 Aspectos morfológicos do <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	6
2.6 Tipos de inoculo.....	6
2.7 Interação patógeno – hospedeiro.....	7
2.7.1 Diferenciação e reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno.....	7
2.7.2 Penetração na superfície do hospedeiro.....	8
2.7.3 Infecção e colonização dos tecidos do hospedeiro.....	9
2.8 O patógeno como hemibiotrófico intracelular.....	10
2.9 Infecção e transmissão de <i>Colletotrichum</i> via sementes.....	12
2.10 Manejo da antracnose da soja.....	14
2.11 Resistência varietal a antracnose.....	14
2.12 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	15
2.13 Marcadores RAPD.....	16
2.14 Vantagens de marcadores RAPD.....	18
2.15 Utilização do RAPD nos estudos de fitopatologia.....	20
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1	
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A <i>Colletotrichum truncatum</i> SOB CONDIÇÕES DE CAMPO.....	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
CAPITULO 2	
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA MOLECULAR RAPD.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Obtenção dos isolados.....	53
2.2 Caracterização molecular dos isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	54
2.2.1 Obtenção da cultura monospórica.....	54
2.2.2 Produção e preparo do micélio.....	55
2.2.3 Extração do DNA.....	55



2.2.4 Reação de amplificação e visualização dos fragmentos de DNA.....	56
2.2.5 Análise dos dados.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4 CONCLUSÕES.....	62
REFERENCIAS.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização das cultivares e linhagens de soja quanto ao ciclo de maturação e população recomendada.....	38
Tabela 2	Tabela de resultados.....	40
Tabela 3	Percentual de grãos infestados ou infectados pelo fungo <i>C. truncatum</i> .....	46
Tabela 4	Identificação dos isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> obtidos de lavouras de soja infestadas de diferentes regiões.....	54
Tabela 5	Tabela de distância genética entre os isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> obtidos de plantas de soja provenientes de regiões produtoras distintas.....	61

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Evolução da incidência média da antracnose (percentual de trifólios lesionados) nos 25 genótipos testados durante os quatro períodos de avaliação em função dos estádios fenológicos..... 44
- Figura 2 Incidência média (percentual de trifólios lesionados) de antracnose nos 25 genótipos, testados em função dos estádios fenológicos em cada grupo de genótipos de acordo com o ciclo reprodutivo..... 45
- Figura 3 Dedograma de dissimilaridade genética de 33 isoladas oriundos dos estados de GO, MT, TO, PR, agrupados pelo método UPGMA com base no coeficiente de Jaccard..... 59
- Figura 4 Projeção gráfica das distâncias genéticas de 33 isoladas de C. T. coletados com lavouras de soja dos estados, com base no coeficiente de Jaccard..... 60

## RESUMO GERAL

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Universidade de Rio Verde, junho de 2008. **Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD.** Orientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos. Co-orientadores: Dr. Aloísio Sartorato e Prof. Dr. Takeshi Kamada.

Embora a resistência genética seja a maneira mais econômica e eficaz de controle de doenças, não há cultivar resistente para a maioria delas, inclusive para a antracnose. Com o intuito de selecionar genótipos de soja com resistência ao *C. truncatum*, foi realizado um ensaio na Fazenda Pindaíbas – YPAGEL, Rio Verde – GO. Foram avaliados 25 genótipos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com parcela útil de 7,2m<sup>2</sup>. A cultivar BRSMT Uirapuru foi utilizada como padrão de suscetibilidade. Foram feitas duas inoculações nas plantas, sendo a primeira no estágio R1 e a segunda 15 dias após a primeira, utilizando uma suspensão de 1,5 x 10<sup>6</sup> conídios/ mL. Os genótipos foram avaliados quanto a incidência da doença nos trifólios e nas vagens; além do nível de infestação nas sementes. Os genótipos BRSGO Luziânia e BRSGO Indiara apresentaram menor porcentagem de incidência de antracnose nos trifólios. Nas vagens, o menor percentual de lesões foi apresentado pela cultivar BRSGO Luziânia. Nas sementes, os percentuais de infestação foram baixos, variando entre 0 e 2%. O genótipo BRSMT Uirapuru, considerado padrão de suscetibilidade apresentou, de modo geral, suscetibilidade média. Embora a antracnose da soja, causada pelo fungo *C. truncatum*, seja considerada como uma das principais doenças da Região do Cerrado brasileiro, podendo causar perda total da lavoura, poucos estudos têm sido realizados para verificar a diversidade genética desse fungo. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar, utilizando a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a diversidade genética de isolados de *C. truncatum* provenientes de lavouras da Região Central do Brasil. Os isolados apresentaram grande variabilidade genética, uma vez que nenhum deles apresentou-se idêntico a outro. A determinação da distância genética entre os isolados possibilitou agrupá-los em três grupos. O agrupamento por similaridade ocorreu em função do local de ocorrência do fungo. O método RAPD foi eficiente no estudo da variabilidade genética dos isolados.

Palavras-chave: *Glycine max*, antracnose, controle.

## ABSTRACT

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Rio Verde University, June of 2008. **Evaluation of the resistance of soybean genotypes the *Colletotrichum truncatum* and study of the genetic diversity of isolated using molecular technique RAPD.** Adviser: teacher Dr. Hercules Diniz Campos. Co-adviser: Dr. Aloísio Sartorato and teacher. Dr. Takeshi Kamada.

Although the genetic resistance is the most efficient and economic method for disease control, there are no varieties resistant for the majority of them, including anthracnose. In order to select genotypes of soybean with resistance to the *C. truncatum*, it was carried out an assay in the Pindaibas Farm - YPAGEL, Rio Verde - GO. Twenty five genotypes were evaluated. The experimental design used was the randomized blocks, with evaluated area of 7.2m<sup>2</sup>. The variety BRSMT Uirapuru was used as the susceptible standard variety. Two inoculations was realized; the first one when the plants were in R1 stage and the second 15 days after the first one, using a suspension of 1.5 x 10<sup>6</sup> conidios/mL. The genotypes were evaluated by the percentage of disease incidence in both trifoliolates and pods, as well the level of seed infestation. The genotypes BRSGO Luziânia and BRSGO Indiara showed minor percentage of anthracnose incidence in the trifoliolates. In the pods, the minor percentage of injuries was showed by the variety BRSGO Luziânia. In the seeds, the percentage of infestation was low, ranging from 0 to 2%. The genotype BRSMT Uirapuru, used as the susceptible standard variety presented, in general way, medium susceptibility. Few studies have been carried out to confirm the genetic diversity of anthracnose in soybean, caused by *C. truncatum*, considered as one of the main soybean disease in the Brazilian Cerrado Region, although this pathogen is able to cause total loss of the crop. The present work had the objective to evaluate the genetic diversity of isolates of *C. truncatum* proceeding from farms located in the Central Region of Brazil, using the RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA). The isolates showed great genetic variability, taking into consideration that none of them was identical. The genetic distance among isolates allowed classifies them into three possible groups. The grouping for similarity was established based on occurrence place of the fungus. RAPD method was efficient in the study of the genetic variability of the isolates.

Key words: *Glycine max*, anthracnose, control.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande importância social e econômica para o Brasil. Além de gerar empregos, a soja produzida no Brasil é exportada para vários países, o que reflete positivamente na balança comercial brasileira. O complexo agroindustrial da soja movimenta aproximadamente US\$ 30 bilhões, sendo que a área cultivada com soja é de 20,7 milhões de hectares com uma produção de 58 milhões de toneladas; desta produção, a região Centro-Oeste contribui com 26,6 milhões de toneladas, ou seja 45,9% do total (Conab, 2007).

Muitos fatores bióticos podem afetar o desenvolvimento da cultura, afetando desde a germinação da semente até a qualidade do grão após a colheita. Entre esses fatores, destacam-se as doenças. Wraeter et al (1994), afirmaram que a perda na produção nos dez países maiores produtores causada por doenças foi de 14,99 milhões de toneladas, avaliadas em US\$3,31 bilhões no ano de 1994. Atualmente, já foram identificadas, na cultura da soja no Brasil, mais de 40 doenças causadas por fungos, nematóides, bactérias e vírus. As perdas anuais na produção devido às doenças são estimadas em 15 a 20%, contudo, algumas doenças podem ocasionar perdas de 100% (Silva et al, 2003; Embrapa, 2004). Entretanto, a importância econômica de cada doença varia de ano para ano, de região para região dependendo das condições climáticas de cada safra, da patogenicidade do agente causal e da > ou < sustentabilidade das cultivares.

Dentre essas doenças as causadas por fungos destacam-se em importância, não só por serem as mais numerosas, mas também em função das perdas que podem causar. A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* (Schwein), tem chamado a atenção dos pesquisadores nas últimas safras em função do aumento de sua ocorrência e das perdas proporcionadas.

A antracnose da soja já foi reportada em todos os países nos quais a soja é cultivada. As perdas na produção são estimadas em 16-26% nos Estados Unidos, 30-50% na Tailândia e até 100% em certas áreas da Índia (Manandhar & Hartman, 1999). Em casos de alta severidade, a antracnose pode causar o completo abortamento das vagens, resultando em até 100% de perda. Em 1994, as perdas ocasionadas pela antracnose no Brasil foram de 77.500 toneladas (Manandhar & Hartman, 1999).

Segundo França Neto & Henning (1984), a utilização de sementes contaminadas, a alta umidade nas lavouras durante a safra e a ocorrência de chuvas no período de colheita

aumentaram a incidência desse patógeno. Essas condições são comumente encontradas em Goiás e em outras regiões do Centro-Oeste do Brasil. Portanto, a necessidade de se conhecer ainda mais sobre essa doença torna-se uma prioridade, já que ela pode causar quedas expressivas na produtividade e na qualidade das sementes.

Dentre as medidas de controle, a utilização de cultivares resistentes é de destaque como economicamente eficaz. Entretanto, ainda pouco se conhece sobre genótipos de soja com resistência a *C. truncatum*, porém, devido à ampla gama de hospedeiros, a capacidade de ser disseminado eficientemente pelas sementes (Sinclair & Backman, 1989) tem dificultado ainda mais o desenvolvimento e preservação de cultivares resistentes.

A ocorrência do patógeno em diferentes regiões produtoras e a inconstância da manifestação dos sintomas das doenças, cultivos de soja têm sugerido a existência de grande variação entre populações do patógeno. As informações sobre as características genéticas do fungo são bastante escassas, viabilizando, portanto, um estudo mais detalhado a fim de caracterizar isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de diferentes lavouras da região central do Brasil, a partir de técnicas moleculares.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar genótipos de soja quanto a resistência ao *C. truncatum* e estudar possível diversidade genética entre isolados obtidos de diferentes regiões produtoras.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A doença - antracnose**

A antracnose da soja foi reportada pela primeira vez em 1917, na Coreia, por S. Takimoto e seu agente etiológico foi identificado por Hemmi como sendo *Colletotrichum glycines* Hori e *Glomerella glycines* como fase teleomórfica (Lehman & Wolf, 1926). Nesse ano, esses autores, após realizarem estudos morfológicos e do ciclo de vida desse patógeno, concluíram que *Glomerella glycines* (Hori) Lehman e Wolf, era o teleomorfo de *C. glycines* (Lehman & Wolf, 1926). Em 1951, Tiffany concluiu que *G. glycines* é também o teleomorfo de *C. destructivum*. Contudo, Holderman (1950) e Tiffany & Gilman (1954) concluíram que *C. glycines* é indistinguível de *Colletotrichum truncatum*, agente etiológico da antracnose de

feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), devendo este nome ter prioridade por ter sido estabelecido primeiro.

Apesar do patógeno mais comumente associado com a antracnose da soja ser *C. truncatum*, outras espécies de *Colletotrichum* também estão envolvidas; *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines* (Hori) Lehman & Wolf), *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (teleomorfo *G. cingulata* Ston.) Spauld; Schrenk e *C. graminicola* (Ces.) Wilson (teleomorfo desconhecido) (Sinclair & Backman, 1989).

Atualmente, a antracnose da soja tem como agente causal o fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw) Andrus & Moore. No Brasil, a doença foi observada pela primeira vez em 1961, no Rio Grande do Sul (Santos, 1988). A doença é de ocorrência generalizada nas lavouras e afeta as vagens em sua fase inicial de formação, constituindo-se em um dos principais problemas da soja na região do cerrado (Nunes Júnior et al., 2003; Nunes Júnior et al., 2004; Juliatti et al., 2004). A ocorrência da antracnose nas lavouras da região central do Brasil deve-se à contínua expansão da soja para novas áreas e também, à que ela esta sujeita (Henning et al., 1997; Embrapa, 2006).

O fungo também pode causar infecção nas sementes, tornando-as o principal veículo de disseminação e introdução da doença em novas áreas de cultivo além de causar uma redução considerável da sua germinação (Henning, 1994). O patógeno pode sobreviver em restos de cultura e em outros hospedeiros, o que agrava ainda mais a sua ocorrência. A infecção pelo patógeno nos ramos e vagens, em anos com as condições climáticas favoráveis à doença, poderá trazer como consequência uma diminuição no rendimento da cultura. A doença pode causar perda total na produção em função da alta redução do número de vagens, além de induzir a retenção foliar e a haste verde na planta (Embrapa, 2006).

De acordo com Dhingra & Acuña (1997), no Brasil Central, tem ocorrido aumento considerável na incidência, atingindo níveis superiores a 50%. Contrariamente o que ocorre com *Phomopsis* sp., e *Fusarium* spp., a colheita tardia não aumenta ou diminui a incidência de *C. truncatum* em sementes (Dhingra & Acuña, 1997).

## **2.2 Hospedeiros suscetíveis e ocorrências mundiais**

*Colletotrichum truncatum* possui uma gama de hospedeiros muito ampla. Alguns deles são *Acácia longifólia*, *Alycarpus* sp., *A. zeyheri*, *Arachis hypogaea*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Cássia* sp., *Centrosema pubescens*, *Calopogonium mucunoides*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria* sp., *Lablab purpureus*, *Lotus corniculatus*, *Lotus uliginosus*, *Lotus* spp.,



*Macroptilium atropurpureum*, *Medicago sativa*, *Melilotus alba*, *Mimosa invisa*, *Pachyrhizus erosus*, *Phaseolus vulgaris*, *P. adenanthus*, *P. lunatus*, *P. quadrangulatus*, *Phaseolus* sp., *Pisum sativum*, *Sesbania exalta*, *S. seban*, *Trifolium alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. pratense*, *T. subterraneum*, *Vicia villosa*, *Vigna aconitifolia*, *V. mungo*, *V. radiatus*, *V. unguiculata*, *Vigna* sp. e *Glycine max* (Bailey & Jeger, 1992).

De acordo com os autores, a doença já apresentou relatos na Malásia, Índia, Zâmbia, Austrália, Gâmbia, Guinéa, Tanzânia, Nigéria, Hong Kong, Filipinas, Zimbábue, EUA, Paquistão, Arábia Saudita, New Britain, Cuba, Quênia, Trinidad, Honduras, Malawi, Uganda, África do Sul, Bangladesh, Mauritius e Guiana. Na América do Sul, a antracnose já foi relatada na Argentina, Venezuela, Chile e Brasil.

### **2.3 Sintomas nas plantas**

As plantas podem ser infectadas em todos os seus estágios de desenvolvimento, atingindo folhas, pecíolos, hastes, vagens e pedicelos (Kucharek, 2001). Quando o fungo é transmitido pela semente, os primeiros sintomas são observados durante a germinação, causando damping-off em pré ou pós-emergência. Nas plântulas que emergem aparecem nos cotilédones lesões necróticas de cor cinza a negra e deprimidas, podendo ocasionar da plântula a morte (Bailey, 1992; Ito & Tanaka, 1993; Campos et al., 2006). O fungo pode estar localizado no interior ou fora do embrião, possibilitando que haja a transmissão local e sistêmica e, assim, o progressivo apodrecimento do hipocótilo. Além disso, o fungo pode permanecer por mais de 10 (dez) anos em sementes armazenadas a 5°C demonstrando a sua grande capacidade de sobrevivência o que aumenta a sua importância no início do ciclo da cultura.

Os sintomas mais comuns são lesões escuras, de forma irregular, formando depressões nas hastes, pecíolos e em vagens na fase de enchimento de grão (Gazzoni; Yorinori, 1995; Juliatti et al., 2004; Campos et al., 2006).

Segundo Gazzoni & Yorinori (1995), as vagens infectadas no estágio inicial de formação adquirem coloração castanho-escura a negra e ficam retorcidas. Nas vagens em granação, as lesões iniciam-se por estrias de anasarca e evoluem para manchas negras, podendo atingir toda a vagem. As lesões nas vagens são de forma indefinida e de coloração castanho-escura, recobertas por acérvulos, cujas numerosas setas de cor negra facilitam a identificação da doença. Vagens infectadas no início de sua formação podem não produzir sementes e, em casos de infecção tardia, a qualidade das sementes é afetada (Galli et al,

1998). Nas folhas, geralmente ocorrem infecções secundárias do *C. truncatum* através de conídios (Cropdisease, 2004; Plant Pathology, 2004). Essas infecções resultam em lesões na parte abaxial das folhas, onde podem ser encontradas nervuras necrosadas de coloração negra. Além disso, são as possíveis causas da necrose na base do pecíolo, aborto e seca prematura de vagens (Juliatti et al., 2004; Campos et al., 2006).

#### **2.4 Condições favoráveis a doença**

As condições climáticas que favorecem o aparecimento a doença são chuvas prolongadas, dias nublados, temperatura variando entre 24 e 30°C, alta população de planta, deficiência de potássio no solo e infestação e danos de percevejos (Santos, 1988; Embrapa, 2004). Além do cultivo contínuo da soja, estreitamento nas entrelinhas (menor que 50 cm) e o uso de sementes infectadas, são também responsáveis pelo aumento da incidência da doença (Embrapa, 2006). Outro fator que pode influenciar no desenvolvimento da doença é a quantidade de inóculo presente na área. Em estudo realizado com antracnose da lentilha, também citada pelo fungo *C. truncatum*, Chongo & Benier (2000), concluiu que quanto maior a concentração de inóculo, menor será o período de incubação, menor será o período latente, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da doença. Além disso, o mesmo autor obteve resultados semelhantes para temperatura que variou de 16 a 28°C, sendo que quanto maior a temperatura, menor o período de incubação, menor o período latente, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da doença. Para o período de molhamento foliar, esse autor determinou que quanto maior a sua duração (passando de 12 para 48 h), menor foi o período de incubação, menor o período latente do fungo, maior a quantidade de lesões nas hastes e maior a severidade da doença.

Normalmente, a ocorrência da doença é mais perceptível do início da formação das vagens, estádios R3 (final da floração: vagens com até 1,5 cm de comprimento) e R4 (maioria das vagens, no terço superior, com 2 a 4 cm, sem grãos perceptíveis ao tato) até o estágio de maturação R7 (a partir do início do amarelecimento de folhas e vagens) (Campos et al., 2005; Campos et al., 2006). Ao avaliar o período de incubação e o período de latência de *C. truncatum* e a quantidade de lesões nas hastes e severidade da doença em função do estágio fenológico das plantas, Chongo & Bernier (2000) obtiveram resultados semelhantes em lentilha, contudo, à medida que as plantas passaram do estágio vegetativo para o florescimento e, posteriormente, para a formação de vagens, o período de incubação e período

latente diminuíram, enquanto que a quantidade de lesões nas hastes e a severidade da doença aumentaram.

## **2.5 Aspectos morfológicos do *Colletotrichum truncatum***

As colônias são de aspecto cotonoso ou aveludado, possuem uma larga escala de pigmentação variando do branco, cinza pálido, cinza escuro a marrom escuro. Setas abundantes. Conídios falciforme com estreitamento gradual nas extremidades, septados (Von Arx, 1957a; 1981) formados em massas alaranjadas em grande quantidade, que 7 a 10 dias após sua formação produzem microconídios negros em quantidade variável (Tiffany; Gilman, 1954)

## **2.6 Tipos de inóculo**

As duas principais fontes de inóculo são os conídios, produzidos nos acérvulos, e os ascósporos, produzidos e liberados dos peritécios. Nos acérvulos e nos peritécios novos, os conídios e os ascósporos estão inseridos em um material mucilaginoso hidrofílico úmido, citado freqüentemente como matriz. É uma mistura complexa, composta por vários polissacarídeos e glicoproteínas, além de diversos componentes menores como as enzimas (Louis et al., 1988). Quando essas estruturas reprodutivas amadurecem sob condições de baixa umidade, a matriz forma uma “crosta” imobilizando os esporos.

A disseminação de esporos advindos de acérvulos jovens ocorre em gotas de água (água livre), enquanto que o vento pode fazer a distribuição de massas de esporos dos acérvulos e ascósporos dos peritécios que se encontram sem água livre (Nicholson; Moraes, 1980).

Em experimentos de laboratório, os conídios são comumente lavados ou umidificados para melhorar as taxas de germinação. Diversos trabalhos têm mostrado que a matriz pode inibir a germinação dos esporos (Louis; Cooke, 1985a). Enquanto os esporos se mantêm no interior do acérvulo a matriz atua na prevenção da germinação prematura dos esporos, assegurando, dessa forma a integridade do inóculo. Também há evidências de que a matriz mantém a viabilidade dos esporos sob condições de baixa umidade (Nicholson; Moraes, 1980; Louis et al., 1988). A matriz pode também proteger os esporos de temperaturas extremas e da luz ultravioleta, além de proteger dos efeitos de metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas (Nicholson et al., 1986). Evidências de que a matriz influencia diretamente no processo de

infecção não é bem documentada, no entanto McRae e Stevens (1990) têm mostrado que a adição de matriz a um inóculo adianta o início do aparecimento de sintomas. Várias enzimas como invertase, poligalactunorase e celulase, ocorrem no material matricial, embora a possibilidade dessas enzimas contribuírem com os conídios, fornecendo nutrientes durante a germinação, para o processo de penetração na superfície das plantas ou para um subseqüente crescimento no interior dos tecidos, não é sustentado por resultados de pesquisa (Porter, 1969; Louis; Cooke, 1985b; McRae; Stevens, 1990).

## **2.7 Interação patógeno - hospedeiro**

Uma das fases essenciais para a patogênese bem sucedida é a adesão de propágulos do patógeno à superfície do hospedeiro (Hamer et al., 1988). Há poucos estudos dedicados a determinar a ocorrência da adesão dos conídios do *Colletotrichum*, embora haja algumas indicações baseadas em vários estudos microscópicos, que os conídios realmente aderem-se à superfície das plantas. Swinburne (1976) demonstrou a existência de “cicatrizes” deixadas na superfície do hospedeiro após a remoção do conídio collelotrichun.

### **2.7.1 Diferenciação e reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno**

Após a deposição sobre a planta, o conídio germina e passa por uma diferenciação complexa para formar o apressório (Parbery, 1981). O apressório é essencial para a infecção e o mesmo poderá ser formado inclusive na ausência do hospedeiro. Isso ocorre, por exemplo, quando os conídios germinam em uma superfície rígida tal como uma placa de vidro (Emmett & Parbery, 1975; Lenné, 1978).

A formação do apressório requer síntese de proteína (Suzuki et al., 1981) e é acompanhado de uma precisa regulação do comportamento nuclear. Nos conídios do *C. graminicola* (Skoropad, 1967) e *C. truncatum* (Stamples et al, 1976), a mitose precede a formação de um septo. Um núcleo se move para dentro do tubo de germinação onde ocorre a segunda mitose e o segundo septo é formado, portanto somente um núcleo estava presente na célula que, subseqüentemente, desenvolveu um apressório. Após a maturação do apressório e início da infecção, um núcleo passa para a hifa infecção no interior do tecido infectado, enquanto que o outro núcleo fica mantido no apressório. O subseqüente crescimento da hifa de infecção leva à produção de um típico micélio multinucleado (Bhairi et al, 1990).

Durante a formação do apressório, um dos produtos que requerem síntese de proteína é

a melanina (Suzuki et al. 1981). A melanina atribui ao apressório sua aparência escura típica e pode protegê-los de irradiações prejudiciais, porém este pigmento possui função crucial no processo de penetração. Kubo e Furusawa (1986); Kubo et al. (1982, 1987) sugerem que a melanina pode enrijecer a parede do apressório de forma que ele suporte a alta pressão hidrostática interna necessária para a formação do peg de infecção para penetrar a cutícula. No entanto, existem algumas evidências de que a natureza química da superfície do hospedeiro também pode induzir tanto a germinação de esporos quanto a formação de apressórios (Haward e Ferrari, 1989; Mercer et al., 1971).

### **2.7.2 Penetração na superfície do hospedeiro**

Os fungos, de uma maneira geral, apresentam diversas formas de penetração no hospedeiro: através de aberturas naturais (estômatos), através de ferimentos e pela penetração direta da barreira cuticular, sendo esta o meio mais comum (Krantz et al., 1978; Agrios, 1997).

Para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, especialmente aquelas que atacam tecidos vegetativos novos, sua habilidade de penetrar diretamente a cutícula é de extrema importância. Três mecanismos de penetração da cutícula foram propostos: baseados na força mecânica isoladamente, na secreção de enzimas que degradam a cutícula, também isoladamente, ou a combinação de ambos os processos (Brown, 1975; Tebeest et al, 1978; Muirhead; Deverall, 1981; Chau; Alvarez, 1983 e Porto et al, 1988). No entanto, há grandes evidências de que o *Colletotrichum* exerce força suficiente para penetrar a cutícula. Mercer et al, (1971) mostraram que o *Colletotrichum* degradou epóxi-resinas, que são polímeros insensíveis à hidrólise por enzimas fúngicas, e penetrou as membranas da planta. Contudo, nas observações de micrografia eletrônica da penetração cuticular, concluiu-se que a força mecânica é o componente principal da penetração da cutícula da planta (Mercer et al., 1971). A importância da força mecânica é também evidente nos estudos de esforço do *Colletotrichum* em produzir o apressório na falta de melanina, ou como consequência de mutação, ou pela presença dos inibidores da biossíntese de melanina. Na falta de melanina, o *Colletotrichum* não possui força suficiente para infectar seus hospedeiros (Suzuki et al, 1982; Katoh et al., 1988). Entretanto, pode-se restaurar a biossíntese de melanina, pela adição de um precursor específico (scytalone), assim o fungo pode recuperar a sua patogenicidade (Wolkow et al., 1983; Rasmussen; Hanau, 1989).

Alternativamente, a penetração faz uso de enzimas para dissolver ou amaciar a cutícula

do hospedeiro. Diversas espécies do *Colletotrichum* produzem esterases capazes de degradar a cutina, entretanto, em duas espécies há informação detalhada sobre as próprias enzimas e os genes que as codificam. Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* produziram cutinases quando mantidos em meio de cultura líquido. Estas enzimas foram purificadas, suas propriedades descritas e sua indução por monômeros de cutina foram documentadas inteiramente (Dickman et al., 1982; Kolatukuddy, 1987; Ettinger et al., 1987). O gene da cutinase foi isolado do *C. capsici* (Soliday et al., 1989), no qual foi encontrado com dupla ocorrência. Um cDNA contendo o gene da cutinase do *C. capsici* hibridizou-se ao DNA genômico do *C. graminicola*, *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, sugerindo que um gene similar, apesar de presente somente em uma só cópia, ocorre nessas espécies.

### **2.7.3 Infecção e colonização dos tecidos do hospedeiro**

Através da microscopia eletrônica, foi possível observar hifas de *Colletotrichum* por toda parte do tecido em que as células encontravam-se mortas e, freqüentemente, descoloridas, havendo também uma degradação extensiva da parede celular do hospedeiro. A hifa pode desenvolver tanto inter como intracelularmente. O crescimento rápido e a grande capacidade de destruição de tecidos evidenciam a extrema eficácia desses patógenos. Entretanto, apesar de sua natureza destrutiva, seu sucesso como patógeno é quase que exclusivamente determinado pela forma com que a infecção e colonização dos tecidos teve início. Muitas espécies de *Colletotrichum* apresentam um processo de infecção com duas fases: uma delas com ausência de sintomas, durante a qual o patógeno se estabelece nos tecidos do hospedeiro, seguido pela fase visivelmente destrutiva; outra é a fase sem sintomas, onde esses patógenos colonizam as células sem matá-las (Luttrell, 1974). Ainda de acordo com definições de Luttrell, esses fungos serão considerados como “patógenos intracelulares hemibiotróficos”, onde a ênfase é colocada não-somente em sua natureza biotrófica, mas também em sua habilidade de penetrar paredes da célula e de crescer no lúmen celular. Para outras espécies, a penetração da cutícula é seguida pelo crescimento abaixo da cutícula, onde, ao contrário de outros patógenos, ocorre a dissolução extensiva da matriz péctica das paredes das células epidérmicas. Esses fungos crescem dentro dos tecidos da planta e, inicialmente, não entram no lúmen da célula. Tais fungos, conseqüentemente, são considerados como “patógenos subcuticulares delimitados pelas paredes”. A distinção entre esses dois tipos de processos de infecção já havia sido reconhecido primeiramente por Walker em 1921. Assim, o *C. truncatum* é caracterizado como “patógeno hemibiotrófico intracelular”.

## 2.8 O patógeno como hemibiotrófico intracelular

O processo bifásico da infecção desse patógeno, iniciando a infecção sem ocorrência de sintomas seguido da produção de lesões, foi notado, primeiramente, por Leach (1922), que distinguiu também a produção de um micélio “primário” e a transição para um micélio “secundário”. Em 1976, Elliston et al. ilustraram o crescimento de vesículas infectivas, em formato esférico/periforme, no interior das células epidérmicas. Mergulhando seções longitudinais do tecido infectado em uma solução de nitrato de potássio, foi possível mostrar que a membrana plasmática e a membrana do tonoplasto das células que continham vesículas de infecção sofreram plasmólise normalmente. Através de micrografia eletrônica, foi possível ilustrar que as membranas das células epidérmicas infectadas possuíam invaginações ao redor da vesícula infectiva e que os citoplasmas dessas células não apresentavam anomalias estruturais (O'Connell e Bailey, 1991). Nesse estágio, a vesícula assemelha-se ao haustório de patógenos obrigatórios e, como os haustórios, é separada da membrana plasmática do hospedeiro por uma camada da matriz. Embora não tenha quitina, essa matriz é composta por proteínas e polissacarídeos, as quais estão presentes no hospedeiro e no patógeno (O'Connell et al., 1986; O'Connell, 1987; O'Connell e Ride, 1990). A função da matriz não é conhecida, mas poderia agir impedindo os eventos de reconhecimento planta-patógeno que determinam a resistência, como sugerido por Siegrist; Kauss (1990), ou talvez para imobilizar toxinas ou enzimas fúngicas extracelulares.

A vesícula de infecção representa outro exemplo de diferenciação de uma estrutura especializada de infecção essencial para a patogênese. Não se sabe se essas estruturas determinam a sobrevivência das células infectadas ou se formam em consequência da parte viva restante da célula infectada (O'Connell e Bailey, 1986). Hifas primárias intracelulares de grande diâmetro crescem das vesículas e adentram às células epidérmicas e corticais adjacentes. Estas hifas são fortemente pressionadas enquanto passam através das paredes da célula. Por 24-48 horas após a penetração, as células mantêm sua ultra-estrutura e o funcionamento da membrana normais (O'Connell et al., 1985).

Mais tarde, as células infectadas evidenciam distúrbios osmóticos e, eventualmente, degeneração gradual do citoplasma das aulas do hospedeiro e, em apenas 2-3 dias, após a penetração, remanescem somente os restos da membrana. Como cada célula do hospedeiro é colonizada por hifas primárias, a breve fase biotrófica segue para a lenta senescência e eventual morte da célula infectada. Em consequência dessa progressão, as células colonizadas pela extremidade do micélio primário encontram-se intactas, enquanto as infectadas

anteriormente estão mortas. Durante a formação do micélio primário, não há degradação extensiva das paredes celulares do hospedeiro. Embora muitas células morrem durante esta fase preliminar, não há síntese de mRNAs associados com resistência e os tecidos infectados nem se tornam enegrecidos nem sintetizam fitoalexinas e isoflavonóides (Beli et al., 1984, 1986; Cramer et al., 1985).

O *Colletotrichum*, inicialmente, estabelece infecções biotróficas que representa um relacionamento delicado entre hifas invasoras não causando alterações prejudiciais ao hospedeiro. No entanto, esse patógeno é transformado, dentro de poucas horas, em um patógeno altamente agressivo e destrutivo. A morfologia do patógeno também sofre mudanças. Em vez de produzir grandes hifas primárias intracelulares, são produzidas reduzidas hifas secundárias que crescem tanto dentro das células quanto dentro da parede celular, causando a degradação extensiva da parede celular e morte da célula, que se potencializa com o avanço das hifas (O'Connell et al., 1985; O'Connell e Bailey, 1991). Nesse estágio, no qual coincide com a produção de sintomas visíveis, o *Colletotrichum* comporta-se como um patógeno necrotrófico típico. O início de sintomas visíveis é acompanhado pela síntese de diversos mRNAs do hospedeiro e pela produção de diversos fatores da resistência, incluindo fitoalexinas e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Entretanto, quando ocorrem lesões com aspecto encharcado, os fatores da resistência não se acumulam em concentrações suficientes e o crescimento do patógeno parece não ser restringido. Sob tais circunstâncias, os tecidos do hospedeiro são mortos antes que a atividade sintética requerida para a acumulação de fatores da resistência possa ser ativada (Bailey, 1991). Em outros tecidos, as lesões podem tornar-se limitadas quando esses fatores da resistência acumulam em níveis significativos (Rahe, 1973).

Diversas espécies atuam através de infecções hemibiotróficas intracelulares para estabelecer infecções iniciais; entretanto, não podemos dizer que todas as espécies do *Colletotrichum* se comportam desta maneira (Jeffries et al., 1990). O *C. lindemuthianum*, por exemplo possui comportamento biotrófico intracelular, porém nem sempre progride de célula a célula (Bailey et al., 1990). O fungo infecta células epidérmicas vivas, mas a fase biotrófica não se estende para células adjacentes e ocorre somente no interior da célula epidérmica inicialmente infectada. Dentro desta célula, o peg de penetração desenvolve um micélio primário altamente ramificado e enrolado durante um período entre 24 e 48 horas. Após este tempo, hifas secundárias necrotróficas mais finas são produzidas, as quais, como de outras espécies do *Colletotrichum*, crescem muito rapidamente através e entre as células, causando maceração e morte extensiva dos tecidos. Um desenvolvimento biotrófico similarmente



restrito foi descrito para o *C. truncatum* f. sp. *pisi* [isolado ATCC 64197] atacando plantas de ervilha (Uronu, 1989).

## 2.9 Infecção e transmissão de *Colletotrichum* via sementes

A associação de patógenos com sementes nem sempre assegura a ocorrência de doenças, embora a maioria dos patógenos transportados por semente sejam potencialmente capazes de causar a doença (Machado, 1988; 1994). Nesse contexto, não se deve esquecer da abordagem epidemiológica, ou seja, para ocorrer a doença é necessária a perfeita interação entre o patógeno, o hospedeiro (semente) e o ambiente (Mcgee, 1995).

As duas principais fontes de inóculo para ciclos secundários de infecção por *Colletotrichum* spp. são os conídios produzidos em acérvulos quando o fungo está na fase anamórfica, e os ascósporos nos peritécios, na fase teleomórfica (Alexopoulos et al., 1996). As sementes infectadas são o principal veículo para disseminar esses patógenos a longas distâncias (Neergaard, 1979; Machado, 1988).

Os patógenos podem estar associados às sementes de diferentes maneiras, simplesmente acompanhando-as, sem estar intimamente ligados a elas concomitantemente, aderidos à sua superfície externamente e carregados de forma passiva e transportados nos tecidos internos infectando as sementes internamente. *Colletotrichum* spp. é transportado principalmente por esse terceiro tipo de associação (Baker; Smith, 1966; Tanaka; Machado, 1985; Machado, 1994). Na literatura, há relatos de várias espécies associadas às sementes de seus hospedeiros (Richardson, 1990) que são, portanto, potencialmente transmitidas por elas. Há evidências da transmissão por sementes de todas as espécies de *Colletotrichum* patogênicas às leguminosas, constituindo o principal fator para sua ampla disseminação (Lenné, 1992).

Estudar a dinâmica de infecção de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja é uma preocupação que existe há muito tempo. Tiffany (1951) observou que plantas da cultivar “Lincoln”, infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento, foram capazes de produzir sementes infectadas, às vezes sem apresentar quaisquer sintomas perceptíveis. O autor ainda concluiu que o patógeno, em condições favoráveis, acompanha longitudinalmente o caule pelas células corticais, podendo atingir as vagens e sementes.

A transmissão do *C. truncatum* mostrou-se bastante variável, tanto entre cultivares quanto entre plantas de um mesmo cultivar. A inoculação na fase reprodutiva da planta revelou ser esta a época crítica para transmissão do patógeno pelas sementes. Isso pode ter

ocorrido em função da proximidade do inóculo depositado nas vagens em relação às sementes (Machado, 1974).

Em parcelas com diferentes níveis de sementes inoculadas artificialmente com *C. truncatum*, a germinação de plântulas de soja foi proporcionalmente menor quanto maior a porcentagem de sementes inoculadas e, nesse caso, não foi observada diferença significativa para incidência da doença no caule, folhas e vagens, provavelmente devido à morte das sementes inoculadas causando falhas na germinação (Santos et al., 2000b).

Quando o fungo é transmitido pela semente infectada, pode ficar no estado latente no interior do tecido cortical e pode não expressar sintomas na planta até o final do ciclo, dependendo do clima de cada local (Almeida et al., 1997). A intensidade da antracnose nas folhas e caules, avaliadas em parcelas com diferentes níveis de inóculo do patógeno, não foram significativamente diferentes. Por outro lado, a incidência e a severidade em vagens na pré-colheita apresentaram diferença significativa pelo teste F na análise de regressão, ou seja, ocorreu o aumento linear na intensidade da antracnose nas vagens, conforme o aumento na porcentagem de sementes infectadas com *C. truncatum*. Enquanto a emergência das plântulas de soja foi proporcionalmente menor quanto maior o número de sementes infectadas (Talamini et al., 2001).

Na avaliação da emergência das plântulas e da severidade da antracnose em plântulas, a partir de sementes inoculadas com *C. truncatum*, verificou-se baixa germinação das sementes e, quando ocorria a germinação a severidade da doença, foi intensa ao ponto de causar tombamento das plântulas (Santos et al., 2000a).

A dinâmica da infecção por *C. truncatum* em soja apresenta, de certa forma, um padrão de desenvolvimento quase exclusivo. As plantas infectadas, resultantes de sementes com *C. truncatum*, podem não apresentar sintomas visíveis e o patógeno percorre longitudinalmente o caule pelas células corticais, podendo atingir as vagens e as sementes formadas por essa planta. Nesse caso, caracteriza-se a natureza sistêmica da doença. A transmissão pelas sementes pode ainda se dar pelo fato do fungo alojar-se nos cotilédones, e estes, ao caírem no solo, mantêm o patógeno na forma necrotrófica. Sendo assim, quando ocorre o aumento da área vegetativa da planta forma-se um microclima favorável ao retorno do patógeno para a planta por meio dos respingos de chuva. Com isso, o patógeno está hábil a infectar o caule, folhas e também as vagens, assegurando sua transmissão para a próxima geração (Talamini et al, 2001).

## 2.10 Manejo da antracnose da soja

O manejo desta doença é feito através da associação de varias táticas de controle, como rotação de culturas, eficiente controle de plantas daninhas, maior espaçamento entrelinhas (50 - 55 cm), população adequada (300.000 a 350.000 plantas/ha), uso de sementes de boa qualidade fitossanitária, tratamento químico de semente, manejo adequado do solo, adubação potássica, controle de percevejos, uso de variedades resistentes e controle químico (Embrapa, 2004; Juliatti et al., 2004).

O maior veículo de disseminação da doença é através de sementes infectadas, e para evitar a transmissão, recomenda-se fazer tratamento químico com fungicidas nas sementes ou plantar sementes saudias, além de controlar as populações de insetos sugadores na cultura (Galli et al., 1980; Dhingra; Acuña, 1997). Para Hoffmann et al. (2004), a antracnose pode causar danos que justifica o uso de fungicidas.

Os fungicidas utilizados no controle da antracnose na soja são os fungicidas sistêmicos que, após a sua aplicação na planta, são absorvidos e translocados, geralmente via xilema, atuando sobre o patógeno já estabelecido. Esses fungicidas possuem um modo de ação específico e atuam em baixa concentração. Entre os grupos dos fungicidas sistêmicos, destacam-se os benzimidazóis (Embrapa, 2004). A eficiência do fungicida depende do nível de infecção na planta, no entanto, em altos níveis de infecção, o tornar ineficiente no controle da antracnose. Assim, a utilização de cultivares resistentes pode ser ainda uma das mais eficazes medidas de controle em manejo visando ao controle da antracnose na soja.

## 2.11 Resistência varietal a antracnose

A utilização de cultivares resistentes constitui a medida mais eficaz de controle de doenças e de maior economia para o produtor. Além disso, possui a vantagens de reduzir, ou até mesmo, dispensar o uso de fungicidas. A resistência genética a um determinado patógeno pode variar de baixa (quando o desenvolvimento do patógeno é levemente afetado) a alta (quando o patógeno não se estabelece no tecido sadio, ou não consegue completar seu ciclo). No primeiro caso, tem-se uma ação sobre a taxa aparente de infecção ( $r$ ) e, no segundo, sobre a quantidade de inóculo inicial ( $X_0$ ) (Almeida, 1992). Algumas pesquisas têm procurado selecionar fontes de resistência o *C. truncatum*, porém com poucos resultados promissores.

Através do percentual de sementes infectadas com *Colletotrichum* spp., Henning et al. (1993) avaliaram sob condições de campo 162 cultivares de soja recomendados no Brasil

quanto a resistência à antracnose. Todos os cultivares apresentaram infecção nas sementes, tornando-as suscetíveis ao patógeno em diferentes níveis. De forma semelhante, Meyer et al (1997) selecionaram 15 dos 54 genótipos avaliados, porém sem sucesso posteriormente. Em ensaio realizado no município de Campo Novo do Parecis, as cultivares MT/BR-50 (Parecis) e a MT/BR-53 (Tucano) apresentaram incidência de 30 a 40% de vagens infectadas por *C. truncatum*, já as cultivares MT/BR-49 (Pioneira), MT/BR-51 (Xingu), MT/BR-52 (Curió), MS/BR-171 (Campo Grande) e a linhagem MT/BR-9419576 apresentaram menores porcentagens de vagens infectadas (Yorinori et al., 2000).

Com relação às cultivares de soja registradas para cultivo no Brasil, não há ainda registro sobre resistência à antracnose. Atualmente, encontram-se apenas alguns genótipos com determinado grau de tolerância, embora os níveis de resistência ou tolerância não são estáveis quando esses cultivares são direcionados para outras regiões ou mesmo em anos seguintes na mesma região em área cultivada (Campos et al, 2006).

## **2.12 Reação da polimerase em cadeia (PCR)**

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80 (Mullis; Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na pesquisa visando ao entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas. O impacto da PCR e dos métodos dela derivados levaram Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de medicina no início da década de 90.

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a tornam particularmente poderosa para estudos genéticos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma dessas derivações é a tecnologia RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando primers de seqüência arbitrária (Borém, 1998)

PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões e cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a

seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Borém, 1998; Borém, 1999; Moura, 2002).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e da seqüência do *primers* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNTP de cada *primers* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse (Ronzelli, 1996; Ferreira; Grattapaglia, 1998).

### **2.13 Marcadores RAPD**

A amplificação de fragmentos polimórficos pela PCR usando *primers* de seqüência arbitrária (RAPD, AP-PCR) é hoje uma tecnologia estabelecida e amplamente utilizada para gerar informação sobre variabilidade ao nível de DNA para as mais diversas aplicações na análise genética de procariotos e eucariotos. As aplicações mais comuns incluem mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, *fingerprinting* de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas e animais domésticos. A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia têm sido os principais fatores que levaram à sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa no mundo (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Polimorfismos de fragmentos RAPD são visualizados como presenças e ausências de bandas em um gel de eletroforese e podem, assim, ser facilmente interpretados e convertidos em dados diagnósticos

de homologia molecular entre indivíduos.

Dois aspectos fundamentais devem ser considerados ao se utilizar a tecnologia RAPD para a análise genética. O primeiro diz respeito à sensibilidade da PCR para a detecção dos polimorfismos. A PCR é uma ferramenta simples e extremamente poderosa para detectar polimorfismos, porém extremamente sensível a alterações nas condições de amplificação, impurezas no DNA e qualidade dos reagentes utilizados. Todos esses atributos se aplicam ao ensaio RAPD. No entanto, uma desvantagem seria a baixa especificação de amplificação dos seguimentos de DNA devido às características dos *primers* de seqüências curtas e aleatórias (Lara, 1991; Pinto, 1995; Ferreira; Grattapaglia, 1998; Borém, 1999).

O segundo aspecto importante é a competição que ocorre entre os fragmentos amplificados nos diversos sítios no genoma. Em cada um deles existe um par de seqüências invertidas muitas vezes não perfeitamente complementares ao *primer* e separadas por várias centenas de pares de bases. Todos estes sítios competem por substrato (dNTPs) e enzima (*Taq* polimerase) durante a PCR e portanto tendem a ser amplificados com eficiências diferentes resultando em bandas de intensidades distintas quando coradas com brometo de etídio e visualizadas sob ultra-violeta. A maior ou menor intensidade com a qual uma determinada banda RAPD é visualizada é um reflexo direto do grau de competitividade do sítio. Claramente quanto mais competitivo o sítio, (ex. perfeita complementaridade ao *primer*, ausência de estruturas secundárias no DNA molde) mais interpretável, reproduzível e robusto será aquele marcador em ensaios sucessivos (Lara, 1991; Pinto, 1995; Ferreira; Grattapaglia, 1998).

Esses dois aspectos devem fundamentar o critério e a stringência com a qual o experimentador avalia seus perfis eletroforéticos e os transforma em dados. A simplicidade e a acessibilidade do ensaio RAPD não podem ser traduzidas em trivialidade na sua utilização. Uma banda no gel não-necessariamente representa um dado de natureza genética. A passagem da etapa de se obter bandas em um gel à etapa de se obter dados para análise genética exige uma abordagem sistemática e cuidadosa na realização das reações e na análise dos géis. Assim como para qualquer outra classe de marcadores moleculares, é difícil ou mesmo impossível interpretar algumas bandas RAPD. A sensibilidade e competição na PCR contribuem para isso. No caso dos marcadores RAPD, entretanto, a grande vantagem que existe e que deve ser explorada pelo experimentador, é que muitos marcadores são gerados, o que permite uma grande flexibilidade para a seleção daqueles mais robustos (Lara, 1991; Pinto, 1995; Ferreira; Grattapaglia, 1998; Borém, 1999).

O critério de selecionar alguns fragmentos como marcadores, a partir de um gel com muitos fragmentos é um aspecto difícil de ser absorvido pelos experimentadores habituados a outras técnicas em que o número de marcadores é intrinsecamente limitado (ex. isoenzimas) ou em que sua obtenção envolve grande quantidade de trabalho (ex. RFLP). Ao se considerar todas as bandas visualizáveis no gel como marcadores, incorrem-se, freqüentemente, em problemas de reproducibilidade em ensaios posteriores. Embora o tema da baixa reproducibilidade dos marcadores RAPD seja ultrapassado, ele foi e continua sendo essencialmente um reflexo do pouco cuidado com o qual a técnica foi e continua muitas vezes sendo utilizada, da inexperiência do experimentador com técnicas moleculares e, principalmente, da baixa estrigência com a qual o experimentador traduz fragmentos ampli-ficados em um gel para dados em uma planilha (Ronzelli, 1996). O registro de dados por diferentes pessoas, a repetição das reações RAPD no tempo, em diferentes laboratórios e com novas extrações de DNA do mesmo indivíduo são controles importantes para verificar se a estrigência adotada é adequada para a transferibilidade de resultados e robustez das informações geradas.

Segundo Ferreira; Grattapaglia (1998), ao se utilizar o ensaio RAPD no laboratório é fundamental adotar três procedimentos básicos: (1) Otimização das condições de reação, principalmente no que se refere à qualidade e quantidade do DNA genômico utilizado; (2) Abordagem sistemática na utilização do ensaio RAPD, mantendo constantes as condições de concentrações de reagentes e perfil térmico de termociclador otimizadas inicialmente; (3) Adoção de um nível adequado de estrigência na seleção de quais bandas utilizar, buscando aquelas mais intensas, repetíveis em ensaios sucessivos e registradas por mais do que uma pessoa, de maneira independente.

## **2.14 Vantagens de marcadores RAPD**

O marcador RAPD é uma das técnicas que se baseia na amplificação do DNA, enquanto que marcadores RFLP, amplamente utilizados, baseiam-se na hibridização do DNA. Esta característica de amplificação resulta numa série de vantagens práticas que podem ser resumidas em dois atributos: simplicidade e rapidez. A obtenção de dados é, pelo menos, duas ordens de magnitude mais rápida. Por exemplo, marcadores RAPD foram 4 a 6 vezes mais eficientes do que RFLP no mapeamento de polimorfismos ligados a locos de resistência a doenças, e 10 vezes mais eficientes em tempo e mão-de-obra (Paran et al., 1991). O RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi um marcador muito utilizado, sendo obtidos

pelas enzimas de restrição e hibridização do DNA marcado com radioatividade. O RAPD permite detectar polimorfismo pela visualização direta das bandas (DNA amplificado) no gel, eliminando todas as etapas de transferência de DNA para membranas (“Southern blot”), hibridização com sondas e autoradiografia (Borém, 1998).

A técnica RAPD não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Por não utilizar sondas, é eliminada a necessidade de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa. Outra grande vantagem é a baixa quantidade de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo. Enquanto que para RFLP são necessárias dezenas de microgramas de DNA, para RAPD são necessárias apenas dezenas de nanogramas, ou seja, 3 ordens de magnitude menos. Estas propriedades permitiram, por exemplo, a construção de um mapa genético com, aproximadamente, 200 marcadores em *Pinus taeda* utilizando-se apenas 6 homens/mês. Para isso, empregou-se o tecido haplóide de megagametófito de pinheiro do qual podem ser extraídos somente quantidades mínimas de DNA (1 a 2 microgramas) (Grattapaglia et al., 1991). Um mapa genético de *Arabidopsis thaliana* com mais de 200 marcadores foi construído utilizando-se 4 homens/mês, enquanto que com RFLP um mapa semelhante foi construído utilizando-se 4 homens/ano (Reiter et al., 1992).

Assim como as técnicas baseadas em RFLP, a técnica de RAPD permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo. Os marcadores RAPD, entretanto, ainda oferecem a possibilidade de amostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para a detecção de variação ao nível de DNA são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP que são pré-selecionadas para regiões de cópia única. Por se basear em PCR, a técnica RAPD é muito mais sensível na detecção de polimorfismo ao nível de DNA. Por exemplo, Foolad et al. (1993) verificaram que enquanto somente 16% das sondas e RFLP revelaram polimorfismo ao nível intra-específico em tomate, aproximadamente 63% dos *primers* RAPD testados detectaram polimorfismo no mesmo material. Eles concluíram que a tecnologia RAPD é adequada para a construção de mapas genéticos ao nível intra-específico. Resultados semelhantes foram observados em soja. A sensibilidade na detecção de polimorfismo com RAPD é também muito poderosa para a identificação de genótipos e obtenção de "fingerprints" genômicos. Além disso, RAPD oferece uma técnica alternativa de clonagem de segmentos genômicos, extremamente simples e eficiente. Os segmentos RAPD, uma vez amplificados e separados por eletroforese, podem ser facilmente isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca



genômica *in vitro* sem necessidade de vetores, e amplificados via PCR sempre que necessário. Esses segmentos podem ser utilizados como sondas para a detecção de RFLP em locos de cópia única ou em locos hipervariáveis, dependendo do seu conteúdo em termos de número de cópias nas seqüências internas (Grattapaglia; Sederoff, 1994).

O custo da técnica RAPD é mais baixo do que o da técnica RFLP em termos de custo por dado genotípico ("data point"). Se for incluído o custo de desenvolvimento da biblioteca de sondas, o custo de RAPD é ainda menor. Esta discrepância de custo se deve principalmente à diferença nos gastos com mão-de-obra e, em menor escala, à menor alocação de recursos para aquisição de reagentes e suprimentos. Um número bem menor de reagentes é necessário para conduzir estudos com RAPD do que RFLP. Esta é, certamente, uma vantagem para a utilização desta técnica em locais onde o acesso rápido a reagentes é difícil (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

RAPD reúne, portanto, a simplicidade da técnica de visualização direta dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA. O uso da técnica RAPD não requer experiência aprofundada em biologia molecular e nem tampouco instalações sofisticadas de laboratório. É uma tecnologia bastante acessível, que pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento, para laboratórios avançados de pesquisa e ser utilizada cotidianamente pelo geneticista. Experimentos típicos de programas de melhoramento, análises de diversidade genética em populações naturais e caracterização de bancos de germoplasma envolvem tipicamente centenas ou milhares de indivíduos. Nesse contexto, a técnica RAPD é uma das poucas ferramentas disponíveis hoje que, efetivamente, permite a análise genética detalhada para um grande número de marcadores. Além disso, oferece a possibilidade de automatização. O fato do polimorfismo RAPD ter natureza binária (presença ou ausência da banda), se por um lado não permite a distinção de heterozigotos, uma característica mais adequada hoje para a automatização do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais (Nelson, 1973; Ronzelli, 1996; Borém, 1998; Ferreira; Grattapaglia, 1998; Borém, 1999).

## **2.15 Utilização do RAPD nos estudos de fitopatologia**

Os marcadores podem ser utilizados para estudar a evolução e a diversidade genética dos patógenos, bem como para detectar o agente etiológico antes do surgimento de sinais ou sintomas, marcou genes de resistência em programas de melhoramento entre outros. Dentre

todas as aplicações, observa-se um número representativo de estudos que se referem à diversidade genética utilizando marcador RAPD.

Vasconcelos et al. (1994) utilizaram RAPD para diferenciar isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de hastes infectadas de soja e crotalária. Os isolados foram divididos em três grupos: dois isolados de soja ficaram em um grupo com 6% de distância genética entre si, os outros dois isolados de soja ficaram em outro grupo com 8% de distância genética entre si, enquanto que o isolado da crotalária ficou em outro grupo com 21% de distância genética dos demais isolados, o que demonstrou a eficiência do método na diferenciação de isolados.

Estudos realizados por Oliveira (2001), utilizando marcadores RAPD, comparando isolados de *C. graminicola*, *C. truncatum* e *C. lindemuthianum* com isolados de *Colletotrichum*, agente causal da sarna do feijoeiro. Os resultados deste trabalho indicaram que o *Colletotrichum* isolado do feijoeiro possui 100% de similaridade genética com o *Colletotricum truncatum*, e geneticamente distante de *C. graminicola* e *C. lindemuthianum*.

Visando identificar marcadores RAPD associados a genes de resistência ao cancro da haste, Carvalho (2002) obteve resultados que indicaram um gene dominante controlando a resistência ao isolado testado (CH8). Através de análises com marcadores moleculares na população F2, foram identificados dois marcadores RAPD produzidos pela amplificação do *primer* OPAB19.

Alta variabilidade genética foi observada por Sartorato (2004) ao analisar 96 isolados de *Phaesariopsis griseola* coletados de plantas de feijão nas cidades de Demolândia e Inhumas, em Goiás. Segundo a metodologia utilizada, os isolados foram separados em cinco grupos.

Tullu (2003) testou 700 marcadores RAPD a fim de selecionar aqueles relacionados à resistência genética de lentilha à antracnose (*C. truncatum*). Dos *primers* testados, apenas dois se destacaram; o OPEO6<sub>1250</sub> (indicador de plantas suscetíveis) e UBC-704<sub>700</sub> (indicador de plantas resistentes).

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. M. Plant pathology. San Diego, California, Academic Press Limited. 4 ed. 635p 1997.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley. 1996.

ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da Soja no Brasil: Epidemiologia e Controle**. In: Dialogo, 34, Produccion de Soja, IICA, Montevideo, p.165-186. 1992.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V. ; HENNING, A. A. **Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo, Ceres, p. 642-664. 1997.

ARX, J. A. von. **Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda**. Phytopathologische Zeitschrift 29, 413-468. 1957.

ARX, J. A. von. **The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture**. 3<sup>rd</sup> edn. J. Cramer, Vaduz. 1981.

BAILEY, J. A.; NASH, C.; O'CONNELL, R. J.; SKIPP, R. A. **Infection Process, Host Specificity and Taxonomic Relationships of a *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose Disease of Cowpea. *Vigna unguiculata***. Mycological Research 94, 810-814. 1990.

BAILEY, J. A. **Recognition Events Associated With Specific Interactions between Plants and Pathogenic Fungi**. In: Smith, C. J. (ed.), Biochemistry and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions, Oxford University Press, Oxford, pp. 210-224. 1991.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control**. CAB International. Wallingford - UK. 1992.

BAKER, K. F. ; SMITH, S. H. **Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens**. Annu. Rev. Phytopathol. 3: 311-334. 1966.

BELL, J. N.; DIXON, R. A.; BAILEY, J. A.; ROWEL, P. M.; LAMB, C. J. **Differential Induction of Chalcone Synthase mRNA Activity at the Onset of Phytoalexin Accumulation in Compatible and Incompatible Plant-pathogen Interactions**. Proceedings of the Nacional Academy of Science 31, 3384-3388. 1984.

- BELL, J. N.; RYDER, T. B.; WINGATE, V. P. M.; BAILEY, J. A.; LAMB, C. J. **Differential Accumulation of Plant Defense Gene Transcript in a Compatible and an Incompatible Plant-pathogen Interaction.** *Molecular and Cellular Biology* 6, 1615-1623. 1986.
- BHAIRI, S.; BUCKLEY, E. H.; STAPLES, R. C. **Protein Synthesis and Gene Expression During Appressorium Formation in *Glomerella magna*.** *Experimental Mycology* 14, 207-217. 1990.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas.** Viçosa: UFV, 1998, 547p.
- BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 1999, 817p.
- BROWN, G. E. **Factors Affecting Post-harvest Development of *Colletotrichum gloesporioides* in Citrus Fruits.** *Phytopathology* 65, 404-409. 1975.
- CAMPOS, H.D.; SILVA, L. H. C. P; SILVA, J.R.C. **Manejo das Principais Doenças Fúngicas da Soja.** *Revista Atualidades Agrícolas.* São Bernardo do Campo. Pág. 20-28. Ago., 2005.
- CAMPOS, H.D.; SILVA, L. H. C. P; SILVA, J.R.C. **Soja: Antracnose.** *Revista Cultivar Grandes Culturas,* Pelotas. a. 7, no 83, p. 26-28, mar., 2006.
- CARVALHO, G. A.; SEDIYAMA, T.; MARIN, A. L. A.; BARROS, E. G. ; MOREIRA, M. A. **Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja.** *Fitopatologia Brasileira,* 27: 474-478. 2002.
- CHAU, K. F.; ALVAREZ, A. M. **A Histological Study of Anthracnose on *Carica papaya*.** *Phytopathology* 73, 1113-1116. 1983.
- CHONGO, G.; BERNIER, C. C. **Effect of Host, Inoculum Concentration, Wetness Duration, Growth Stage, and Temperature on Anthracnose of Lentil.** *Plant Disease* 84:544-548. 2000.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Sétimo Levantamento de Avaliação da Safra 2006/2007.** Online. Acesso em: 19 de abril de 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CRAMER, C. L.; BELL, J. N.; RYDER, T. B.; BAILEY, J. A.; SCHUCH, W.; BOLWELL, G. P.; ROBBINS, M. P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. **Co-ordinated Synthesis of Phytoalexin Biosynthetic Enzymes in Biologically-stressed Cells of Bean *Phaseolus vulgaris***. EMBO Journal 4, 285-290. 1985.

CROPDISEASE. **Anthracnose**. Acesso em: 19 de abril de 2007. Disponível em: <http://cropdisease.cropsci.uiuc.edu/soybeans/anthracnose.html>.

DHINGRA, O. D. ; ACUÑA, R.S. **Patologia de semente de soja**. Editora UFV, Viçosa, Brazil, 1997.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. **Cutinase Deficient Mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are Non-pathogenic to Papaya Fruit**. Physiological and Molecular Plant Pathology 28, 235-242. 1986.

ELLISTON, J. et al. **A comparative study of the development of compatible, incompatible and induced incompatible interactions between *Colletotrichum* spp. and *Phaseolus vulgaris***. Phytopathologische Zeitschrift 87, 289-303. 1976.

EMBRAPA. **Tecnologia de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2004**. CNPSo – Londrina, PR. 2004. 237p.

EMBRAPA. **Tecnologia de Produção de Soja – Região Central do Brasil – 2007**. Londrina, PR: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. 225p. 2006.

EMMETT, R. W.; PARBERY, D. G. **Apressoria**. Annual Review of Phytopathology 13, 147-167. 1975.

ETTINGER, W. F.; THURKRAL, S. K.; KOLATTUDY, P. E. **Structure of the Cutinase Gene, cDNA, and Derived Amino-acid Sequence from Phytopathogenic Fungi**. Biochemistry 26, 7883-7892. 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA – CENARGEN. Documentos, 20)

FRANCA NETO, J. B. ; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: Embrapa CNPSO, n.9, 39p. 1984.

FOOLAD, M. R.; JONES, R. A. ; RODRIGUEZ, R. L. **RAPD markers for constructer intraspecif tomato genetic maps**. *Plant cell Reports* 12: 293-297. 1993.

GALLI, F. **Manual de Fitopatologia**. Vol. I. São Paulo: Agronomica Ceres, 1998, 373 p.

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p. (Manuais de Identificação de pragas e Doenças, 1).

GRATTAPAGLIA, D. et al. **A RAPD map of loblolly pine in 60 days**. Third International Congresso f Intl. Soc. For Plant Molecular. abs. 2224. 1991.

GRATTAPAGLIA, D. ; SEDEROFF, R. R. **Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers**. *Genetics* 137: 1121-1137. 1994.

HAMER, J. E.; HOWARD, R. J.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. **A Mechanism for Surface Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus**. *Science* 239, 288-290. 1988.

HENNING, A. A. **Patologia de Sementes**. Londrina: Embrapa – CNPSo, 43p. 1994. (Documentos, 90)

HENNING, A. A.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A.; FRANÇA NETO, J de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; YORINORI, J. T. **Epidemiologia e Controle de *Colletotrichum* spp**. In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1991/92**. Embrapa – CNPSo, Londrina, p.268-279. 1993.

HENNING, A. A.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A.; FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; YORINORI, J. T. **Epidemiologia e Controle de *Colletotrichum* spp**. In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1993/95**. Embrapa – CNPSo, Londrina – PR, p.100-102. 1997.

HOFFMANN, L. L.; REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; PANISSON, E.; MENDES, C. S.; CASA, R. T. **Efeitos da Rotação de Culturas e da Aplicação de Fungicida Sobre o Rendimento de Grãos e Doenças Foliares em Soja**. *Fitopatologia Brasileira* 29:245-251. 2004.

HOLDERMAN, Q. L. **Some Falcated-spore *Colletotrichum* on Legumes** *Phytopathology*, 40: 11. (abstr.). 1950.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A. **Role of a Melanin in Appressoria Function.** *Experimental Mycology* 13, 403-418. 1989.

ITO, M. F; TANAKA, M. A. S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides.** Campinas. Fundação Cargill. (Série Técnica, 186). 1993.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBIEY, R. A. **The Biology and Control of *Colletotrichum* Species on Tropical Fruit Crops.** *Plant Pathology* 39, 343-366. 1990.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C. **Manejo Integrado de Doenças na Cultura da Soja.** UFU – Uberlândia/MG. 327p. 2004.

KATOH, M.; HIROSE, I.; KUBO, Y.; HIKICHI, Y.; KUNOH, H.; FURASAWA, I.; SHISHIYAMA, J. **Use of a Mutants to Indicate Factors Prerequisite for Penetration of *Colletotrichum lagenarium* by Appressoria.** *Physiological and Molecular PLANT Pathology* 32, 177-184. 1988.

KOLATTUKUDY, P. E. **Lipid-derived Defensive Polymers and Waxes and Their Role in Plant-microbe Interactions.** In: Stumpf, P. K. (ed), *Biochemistry of Plants*, vol 7. *Lipids: Structure and Function*, Academic Press, New York, pp.291-314.

KRANTZ, J.; SCHMUTTERER, H.; KOCH, W. **Diseases, Pests and Weeds in Tropical Crops.** Wiley and Sons, Chichester. 1978.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. **Localization of Melanin in Appressoria of *Colletotrichum lagenarium*.** *Canadian Journal of Microbiology* 32, 280-282. 1986.

KUBO, Y.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; ISHIDA, N.; YANAMOTO, M. **Relation of Appressorium Pigmentation and Penetration of Nitrocellulose Membranes by *Colletotrichum lagenarium*.** *Phytopathology* 72, 498-501. 1982.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J. **Relation Between Pigment Intensity and Penetrating Ability in Appressoria of *Colletotrichum lagenarium*.** *Canadian Journal of Microbiology* 33, 870-873. 1987.

KUCHAREK, T. **Somme Common Soybean Leaf and Stem.** *Plant Pathology Fact Sheet*, Plant Pathology Department, IFAS, University of Florida, Gainesville. 1981. Revisado em Fevereiro de 2001.

LANDES, M.; HOFFMAN, G. M. **Ultrahistological Investigations of the Interactions in Compatible and Incompatible Systems of *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum***. *Phytopatologisch Zeitschrift* 96, 330-351. 1979.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Icone, 1991. 336p

LEACH, J. G. **The parasitismo f *Colletotrichum lindemuthianum***. Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 14, 39pp. 1922.

LEHMAN, S. G.; WOLF, A. F. **Soybean anthracnose**. *Journal of Agricultural Research*. Washington, 33: 381-390. 1926.

LENNÉ, J. M. **Studies on the Biology and Taxonomy of *Colletotrichum* Species**. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia. 1978.

LENNÉ, J. M. ***Colletotrichum* Diseases of Legumes**. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. (eds.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. England, CAB International Wallingford, p. 134-166. 1992.

LOUIS, I.; COOKE, R. C. **Conidial Matrix and Spore Germination in Some Plant Pathogens**. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 661-667. 1985a.

LOUIS, I.; COOKE, R. C. **Enzymes in Conidial Matrix of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Mycosphaerella pinodes***. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 742-745. 1985b.

LOUIS, I.; CHEW, A.; LIM, G. **Influence of Spore Density and Extracellular conidial matrix on Spore Germination on *Colletotrichum capsici***. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 694-697. 1988.

LUTTREL, E. S. **The Parasitism of Vascular Plants**. *Mycologia* 66, 1-15. 1974.

MACHADO, J. C. **Comportamento de Cultivares Comerciais de Soja – *Glycine max* (L.) Merr. – Diante de Isolamentos de *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus; Moore e Transmissão de Patógenos Pelas Sementes em Função da Época de Infecção da Planta**. Viçosa, UFV. Tese de Mestrado. 1974.

MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes**. São Paulo, Gráfica Nagy. 1988.



MACHADO, J. C. **Padrões de Tolerância de Patógenos Associados à Sementes**. In: Luz, W. C.; Fernandes, J. M. C.; Prestes, A. M.; Picinini, E. C. (Eds.) Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, RAPP, vol. 8, p.229-263. 1994.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (eds), **Compendium of Soybean Diseases**, 4th edn., American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 13–14, 1999.

McGEE, D. C. **Epidemiological Approach to Disease Management Through Seed Technology**. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 445-466. 1995.

McRae, C. F.; STEVENS, G. R. **Role of Conidial Matrix of *Colletotrichum orbiculare* in Pathogenesis of *Xanthium spinosum***. Mycological Research 94, 890-896. 1990.

MERCER, P. C.; WOOD, R. K. S.; GREENWOOD, A. D. **Initial Infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum***. In: Preece, T. F.; Dickinson, C. H. (eds), Ecology of Leaf Surface Micro-organism, Academic Press, London, pp. 381-389. 1971.

MERCER, P. C.; WOOD, R. K. S.; GREENWOOD, A. D. **Ultrastructure of the Parasitism of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum***. Physiological Plant Pathology 5, 203-214. 1975.

MEYER, M. C.; YORINORI, J. T.; HENNING, A. A.; SFREDO, G. J.; FILHO, E. P.; FARIA, L. C. **Controle Integrado de Doenças da Soja no Norte do Cerrado Brasileiro**. In: Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1993/95. Embrapa – CNPSo, Londrina, p.97-100. 1997.

MOURA, D. F. **Marcadores Moleculares RAPD**. Online. Acesso em: 27 de agosto de 2007. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL001.htm>.

MUIRHEAD, I. F.; DEVERALL, B. J. **Role of Appressoria in Latent Infection of Banana Fruits by *Colletotrichum musae***. Physiological Plant Pathology 19, 77-84. 1980.

MULLIS, K.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction**. Methods Enzymol. 55: 335-350. 1987.

NEEGAARD, P. **Seed Pathology**. London, UK, MacMillan. 1979.

NELSON, R.R. **Breeding plants for disease resistance, concepts and applications.** The Pennsylvania State University, 1973. 401p

NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. **Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix.** Phytopathology 70, 255-261. 1980.

NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G.; ASQUITH, T. N. **Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that Bind Phenols: Implications for Survival and Virulence of Phytopathogenic Fungi.** Phytopathology 76, 1315-1318. 1986

NUNES JÚNIOR, et al. **Levantamento Da Ocorrência de Doenças em Soja no Estado de Goiás e Distrito Federal Durante a Safra 2002/2003.** In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 25. Londrina: Embrapa Soja, p. 163-164, 2003. (Documento, 209).

NUNES JÚNIOR, et al. **Levantamento da Ocorrência de Doenças em Soja no Estado de Goiás e Distrito Federal Durante a Safra 2003/2004.** In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 26. Londrina: Embrapa Soja, p. 137-138, 2003. (Documento, 234).

O'CONNELL, R. J. **Absence of a Specialized Interface Between Intracellular Hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and Cells of *Phaseolus vulgaris*.** New Phytologist 107, 725-734. 1987.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A. **Cellular Interactions Between *Phaseolus vulgaris* and the Hemibiotroph *Colletotrichum lindemuthianum*.** In: Bailey, J. A. (ed.), Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. Springer-Verlag, Berlin, pp. 39-48. 1986.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A. **Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*.** In: Mendgen, K. and Iseemann, E. D. (eds), Electron Microscopy of Plant Pathogens, Springer-Verlag, Berlin, pp. 211-222. 1991.

O'CONNELL, R. J.; RIDE, J. P. **Chemical Detection and Ultrastructural Localization on Chitin in Cell Walls of *Colletotrichum lindemuthianum*.** Physiological and Molecular Plant Pathology 37, 39-53. 1990.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. **Cytology and Physiology of Infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*.** Physiological Plant Pathology 27, 75-98. 1985.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; VOSE, I. R.; LAMB, C. J. **Immunogold Labelling of Fungal Antigens in Cells of *Phaseolus vulgaris* Infected by *Colletotrichum lindemuthianum***. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28, 99-105. 1986.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. da S. **RAPD indica que o agente causal de sarna do feijoeiro é um *Colletotrichum truncatum***. *Fitopatologia Brasileira* 26 (Suplemento) p.368. 2001.

PARAN, I.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R. **Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines**. *Genome* 34: 1021-1027. 1991.

PARBERY, D. G. **Biology of Anthracnoses on Leaf Surfaces**. In: Blakeman, J. P. (ed), *Microbial Ecology of the Phylloplane*, Academic Press, London, pp. 135-154. 1981.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Ed. Universidade Estadual de maringá, 1995. 275p.

PLANT PATHOLOGY. **Anthracnose on Soybean**. Acesso em: 19 de abril de 2007. Disponível em: <http://plantpathology.tamu.edu/Textlab/Fiber/Soybean/sba.html>.

PORTO, M. D. M.; CRAU, C. R.; ZOETEN, G. A.; GAARD, G. **Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on Alfafa**. *Phytopathology* 78, 345-349. 1988.

PORTER, F. M. **Protease, Cellulase and Differential Localization of Endo- and Exopolygalacturonase in Conidia and Conidial Matrix of *Colletotrichum orbiculare***. *Phytopathology* 59, 1209-1213. 1969.

RACHE, J. E. **Occurrence and Levels of the Phytoalexin Phaseollin in Relation to the Delimitation at Sites of Infection of *Phaseolus vulgaris* of *Colletotrichum lindemuthianum***. *Canadian Journal of Botany* 51, 2423-2430. 1973.

RASMUSSEN, J. B.; HANAU, R. M. **Exogenous Scytalone Restores Appressorial Melanization and Pathogenicity in Albino Mutants of *Colletotrichum graminicola***. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11, 349-352. 1989.

REITER, R. S. et al. **Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481. 1992.

- RICHARDSON, M. J. **An Annotated List of Seed-born Diseases**. Zurich, The International Seed Testing Association (ISTA). 1990.
- RONZELLI, P. Jr. **Melhoramento genético de plantas**. Curitiba: P. Ronzelli Junior, 1996. 219p
- SANTOS, D. M.; TALAMINI, V; POZZA, E. A. **Emergência e Intensidade da Antracnose em Plântulas de Soja, a Partir de Sementes Inoculadas com *Colletotrichum truncatum***. Summa Phytopathol. 26: 108-109. 2000a.
- SANTOS, D. M.; POZZA, E. A.; BOTELHO, C. E.; PINTO, A. C. S.; TALAMINI, V; MARTINS, M. F. **Influência da Quantidade de Inoculo Inicial na Incidência da Antracnose da Soja**. Fitopatologia Brasileira 25: 419 (Res.) 2000b.
- SAIKI, R. K. et al. **Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science 230: 1350-1354. 1985.
- SARTORATO, A. **Pathogenic viability and genetic diversity of *Phaesariopsis griseola* isolates from two counties in the state of Goiás, Brazil**. J. Phytopathology 152: 385-390. 2004.
- SIEGRIST, J.; KAUSS, H. **Chitin Deacetylation in Cucumber Leaves Infected by *Colletotrichum lagenarium***. Physiological and Molecular Plant Pathology 36, 267-275. 1990.
- SILVA, L. H. C. P.; NUNES-JÚNIOR, J.; GUERZONI, R. A.; SOUSA, R. P; DINIZ, E. E. **Eficácia do controle químico da ferrugem da soja**. Documentos 209 – XXV Reunião De Pesquisa De Soja Da Região Central Do Brasil. Uberaba, MG. 180-181p. 2003.
- SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of Soybean Diseases**. 3 ed. Amer. Phytopathology. Soc. St. Paul. MN. 106p. 1989.
- SKIPP, R. A.; DEVERALL, B. J. **Relationships Between Fungal Growth and Host Changes Visible by Light Microscopy During Infection of Bean Hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) Susceptible and Resistant to Physiological Races of *Colletotrichum lindemuthianum***. Physiological Plant Pathology 2, 357-374. 1972.
- SKORAPAD, W. P. **Effect of Temperature on the Ability of *Colletotrichum graminicola* to Form Appressoria and Penetrate Barley Leaves**. Canadian Journal of Plant Science 47, 431-434. 1967.

SOLIDAY, C. L.; DICKMAN, M. B.; KOLATUUKUDY, P. E. **Structure of the Cutinase Gene and Detection of Promoter Activity in the 5'-flanking Region by Fungal Transformation.** Journal of Bacteriology 171, 1942-1951. 1989.

STAMPLES, R. C.; LACCETTI, L.; YANIV, Z. **Appressorium Formation and Nuclear Division in *Colletotrichum truncatum*.** Archives of Microbiology 109, 75-84. 1976.

SUZUKI, K.; FURUSAWA, I. ISHIDA, N.; YANAMOTO, M. **Protein Synthesis During Germination and Appressorium Formation of *Colletotrichu lagenarium* spores.** Journal of General Microbiology 124, 61-69. 1981.

SUZUKI, K.; KUBO, Y.; FURUSAWA, I. ISHIDA, N.; YANAMOTO, M. **Behavior of Colourless Appressoria in an Albino Mutant of *Colletotrichum lagenarium*.** Canadian Journal of Microbiology 28, 1210-1213. 1982.

SWIBURNE, T. R. **Stimulants of Germination and Appressoria Formation by *Colletotrichum musae* (Berk. And Curt.) Arx. In Banana Leachate.** Phytopathologische Zeitschrift 87, 74-90. 1976.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; PAVÃO, J. R.; FRANÇA, R. M. G.; MACHADO, J. C. **Níveis de *Colletotrichum truncatum* em Sementes e o Progresso da Antracnose da Soja.** Fitopatologia Brasileira 26: 389 (Res.) 2001.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes.** Inf. Agropec. 11, 40-46. 1985.

TEBEEST, D. O.; TEMPLETON, G. E.; SMITH, R. J. **Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* on Northern Jointvetch.** Phytopathology 68, 1271-1275. 1978.

TIFFANY, L. H. **The Anthracnose Complex on Soybeans.** J. Dep. Agric. Viet., 49: 259-264. In.: Review os Applied Mycology, Oxford, 30: 598-599. 1951.

TIFFANY L. H.; GILMAN, J. C. **Species os *Colletotrichum* from legumes.** Mycology, Lancaster, PA, 46: 52-75. 1954.

TULLU, A. et al. **Genetics of resistance to anthracnose and identification of AFLP and RAPD markers linked to the resistance gene in PI 320937 germplasm of lentil (*Lens culinaris* Medikus).** Theor Appl Genet 106: 428-434. 2003.

URONU, A. B. **Studies on the Infection of Pea (*Pisum sativum*) by *Colletotrichum pisi*.** MSc in Crop Protection, Project Report, University of Bath. 1989.

VASCONCELOS, M. J. V.; MACHADO, M. A.; ALMEIDA, A. M. R.; HENNING, A. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. **Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA.** Fitopatologia Brasileira, 19: 520-523. 1994.

WALKER, J. C. **Onion Smudge.** Journal of Agricultural Research 20, 685-721. 1921.  
WOLKOW, P. M.; SISLER, H. D.; VIGIL, E. L. **Effects of Inhibitors of Melanin Biosynthesis on Structure and Function of Appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*.** Physiological Plant Pathology 23, 55-71. 1983.

WRATHER, J. A.; ANDERSON, T. S.; ARSYAD, D. M.; GAI, J.; PLOPER, L. D. PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H. H.; YORINORI, J. T. **Soybean Disease Loss Estimates For The Top 10 Soybean Producing Countries in 1994.** Plant Disease 81: 107-110. 1997.

YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A. HIROMOTO, D. M.; ROLIM, F. L. B.; KLINGELFUSS, L. H. **Avaliação da Reação de Genótipos de Soja às Doenças Fúngicas e Variabilidade Patogênica.** In: Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1999. Embrapa Soja, Londrina, p.59-64. 2000. (Documentos, 142).

## CAPÍTULO 1

### **AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A *Colletotrichum truncatum* SOB CONDIÇÕES DE CAMPO.**

#### **RESUMO**

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Universidade de Rio Verde, junho de 2008. **Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* sob condições de campo.** Orientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos. Co-orientadores: Dr. Aloísio Sartorato e Prof. Dr. Takeshi Kamada.

Embora a resistência genética seja a maneira mais econômica e eficaz de controle de doenças, não há cultivar resistente para a maioria delas, inclusive para a antracnose. Com o intuito de selecionar genótipos de soja com resistência ao *C. truncatum*, foi realizado um ensaio na Fazenda Pindaibas – YPAGEL, Rio Verde – GO. Foram avaliados 25 genótipos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com parcela útil de 7,2m<sup>2</sup>. A cultivar BRSMT Uirapuru foi utilizada como padrão de suscetibilidade. Foram feitas duas inoculações nas plantas, sendo a primeira no estádio R1 e a segunda 15 dias após a primeira, utilizando uma suspensão de 1,5 x 10<sup>6</sup> conídios/ mL. Os genótipos foram avaliados quanto à incidência da doença nos trifólios, vagens e sementes. Os genótipos BRSGO Luziânia e BRSGO Indiará apresentaram menor porcentagem de incidência de antracnose nos trifólios. Nas vagens, o menor percentual de lesões foi apresentado pela cultivar BRSGO Luziânia.

Palavras-chave: *Glycine max*, antracnose, fungo, controle.

## ABSTRACT

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Rio Verde University, June of 2008. **Evaluation of the Resistance of Genotypes of Soy to the *Colletotrichum truncatum*.** Adviser: teacher Dr. Hercules Diniz Campos. Co-adviser: Dr. Aloísio Sartorato and teacher. Dr. Takeshi Kamada.

Although the genetic resistance is the most efficient and economic way of disease control, there is no resistant varieties for the majority of them, including anthracnose. In order to select genotypes of soybean with resistance to the *C. truncatum*, it was carried out an assay in the Pindaibas Farm - YPAGEL, Rio Verde - GO. Twenty five genotypes were evaluated. The experimental design used was the randomized blocks, with evaluated area of 7.2m<sup>2</sup>. The variety BRSMT Uirapuru was used as the susceptible standard variety. Two inoculations was realized; the first one when the plants were in R1 stage and the second 15 days after the first one, using a suspension of 1.5 x 10<sup>6</sup> conidias/mL. The genotypes were evaluated by the percentage of disease incidence in both trifoliolates and pods, as well the level of seed infestation. The genotypes BRSGO Luziânia and BRSGO Indiará showed minor percentage of anthracnose incidence in the trifoliolates. In the pods, the minor percentage of injuries was showed by the variety BRSGO Luziânia. In the seeds, the percentage of infestation was low, ranging from 0 to 2%. The genotype BRSMT Uirapuru, used as the susceptible standard variety presented, in general way, medium susceptibility.

Key words: *Glycine max*, anthracnose, fungus, control.



## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento das áreas cultivadas com a soja em sistema de cultivo plantio direto aliado à ausência de rotação de culturas, a antracnose deixou de ser uma doença secundária e, hoje, é um problema fitossanitário de grande importância para a cultura.

Embora a resistência genética seja a maneira mais econômica e eficaz de controle de doenças, não há cultivar resistente para a maioria delas, incluindo para a antracnose. No entanto, um dos primeiros trabalhos sem sucesso buscando resistência ao patógeno foi realizado por McNew em 1948. Quando a antracnose tornou-se potencialmente importante nos Estados Unidos, Tiffany (1951) admitiu a existência de fontes de resistência à enfermidade analisando o comportamento em nível de campo de diferentes genótipos.

De 1981 a 1983, aproximadamente 1500 acessos dos grupos de maturação V até VIII do banco de germoplasma do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos foram avaliados com relação à resistência a antracnose em condições de campo, detectando-se 43 genótipos resistentes (Bowers, 1984). Entretanto, a busca de fontes de resistência requer o conhecimento de condições adequadas e controladas para o desenvolvimento consistente da doença (Phipps; Beute, 1977). A inoculação artificial, em que as chances de escape são diminuídas, proporciona um método mais rápido e eficiente de seleção (Giessen; Steenbergen, 1957).

No Brasil, Reis (1973) testou 93 genótipos de soja e selecionou a cultivar IAC 1 como resistente à antracnose. Da mesma forma, Machado e Carvalho (1975) não encontraram bons níveis de resistência em nenhum dos 21 genótipos comerciais avaliados.

Nechet et al (2004) avaliaram o comportamento de 15 genótipos de soja quanto à reação à antracnose e à mela. Tiveram como resultado alta incidência simultânea das doenças em todos os genótipos. Meyer, et al (1995) avaliando 54 genótipos de soja com objetivo de identificar possíveis fontes de resistência ou tolerância, conseguiram selecionar 15 genótipos que apresentaram menor incidência de antracnose, porém todos eles suscetíveis.

Através desses trabalhos, é possível verificar a inexistência de variedades resistentes e a dificuldade de se encontrar genótipos que sirvam de fonte de resistência para um posterior melhoramento genético a fim de se obterem cultivares resistentes.

As informações sobre genótipos de soja que apresentam resistência à antracnose ou que sejam menos suscetíveis ainda é escasso. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo

selecionar genótipos de soja com resistência ao *Colletotrichum truncatum*, através de plantas crescidas sob condições de campo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Pindaíba-YPAGEL, no município de Rio Verde, GO, no período de novembro de 2004 a março de 2005. Foi utilizada uma área de plantio direto, na qual, na safra de 2003/2004, havia sido cultivado soja com ocorrência de antracnose.

Foram avaliados 25 genótipos (cultivares e linhagens) (Tabela 1) sendo 10 com ciclo de maturação precoce (até 115 dias), 8 médio (116 a 130 dias) e 7 tardio (acima de 130 dias). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao caso com quatro repetições. Cada parcela foi constituída de seis fileiras de cinco metros de comprimento, com espaçamento de 45 cm entre fileiras, sendo a parcela útil constituída pelas quatro fileiras centrais. Foram eliminados 50 cm de cada extremidade da parcela, sendo, portanto, a área útil da parcela igual a 7,2m<sup>2</sup>. A densidade de plantas por metro linear seguiu a recomendação para cada genótipo (Tabela 1).

Antes da semeadura, as plantas daninhas foram controladas por dessecação utilizando-se 1.680g i.a./ ha de glifosato.

A semeadura foi realizada no mês de novembro. A adubação foi realizada conforme a análise de solo, sendo adicionados 450 kg/ha de Super Fosfato Simples, o qual foi distribuído no momento da semeadura. Os herbicidas utilizados em pós-plantio para controle de plantas daninhas foram: 7,5 g i.a./ha de Chlorimuron ethyl + 72 g i.a./ha de Lactofen + 5,88g i.a./ha de Imazethapyr e 62,35 g i.a./ha de Haloxifop-R. Foram realizadas duas pulverizações com fungicida Flutriafol (37,5g i.a./ha em cada pulverização), nos estádios fenológicos R1 e R5.1, com objetivo de controlar apenas ferrugem. Para o controle de pragas como percevejo marrom, lagarta da soja e lagarta falsa-medideira foram utilizados inseticidas com suas respectivas dosagens, conforme registrados no Ministério da Agricultura.

A cultivar BRSMT Uirapuru foi utilizada como padrão de suscetibilidade (informação pessoal José Nunes Júnior - CTPA<sup>1</sup>).

---

<sup>1</sup>CTPA – Centro Tecnológico para Pesquisa Agropecuária

No estágio fenológico R.1 (Início da floração: até 50% das plantas com uma flor), as parcelas foram inoculadas com uma suspensão contendo,  $1,5 \times 10^6$  conídios/mL de *C. truncatum* conforme mencionado por Henning et al. (1997). No preparo dessa suspensão, utilizaram-se 8 isolados obtidos na região de Rio Verde – GO, cujo crescimento foi conduzido em BDA. Uma segunda pulverização foi realizada 15 dias após a primeira, utilizando-se uma suspensão de esporos com a mesma concentração de conídios. As pulverizações foram realizadas após as 18 horas para que as condições de temperatura e umidade fossem favoráveis ao fungo.

Tabela 1 Caracterização das cultivares e linhagens de soja quanto ao ciclo de maturação e população recomendada.

Nº Tratamento	Cultivares / Linhagens	Ciclo de maturação	População de Plantas /ha	Plantas/m
1	BRS Rosa	Precoce *	333.333	15
2	Emgopa 316	Precoce	333.333	15
3	BRS Nina	Precoce	333.333	15
4	BRSGO Caiapônia	Precoce	333.333	15
5	BRS Flora	Precoce	333.333	15
6	BRSGO Mineiros	Precoce	333.333	15
7	BRSGO 204 (Goiânia)	Precoce	333.333	15
8	GOBR94-09443.00.02	Precoce	333.333	15
9	GOBR98-094015	Precoce	333.333	15
10	GOBR97-14346	Precoce	333.333	15
11	GOBR97-15587	Médio**	288.888	13
12	BRSGO Luziânia	Médio	288.888	13
13	Emgopa 315	Médio	288.888	13
14	BRSGO Santa Cruz	Médio	288.888	13
15	BRSGO Indiara	Médio	288.888	13
16	BRS Pétala	Médio	288.888	13
17	BRSGO Paraíso	Tardio***	266.666	12
18	BRSGO Amaralina	Tardio	266.666	12
19	BRSGO Jataí	Tardio	266.666	12
20	BRSGO Ipameri	Tardio	266.666	12
21	BRS Raimunda	Tardio	266.666	12
22	GOBR98-085064	Tardio	266.666	12
23	EMGOPA-308.00.07	Tardio	266.666	12
24	BRSMT Uirapuru	Médio	288.888	13
25	A-7002	Médio	288.888	13

\*Ciclo Precoce: até 115 dias; \*\*Ciclo Médio: 116-130 dias; \*\*\*Ciclo Tardio: acima de 130 dias.

Para seleção de genótipos com resistência ao *C. truncatum*, foram avaliadas: incidência da doença (% de trifólios com lesões nas nervuras e % de vagens com lesões); rendimento de

grãos (produtividade e peso de 1000 grãos) e análise sanitária dos grãos (% de grãos com *C. truncatum*).

Para obtenção da incidência da doença, foram realizadas 4 (quatro) avaliações da porcentagem de trifólios com lesão nas nervuras; a primeira em R.1 (3 dias após a inoculação 14/02/2005), a segunda, 20 dias após a primeira (04/03/2005), a terceira, 20 dias após a segunda (24/03/2005) e a quarta, quando as plantas encontravam-se no estágio fenológico R.7 (Início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens), ocasião em que foi também quantificado o número de vagens por planta e o número de vagens com lesões. A última avaliação de % de trifólios com lesão nas nervuras foi feita em diferentes épocas, já que os ciclos dos genótipos eram variáveis. Para essas avaliações, foram coletadas e analisadas 10 plantas de forma aleatória em cada parcela útil, obtendo-se um valor médio por parcela.

Para obtenção do rendimento, foram colhidas as plantas da parcela útil e, após trilhadas e os grãos pesados, foram expressos em produtividade (Kg/ha), com umidade dos grãos corrigida a 13%, seguido da obtenção do peso de 1000 grãos, conforme preconizado na Ata da XXVI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (2004).

A análise sanitária dos grãos foi realizada com base no teste de patologia para cada tratamento, utilizando o método “blotter test”, com restrição hídrica (Machado et al, 2003).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 25 tratamentos (genótipos) em quatro repetições. Cada repetição constitui-se de 100 sementes. Após a incubação por oito dias em câmara a  $24 \pm 2$  °C e 12 horas luz e 12 horas de escuro, identificaram-se e quantificaram-se as sementes contendo a presença do patógeno, obtendo-se a incidência de *C. truncatum*.

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar, utilizando o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade, para comparação de médias. Para a análise sanitária dos grãos, os dados foram transformados para raiz quadrada de  $(X + 1)$ .

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A porcentagem de trifólios com sintomas de antracnose na primeira avaliação, no estágio fenológico R1, variou de 9,95 a 37,5 %. Os genótipos GOBR98-094015, Emgopa 316 e GOBR97-14346 foram os que apresentaram as menores incidências da doença, não havendo diferença significativa entre eles. Os genótipos BRSGO Caiapônia, BRS Rosa e BRSGO Mineiros foram os que apresentaram os maiores percentuais de trifólios lesionados, (Tabela 2).

TABELA 2 – Tabela de resultados.

Nº Tratamento	Cultivares / Linhagens	Incidência de Trifólios – 1 <sup>a</sup> avaliação	Incidência de Trifólios – 2 <sup>a</sup> avaliação	Incidência de Trifólios – 3 <sup>a</sup> avaliação	Incidência de Trifólios – 4 <sup>a</sup> avaliação	Incidência de Vagens	% de Grãos infestados
1	BRS Rosa	33,750 d	34,00 d	86,25 e	87,50 e	87,50 e	1,50 b
2	Emgopa 316	10,075 a	20,00 a	93,75 e	95,75 e	92,50 e	0,50 a
3	BRS Nina	25,750 c	27,33 c	73,50 d	94,50 e	92,50 e	2,00 b
4	BRSGO Caiapônia	33,000 d	38,00 d	92,00 e	94,75 e	92,25 e	1,75 b
5	BRS Flora	17,250 b	17,00 a	32,50 a	94,50 e	91,75 e	1,00 b
6	BRSGO Mineiros	37,500 d	33,00 d	90,25 e	93,00 e	39,25 b	0,00 a
7	BRSGO 204 (Goiânia)	18,500 b	21,75 b	74,00 d	87,50 e	85,25 d	0,25 a
8	GOBR94-09443.00.02	14,750 b	23,50 b	83,50 e	92,00 e	81,00 d	0,25 a
9	GOBR98-094015	9,950 a	24,00 b	73,25 d	92,50 e	90,50 e	0,00 a
10	GOBR97-14346	11,500 a	26,50 c	69,75 d	94,00 e	87,75 e	1,50 b
11	GOBR97-15587	14,250 b	17,75 a	42,25 b	93,25 e	93,25 e	0,75 a
12	BRSGO Luziânia	15,750 b	23,75 b	32,00 a	72,75 c	25,00 a	0,25 a
13	Emgopa 315	17,500 b	23,50 b	38,25 b	62,50 b	84,50 d	0,25 a
14	BRSGO Santa Cruz	24,750 c	22,75 b	59,00 c	94,00 e	81,00 d	0,00 a
15	BRSGO Indiara	17,250 b	27,00 c	32,75 a	52,50 a	38,75 b	0,25 a
16	BRS Péta	18,750 b	23,00 b	52,25 c	96,75 e	88,00 e	0,25 a
17	BRSGO Paraíso	22,000 c	31,75 d	75,50 d	94,25 e	83,75 d	0,00 a
18	BRSGO Amaralina	22,000 c	27,75 c	71,25 d	93,50 e	64,50 d	0,00 a
19	BRSGO Jataí	27,750 c	29,75 c	64,75 d	96,75 e	89,00 e	0,25 a
20	BRSGO Ipameri	23,000 c	27,00 c	68,75 d	93,00 e	88,00 e	0,25 a
21	BRS Raimunda	25,250 c	32,25 d	72,25 d	93,25 e	83,75 d	0,00 a
22	GOBR98-085064	19,250 b	26,25 c	41,00 b	77,75 d	89,00 e	0,25 a
23	EMGOPA-308.00.07	24,250 c	18,00 a	59,00 c	92,25 e	52,75 c	0,25 a
24	BRSMU Uirapuru	25,250 c	25,50 c	58,50 c	92,00 e	85,50 d	0,75 a
25	A-7002	21,750 c	15,75 a	43,50 b	92,25 e	89,00 e	0,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Com os resultados obtidos, foi possível classificar os genótipos em quatro grupos. No primeiro grupo, a incidência de trifólios afetados variando de 9,95 a 11,5%. No segundo grupo, a incidência variou de 14,25 a 19,25%. No terceiro grupo, variou de 21,75 a 27,75% e no quarto grupo, variou de 33 a 37,5%. Observou-se, também, que o genótipo considerado padrão de suscetibilidade enquadrou-se no terceiro grupo, sendo superior a seis genótipos.

Na segunda avaliação, os genótipos A-7002, BRS Flora, GOBR97-15587, EMGOPA 308.00.07 e EMGOPA 316 apresentaram variando de 15,75 a 20,00% (Tabela 3). Os genótipos BRSGO Paraíso, BRS Raimunda, BRSGO Mineiros, BRS Rosa e BRSGO Caiapônia vieram os que apresentavam as maiores incidência da doença.

Na terceira avaliação, realizada 40 dias após a primeira, os genótipos BRSGO Luziânia, BRS Flora e BRSGO Indiará obtiveram 32%, 32,5% e 32,75% de trifólios lesionados, respectivamente, sendo estes os genótipos com menor incidência (Tabela 4). Contudo, os genótipos GOBR94-09443.00.02, BRS Rosa, BRSGO Mineiros, BRSGO Caiapônia e Emgopa 316 apresentaram os maiores percentuais de trifólios lesionados, variando entre 83,50 e 93,75%.

Na quarta avaliação dos trifólios, quando as plantas apresentou-se no estágio fenológico R7, a cultivar BRSGO Indiará diferiu significativamente dos demais genótipos com 52,5 % dos trifólios lesionados. Os genótipos Emgopa 315, BRSGO Luziânia, GOBR98-085064 também diferiram significativamente entre si e em relação aos demais genótipos, variando entre 62,50% e 77,75% (Tabela 5), sendo inferior apenas à cultivar BRSGO Indiará. Para os demais genótipos, a incidência variou de 87,50% (BRSGO 204 – Goiânia) a 96,75% (BRS Pétala) e não diferiram estatisticamente entre si.

Analisando os resultados de todas as avaliações, de forma conjunta, observamos que os genótipos BRSGO Luziânia e BRSGO Indiará apresentaram estatisticamente menor incidência de trifólios com antracnose, seguido pelos genótipos Emgopa 315, GOBR 98-08064 e GOBR 97-15587.

Nas vagens, o menor percentual de lesões foi apresentado na cultivar BRSGO Luziânia (25,00%), seguido pelas cultivares BRSGO Indiará, BRSGO Mineiros e EMGOPA – 308.00.07 com 38,75%, 39,25% e 52,75%, respectivamente (Tabela 6).

Os demais genótipos apresentam percentual de vagens lesionadas, variando entre 81,00% (BRSGO Santa Cruz) e 93,25% (GOBR 97-15587).

Entre as cultivares, aquelas que apresentaram maior percentual de lesões nas vagens (acima de 87,50%) foram a BRS Rosa, BRS Pétala, BRSGO Ipameri, BRSGO Jataí, A-7002, BRS Flora, BRSGO Caiapônia, Emgopa 316 e BRS Nina.

Considerando os resultados de incidência nos trifólios e nas vagens, as cultivares BRSGO Luziânia e BRSGO Indiara foram menos suscetíveis à antracnose. E os genótipos BRSGO Caiapônia, Emgopa 316, BRS Nina e BRS Flora foram as mais suscetíveis à doença. O genótipo BRSMT Uirapuru, considerado padrão de suscetibilidade (testemunha) apresentou, de modo geral, suscetibilidade intermediária.

Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de estudar o comportamento de genótipos de soja em relação ao *C. truncatum*. Mc New (1948) observou que as cultivares Lincoln Richland, Harbaro e Manchukoto foram igualmente suscetíveis ao patógeno, de denominação na época *Glomerella glycines*. Tiffany (1951) admitiu haver fontes de resistência à antracnose da soja ao assinalar que a antracnose estava se tornando potencialmente importante nos Estados Unidos à medida que foram introduzidas novas cultivares. No Brasil, Reis (1973), utilizando apenas um isolado de *C. trunicolium*, concluiu que, de 93 genótipos testados, apenas o IAC 1 foi resistente. Machado; Carvalho (1975), também estudaram o comportamento de 21 genótipos comerciais de soja, avaliados no estágio cotiledonar, observando que o menor índice de doença encontrado foi de 33%. Esses autores concluíram que nenhum dos genótipos testados foi resistente ao isolado do patógeno utilizado. Alguns genótipos, entretanto, mostraram-se menos suscetíveis como Mineira, UFRV 1, Planalto, CTS 132 e Viçosa.

Bowers (1984) avaliou durante os anos de 1983 e 1984, aproximadamente 1500 genótipos dos grupos de maturação<sup>2</sup> V até VIII com relação à resistência à antracnose em experimento de campo, utilizando sintomas nas hastes e na vagens provocadas pela infecção natural do patógeno. Na avaliação foi utilizada uma escala de notas variando de 1 a 9, de acordo com a extensão das lesões. Trinta e nove genótipos foram considerados como resistentes.

Manandhar et al (1986, 1988), em experimentos conduzidos em câmaras de crescimento e casas – de – vegetação, avaliaram 413 genótipos com relação à resistência a antracnose. As plantas foram inoculadas quando estavam com a primeira folha trifoliolada (estádio fenológico V1), e avaliadas segundo uma escala de notas variando de 0 (sem sintomas) a 4 (75 a 100% da nervura com sintomas). Os seguintes genótipos foram relatados

---

<sup>2</sup> Os grupos de maturação referem-se ao grau de sensibilidade ao fotoperíodo, em escala crescente (de 00, 0, I, II, III até X) do requerimento em dias curtos (região de adaptação). A maioria das cultivares pertencentes ao grupo de maturação 00 ao IV possuem hábito de crescimento indeterminado, enquanto que as do grupo V a VIII apresentam hábito de crescimento determinado. Esta classificação é comumente utilizadas para cultivares americanas.

como resistentes: PI 95860, Tarheel Black, Early White Eyebrow, Mandarin (Ottawa), mandarin, Weseda Boone.

A cultivar IAC 1, testada por Reis (1973), e avaliada como resistente, mostrou resultado diferente no trabalho de Câmara (1994), apresentando um índice de doença de 2,14 no estádio cotiledonar e 2,43 no estádio V 1, sendo considerada suscetível.

Meyer (1994) avaliou genótipos de soja quanto a resistência a doenças de final de ciclo e antracnose. Cada parcela do experimento recebeu duas aplicações de fungicidas. Os resultados foram obtidos ao comparar as partes com e sem fungicida do experimento. Foram selecionados 32 genótipos, destacando-se aqueles que apresentavam “Dourados”, “FT-5” e “FT-6” em suas genealogias.

Da mesma forma, 54 genótipos de soja foram avaliados quanto à resistência a antracnose e doenças de final de ciclo. Para avaliar a incidência da doença, utilizou-se uma escala de notas de 1 a 5, para nível de infecção e tamanho da lesão. Dos 54, foram selecionados 15 genótipos, dentre os quais 9 apresentam “Dourados” em sua genealogia (MEYER, 1995).

Nechet et al. (2004), ao avaliarem 15 genótipos de soja quanto a resistência à antracnose e à mela, relatou a ocorrência simultânea de ambas as doenças em todos os genótipos. Para antracnose, a incidência nas vagens variou de 2,8% (Tracajá e Pati) a 29% (IAC-8). No trabalho de Nechet et al. (2004), a cultivar BRSGO Jataí apresentou 8,7% das vagens com sintomas da doença. Este resultado diferiu do encontrado no presente estudo, onde a mesma cultivar apresentou 89,00% das vagens com lesões. Essa diferença possivelmente ocorreu devido ao ensaio de Nechet não ter sido realizada nenhuma inoculação, deixando que a infecção ocorresse de forma natural; outra hipótese pode ser uma variação patogênica do isolado. Nesse experimento, nada foi comentado sobre o histórico da área, o que também pode ter influenciado na fonte de inóculo. Além disso, neste trabalho, a avaliação foi realizada quando as plantas encontravam-se no estádio R6 (vagens com 100% de granação e folhas verdes). E, no presente estudo, a avaliação foi realizada em R7 (Início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens).

Um fator que deve ser levado em consideração é a variabilidade patogênica do fungo que pode proporcionar diferenças nos resultados caso este ensaio seja repetido com isolados diferentes. Estudos sobre variabilidade patogênica de isolados de *C. truncatum* ainda é escasso.

Analisando a média dos resultados de cada avaliação, avaliou-se o progresso da doença em função da idade da planta (Figura 1). Na primeira avaliação, quando as plantas



encontravam-se no estágio fenológico R.1 a incidência nos trifólios foi de 21,23%. Na terceira avaliação, quando as plantas estavam no estágio fenológico R.5, a incidência aumentou para 63,23%. Na quarta e última avaliação, quando as plantas encontravam-se no estágio fenológico R.7, a média para os genótipos foi de 88,91% de incidência.

Outro fator a ser considerado é que neste trabalho somente foram avaliados os sintomas visíveis, e conforme Luttrell (1974), a antracnose possui característica sistêmica de infecção, estando presente no interior da planta muito antes do aparecimento dos primeiros sintomas.

Tiffany (1951) demonstrou que plântulas sem nenhum tipo de sintoma, cultivadas em solo não-estéril, foram obtidas a partir de sementes inoculadas com uma suspensão de conídios de *C. truncatum*. O Patógeno foi detectado, posteriormente, nos cotilédones e no córtex dos caules analisados, e também nas vagens e cotilédones das plantas provenientes das sementes produzidas neste ensaio.

Costa (2006) avaliou seis cultivares comerciais a fim de determinar a reação dos materiais à infecção por isolados de *C. truncatum* e a expressão de resistência ao patógeno quando inoculados nos estádios fenológicos V1/V2 e V5/V6. Não houve resposta significativa aos diferentes isolados; porém as cultivares inoculadas em estádios fenológicos mais avançados apresentaram um índice de resistência maior. Das seis cultivares testadas, a cultivar Emgopa 316 compoostou como suscetível quando inoculada em V1/V2, conferindo com os resultados do presente trabalho.

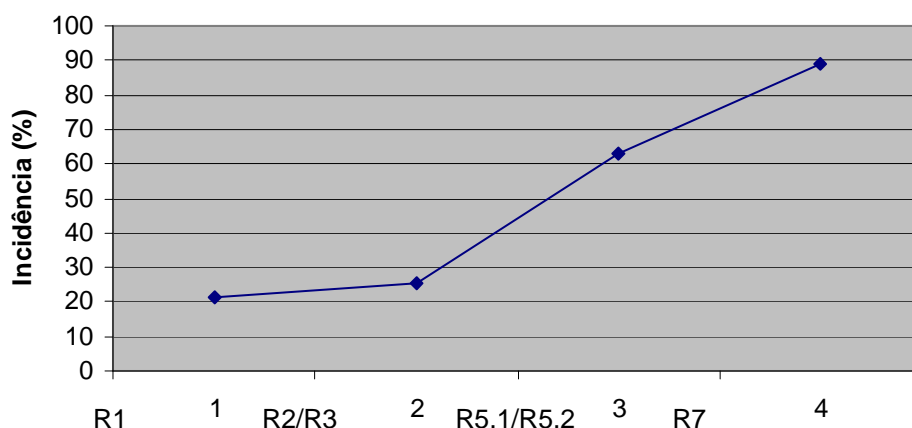


Figura 1 Evolução da incidência média da antracnose (percentual de trifólios lesionados) nos 25 genótipos testados durante os quatro períodos de avaliação em função dos estádios fenológicos.

Quando a compração foi realizada levando-se em consideração as cultivares dentro de cada grupo de maturação (ciclo precoce, médio e tardio), o comportamento foi semelhante (Figura 2). Esperava-se que em cultivares de ciclo médio e tardio a evolução da doença a partir do enchimento dos grãos fosse maior em relação às cultivares de ciclo precoce, o que não foi.

Costa (2005), ao analisar trifólios de plantas inoculadas no estágio R.5/R.6, observou índices menores para cultivares de ciclo precoce quando comparadas a cultivares de ciclo médio e tardio.

Kaushal et al (1998) encontraram maior incidência *C. truncatum*, nos trifólios *C. truncatum* em cultivares precoces de soja ao avaliar plantas adultas com inoculação natural a campo.

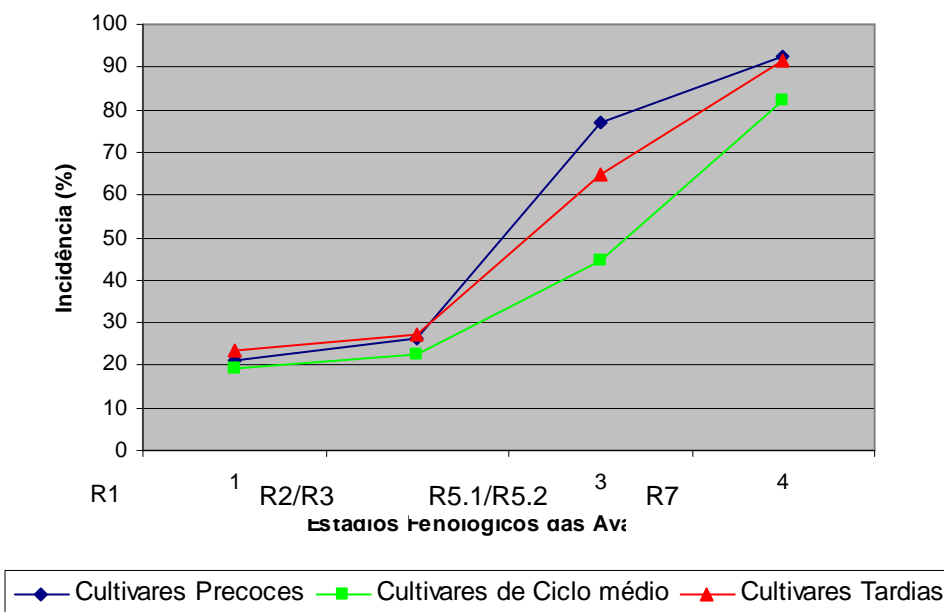


Figura 2 Incidência média (percentual de trifólios lesionados) de antracnose nos 25 genótipos, testados em função dos estádios fenológicos em cada grupo de genótipos de acordo com o ciclo reprodutivo.

Os resultados do teste de patologia de sementes conferem com a incidência de sintomas nos trifólios, em que as cultivares que se destacaram como mais suscetíveis foram a Caiapônia, Emgopa 316, Nina e Flora. Embora os níveis não tenham sido tão altos (máximo 2%), as mesmas cultivares apresentaram os índices mais elevados do teste.

As cultivares Indiara e Luziânia, consideradas as menos suscetíveis, com base na incidência de sintomas nos trifólios, apresentaram os menores níveis de incidência do fungo nos grãos.

Segundo Tiffany (1951) e Machado; Carvalho (1975), foi possível demonstrar a transmissão do patógeno da planta para a semente quando as plantas foram inoculadas em condições de campo e em ambiente protegido.

Tabela 3 Percentual de grãos infestados ou infectados pelo fungo *C. truncatum*.

Tratamentos	Cultivares/ Linhagens	Médias
17	BRS GO Paraíso	0,00 a
14	BRS GO Santa Cruz	0,00 a
21	BRS Raimunda	0,00 a
18	BRS GO Amaralina	0,00 a
25	BRS Rosa	0,00 a
9	GOBR98-094015	0,00 a
6	BRS GO Mineiros	0,00 a
8	GOBR94-09443.00.02	0,25 a
20	BRS GO Ipameri	0,25 a
23	EMGOPA-308.00.07	0,25 a
22	GOBR98-085064	0,25 a
7	BRS GO 204 (Goiânia)	0,25 a
15	BRS GO Indiara	0,25 a
13	Emgopa 315	0,25 a
12	BRS GO Luziânia	0,25 a
19	BRS GO Jataí	0,25 a
16	BRS Pétala	0,25 a
2	Emgopa 316	0,50 a
11	GOBR97-15587	0,75 a
24	A-7002	0,75 a
5	BRS Flora	1,00 b
1	BRS Rosa	1,50 b
10	GOBR97-14346	1,50 b
4	BRS GO Caiapônia	1,75 b
3	BRS Nina	2,00 b
CV(%)		18,84

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

## 4 CONCLUSÕES

- ✓ Os genótipos BRSGO Luziânia e BRSGO Indiará apresentaram menor incidência de antracnose nos trifólios.
- ✓ A menor porcentagem de lesões nas vagens foi apresentado pela cultivar BRSGO Luziânia.
- ✓ Considerando os resultados de incidência nos trifólios e nas vagens, as cultivares BRSGO Luziânia e BRSGO Indiará foram menos suscetíveis a doença. Os genótipos BRSGO Caiapônia, EMGOPA 316, BRS Nina e BRS Flora foram as mais suscetíveis.
- ✓ O genótipo BRSMT Uirapuru, considerado padrão de suscetibilidade apresentou, de modo geral, suscetibilidade média.
- ✓ A evolução da doença, em função dos estádios fenológicos, foi progressiva, sendo mais acentuada a partir de R.2 / R.3.
- ✓ A evolução da doença, em função dos estádios fenológicos, foi bastante similar nos três ciclos de maturação (precoce, médio e tardio) da soja.
- ✓ A incidência do patógeno nos grãos foi proporcional à incidência de sintomas nos trifólios.

## REFERÊNCIAS

BOWERS, G. R. **Resistance to anthracnose**. Soybean Genetics Newsletter 11: 150-151. 1984.

CAMARA, M. P. S. **Seleção de germoplasma de soja resistente à antracnose e estudo sobre infecção de sementes por fungo**. Brasília-DF, Universidade de Brasília. 1994. (Tese de Mestrado).

COSTA, I. F. D. **Controle de doenças de final de ciclo na cultura da soja**. Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria. 2005 (Tese de Doutorado)

COSTA, I. F. D. et al. **Resistência de cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos**. Ciência Rural, v. 36, n. 6, p. 1684-1688, nov. – dez., 2006.

GIESSEN, A. V. J.; STEENBERGEN, A. V. **A New Method of Testing Beans for Anthracnose**. Euphytica 6: 90-93. 1957.

KAUSHAL, R. P.; ANIL KUMAR; TYAGI, P. D. **Role of light, temperature and relative humidity on germination of *Colletotrichum truncatum* and soybean pod infection under laboratory conditions**. Journal of Mycology and Plant Pathology, 28 (1): 1-4. 1998.

LIN, Y. S.; WU, L. C. **Seed-born diseases of soybean in Taiwan**. III Anthracnose. Plant. Prot. Bull. (Taiwan) 8: 305-317. 1966.

LUTTREL, E. S. **The Parasitism of Vascular Plants**. Mycologia 66, 1-15. 1974.

MACHADO J. da C.; CARVALHO, M. G. **Comportamento de Cultivares Comerciais de Soja Diante de Isolamentos de *Colletotrichum truncatum* e Transmissão de Patógeno pela Semente em Função da Época de Infecção da Planta**. Experimentatiae, 19: 119-148. 1975.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. **Reaction of soybean germplasm of maturity groups 000 to X to anthracnose, 1984-85**. Biological and Cultural Tests 1: 32-33. 1986.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. **Soybean germplasm evaluation for resistance to *Colletotrichum truncatum***. Plant Disease 72: 56-59. 1988.

McNew, G. L. **Report on Agricultural Research for the Year Ending June 30, 1948.** Rep. In. Agric. Exp. Sta., 1947-48, 390p., In Review of Applied Mycology, Oxford, 29: 81. 1948.

MEYER, M. C. **Avaliação de genótipos de soja para resistência de doenças de final de ciclo e antracnose.** In: REUNIAO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIAO CENTRAL DO BRASIL, 16., 1994, Dourados. Ata e resumos. Dourados: EMBRAPA, 1994. p. 122.

MEYER, M. C.; YORINORI, J. T.; SFREDO, G. J. FARIA, L. C. **Avaliação de Genótipos de Soja para Resistência a Doenças de Final de Ciclo e Antracnose – Safra 1994/95.** In. REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIAO CENTRAL DO BRASIL, 17, 1995, Goiânia. Ata e Resumos: EMGOPA, p. 147.1995.

NECHET, K. de L.; HALFELD- VIEIRA, B. de A.; GIANLUPPI, V.; MEYER, M. C. **Avaliação de Genótipos de Soja em Relação a Antracnose. (*Colletotrichum truncatum*) e Mela (*Tenatephorus cucumeris*) nas Condições de Roraima.** Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2. 16p. 2004

PHIPPS, P. M.; BEUTE, M. K. **Influence of Soil Temperature and Moisture on the Severity of *Cylindrocadium* black rot in Peanut.** Phytopathology 67: 1104- 1107.

REIS, E. M. **Efeito da Concentração de Inoculo de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (schw.) Von Arx na Reação de Cultivares de Soja (*Glycine max* (L.) Merr.).** Piracicaba, ESALQ, 48p. (Tese M. S.). 1973.

RODRIGUES-MARCANO, A.; SINCLAIR, J. B. **Variation among isolates of *Colletotrichum dematium* var. *truncata* from soybeans and the three *Colletotrichum* spp. to benomyl.** J. Agric. Univ. Puerto Rico 66: 35-43. 1980.

TIFFANY, L. H. **The Anthracnose Complex on Soybeans.** J. Dep. Agric. Viet., 49: 259-264. In.: Review of Applied Mycology, Oxford, 30: 598-599. 1951.

## CAPÍTULO 2

### ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum truncatum* ATRAVÉS DA TÉCNICA MOLECULAR RAPD

#### RESUMO

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Universidade de Rio Verde, junho de 2008. **Estudo da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum truncatum* através da técnica molecular rapd.** Orientador: Prof. Dr Hercules Diniz Campos. Co-orientadores: Dr. Aloísio Sartorato e Prof. Dr. Takeshi Kamada.

Embora a antracnose da soja, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, seja considerada como uma das principais doenças da Região do Cerrado brasileiro, podendo causar perda total da lavoura, poucos estudos têm sido realizados para estudar a diversidade genética deste fungo. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar, utilizando a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes de lavouras da Região Central do Brasil. Avaliaram-se 34 isolados oriundos de lavouras dos estados de Goiás, Mato Grosso, Tocantins e Paraná, Brasil. Utilizou-se 18 *primers* e obtiveram-se 106 marcadores polimórficos. O índice de dissimilaridade utilizado foi o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA. Os isolados apresentaram nítida dissimilaridade genética, formaram-se três grupos distintos, constituídos predominantemente pelos isolados de mesma localidade. Os isolados que apresentaram menor distância genética entre si foram MSRVGO1 e EMACGO1 (12,5%) e a maior distância EMACGO2 e CASOMT5 (95,6%).

Palavras-chave: *Glycine max*, antracnose, diversidade genética, Random Amplified Polymorphic DNA.

## ABSTRACT

Barros, Geovana Eliza Goncalves, M.S., FESURV – Rio Verde University, June of 2008. **Study of the genetic diversity of isolates of *Colletotrichum truncatum* through molecular technique RAPD.** Adviser: teacher Dr. Hercules Diniz Campos. Co-adviser: Dr. Aloísio Sartorato and teacher. Dr. Takeshi Kamada.

Few studies have been carried out to confirm the genetic diversity of anthracnose in soybean, caused by *C. truncatum*, considered as one of the main soybean disease in the Brazilian Cerrado Region, although this pathogen is able to cause total loss of the crop. The present work had the objective to evaluate the genetic diversity of isolates of *C. truncatum* proceeding from farms located in the Central Region of Brazil, using the RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA). It was evaluated 34 isolates deriving of farms at Goiás, Mato Grosso, Tocantins and Paraná states of Brazil. 18 *primers* was used and got 106 polymorphic markers. The index of dissimilarity used was the arithmetical complement of the coefficient of Jaccard and the isolates were grouped by UPGMA method. The isolates showed great genetic variability, taking into consideration that none of them was identical. The genetic distance among isolates allowed classifies them into three possible groups. The grouping for similarity was established based on occurrence place of the fungus. The isolates that presented the lower genetic distance between them were MSRVG01 and EMACGO1 (12.5%) and the lager genetic distance was EMACGO2 and CASOMT5 (95.6%).

Key words: *Glycine max*, anthracnose, genetic diversity, Random Amplified Polymorphic DNA.



## 1 INTRODUÇÃO

Embora a antracnose da soja, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, seja considerada como uma das principais doenças da Região do Cerrado brasileiro, podendo causar perda total da lavoura (Embrapa, 2003), poucos estudos têm sido realizados para estudar a diversidade genética deste fungo.

A técnica do DNA recombinante tem sido uma ferramenta para as investigações do estudo de diversidade genética de fungos fitopatogênicos de forma mais completa e segura.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a rápida amplificação de DNA, revolucionou as técnicas moleculares. A busca de um método que não requer nenhuma informação prévia sobre a seqüência alvo, resultou na técnica de RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (Williams et al., 1990). Esta técnica tem a vantagem de fornecer importantes informações sobre o polimorfismo genético entre populações e espécies afins, mesmo quando nada se conhece sobre seus genomas (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

O RAPD utiliza como iniciadores, oligonucleotídeos curtos, de seqüência nucleotídica arbitrária. A reação de amplificação procede em condições de baixa estringência, permitindo que ocorra o pareamento entre iniciadores e o DNA-alvo mesmo que não haja complementariedade total entre as duas seqüências. Como resultado, obtém-se um conjunto de fragmentos amplificados, os quais, separados por eletroforese em gel de agarose, produzem um padrão de bandas específico conhecido como impressão digital genômica ou DNA *fingerprint* (Welsh; McClelland, 1990).

O estudo da diversidade genética do *C. truncatum* se faz necessário e importante em decorrência da rápida evolução do fungo nas regiões produtoras de soja. Essa evolução está relacionada à distribuição do patógeno e ao aumento da agressividade do mesmo. As sementes são o principal veículo pelo qual o patógeno é disseminado a grandes distâncias e, portanto, são as principais responsáveis pela distribuição do fungo para locais antes isentos. Além da ocorrência da doença ter aumentado, observa-se também uma maior agressividade do patógeno, que pode ser justificada pela tentativa do fungo em se desenvolver em locais de climas diferentes, isto é, a maior distribuição geográfica aumentou diversidade genética do *C. truncatum* em função das mutações que ocorreram para adaptação, o que elevou a agressividade do mesmo.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética entre isolados provenientes de lavouras infectadas das regiões produtoras do Brasil através da técnica molecular RAPD.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da FESURV - Universidade de Rio Verde, localizada no município de Rio Verde, GO e nos Laboratórios de Fitopatologia e Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás, GO.

### **2.1 Obtenção dos isolados**

Os isolados de *Colletotrichum truncatum* foram obtidos a partir de hastes, folhas ou pecíolos de plantas de soja que apresentavam sintomas da doença, oriundas de lavouras de diferentes regiões dos Estados Goiás, Mato Grosso, Tocantins e Paraná (Tabela 4).

Pedaços das hastes, folhas e pecíolos foram imersos em solução de álcool 70% durante 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio 1,0% por mais 60 segundos e então lavados em água destilada por três vezes consecutivas. Após a desinfestação, os tecidos lesionados foram mantidos em câmara úmida a  $26 \pm 2$  °C com 12 horas luz e 12 escuro por 5 dias. Após este período, esporos (conídios) de acérvulos que se desenvolveram sobre os tecidos foram transferidos com auxílio de microscópio estereoscópio para meio BDA (batata – dextrose - ágar). Após o crescimento micelial de cada isolado, estes foram repicados para obtenção de culturas puras e manutenção dos mesmos. As culturas puras foram confirmadas através da morfologia das colônias e conídios conforme Bailey; Jeger, 1992.

Todo o processo de isolamento foi realizado no laboratório de Fitopatologia da FESURV - Universidade de Rio Verde. Para os procedimentos seguintes, os isolados foram levados para os laboratórios de Fitopatologia e Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

TABELA 4 Identificação dos isolados de *Colletotrichum truncatum* obtidos de lavouras de soja infestadas de diferentes regiões.

Número do Isolado	Isolado	Origem	
		Município-Estado	Cultivar
1	NIRVGO3	Rio Verde-GO	Não Identificado
2	NIRVGO4	Rio Verde-GO	Não Identificado
3	MSRVGO1	Rio Verde-GO	Monsoy 6101
4	LURVGO1	Rio Verde-GO	Luziânia
5	LURVGO2	Rio Verde-GO	Luziânia
6	NIRVGO6	Rio Verde-GO	Não Identificado
7	MSRVGO3	Rio Verde-GO	Monsoy 6101
8	MSRVGO5	Rio Verde-GO	Monsoy 6101
9	NIRVGO2	Rio Verde-GO	Não Identificado
10	MSRVGO2	Rio Verde-GO	Monsoy 6101
11	CDMOGO2	Montividiu-GO	Coodetec 219
12	CDMOGO1	Montividiu-GO	Coodetec 219
13	A7MOGO3	Montividiu-GO	A-7002
14	CDMOGO3	Montividiu-GO	Coodetec 219
15	A7MOGO1	Montividiu-GO	A-7002
16	A7MOGO6	Montividiu-GO	A-7002
17	EMACGO3	Acreúna-GO	Emgopa 315
18	EMACGO6	Acreúna-GO	Emgopa 315
19	EMACGO2	Acreúna-GO	Emgopa 315
20	EMACGO1	Acreúna-GO	Emgopa 315
21	COACGO4	Acreúna-GO	Conquista
22	COACGO3	Acreúna-GO	Conquista
23	COACGO2	Acreúna-GO	Conquista
24	COACGO1	Acreúna-GO	Conquista
25	EMACGO5	Acreúna-GO	Emgopa 315
26	CASOMT1	Sorriso-MT	Carreira
27	CASOMT5	Sorriso-MT	Carreira
28	CASOMT4	Sorriso-MT	Carreira
29	CASOMT3	Sorriso-MT	Carreira
30	NICAPR4	Cascavel-PR	Não Identificado
31	NICAPR1	Cascavel-PR	Não Identificado
32	P9PNT01	Porto Nacional-TO	P98C81
33	P9PNT02	Porto Nacional-TO	P98C81

## 2.2 Caracterização molecular dos isolados de *Colletotrichum truncatum*

### 2.2.1 Obtenção da cultura monospórica

Para obtenção da cultura monospórica, discos retirados das placas contendo culturas puras do isolado foram depositados sobre vagens de feijão esterilizadas contidas em tubo de ensaio e incubadas a 21<sup>±</sup> 2°C por sete dias, para a esporulação do fungo. Após a confirmação

da esporulação, foram obtidas suspensões diluídas de esporos de cada isolado. Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, a suspensão foi distribuída na forma de estrias em placas de petri contendo meio BDA da mesma forma que feito para isolamento de bactérias. Após quatro dias de crescimento, o micélio proveniente de 1 colônia individual foi repicado para tuos de ensaio obtendo-se, desse modo, as culturas monospóricas de cada isolado de *C. truncatum*.

### **2.2.2 Produção e preparo do micélio**

Para produção de micélio, empregou-se o meio de cultura composto por batata – dextrose (Carvalho; Sartorato, 2002). Após o seu preparo, 50ml do meio foi distribuído em Erlenmeyers de 125ml de capacidade e autoclavados a 120°C por 20min.

Em seguida, cada Erlenmeyer recebeu 4 discos de, aproximadamente, 0,7 cm de diâmetro provenientes das placas de cultura monospórica e, então, incubados à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 10 dias sob agitação constante a 120rpm.

Passados os 10 dias, coletou-se o micélio. Para isso, o meio líquido contendo o micélio do fungo foi vertido em um funil contendo uma folha de papel filtro. O funil foi inserido em um Kitasato ligado a uma bomba de vácuo. Após a separação, o micélio de cada isolado foi acondicionado em envelope de papel de seda, previamente identificados e mantidos em caixa de isopor com gelo até serem levados ao liofilizador. Os micélios liofilizados foram mantidos em freezer a -80°C.

### **2.2.3 Extração do DNA**

O DNA genômico foi extraído pelo método do CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Para isso, aproximadamente 40 mg do micélio liofilizado foi macerados por 10 segundos utilizando o macerador Fast Prep modelo FP120 com velocidade 4, com auxílio de bids de porcelana, em tubos Eppendorf de 1,5 mL. Após a maceração, adicionou-se 1000 µL de tampão de extração (5,0% CTAB; 5,0 M de NaCl; 0,5 M de EDTA; 1,0 M de Tris-HCl (pH 8,0); 10% de PVP; 0,1% de β - mercaptoetanol), previamente aquecido a 65° C. O material foi homogeneizado com auxílio do vórtex e mantido por 40 minutos, em banho-maria, a 65°C com agitações periódicas. Após a retirada dos tubos do banho-maria, foi adicionado 700 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), homogeneizando a solução por inversões sucessivas. Em seguida as

amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm e foram transferidos 450 µL do sobrenadante (fase aquosa), para novos tubos, adicionando-se, novamente, 450 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), e repetindo-se os processos de homogeneização e centrifugação.

Para a precipitação do DNA, foram adicionados 650 µL de isopropanol gelado isopropanol:sobrenadantes (1:1), vertendo os tubos lentamente, sendo estes mantidos a -80° C por uma hora, para favorecer a precipitação do DNA. As amostras foram então, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm para a precipitação do DNA (*pellet*). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, o sedimento foi lavado adicionando 200 µL de etanol 70%. Novamente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao sedimento 250 µL de etanol absoluto. Finalmente, retirou-se o álcool e o sedimento foi seco à vácuo.

Para ressuspender o DNA, foram adicionados 300 µL de TE (10mM Tris – HCl (pH 8,0); 1,0 mM de EDTA), contendo 40µg/mL de RNase, incubando as amostras a 65°C por 30 minutos. Para precipitar e ressuspender o DNA, novamente, foi acrescentado 30 µL de NaCl [5,0 M] e 200 µL de isopropanol gelado. Para favorecer a precipitação do DNA, os tubos foram novamente mantidos por uma hora a -80°C. Repetiu-se o processo de centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm, seguida de nova lavagem, sendo duas vezes com etanol 70% e uma última com etanol absoluto, secando-se o sedimento a vácuo. Após, o sedimento foi ressuscitado com 50 µL de TE.

A quantificação do DNA foi realizada após a eletroforese (3 V/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas do DNA (25, 100 e 200 ng) do fago lambda. A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das bandas, reveladas pela coloração com brometo de étideo (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta. A quantificação foi confirmada através do fluorímetro e todas as amostras foram diluídas a fim de se obter uma concentração padrão de 10 ng/µL.

#### **2.2.4 Reação de amplificação e visualização dos fragmentos de DNA**

A técnica utilizada para a caracterização molecular dos isolados foi a Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers*: OPP6, OPD8, OPAB4, OPB10, OPAX14, OPAX18, OPK4, OPK7, OPK9, OPAX2, OPAB8, OPB7, OPB4, OPF11, OPG11, OPG15, OPG17, OPAX1, (Operon Technologies, Alameda, CA, USA).

As reações de amplificações apresentaram volume final de 25µl, contendo 2,5ng de

DNA 10mMTris-hl, pH8.3+50mM KCl, 2,5 µL Tampão 10X, 01 mM de dNTP, 20mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,3 µL de DMSO, 0,4 de *primer*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Taq Gen) e 14,35 µL de H<sub>2</sub>O q.s.p. para cada isolado; cada reação foi coberta com óleo mineral para evitar a evaporação da reação. A amplificação das reações foi feita em um termociclador (M.J. Research, Inc., Waltham, MA, USA) programado para 40 ciclos. O processo de desnaturação constitui uma etapa de 15 segundos a 94° C, seguido de uma etapa de anelamento de 30 segundos a 35° C e uma etapa de extensão de 1 minuto a 72° C. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final por 7 min a 72° C. À reação amplificada foi adicionado 2,0 µL de solução de carregamento (Blue Juice) por reação.

Os fragmentos do produto da amplificação foram separados por eletroforese, em géis de agarose (1,2%) contendo de brometo de etídeo na concentração de 10 mg/mL de gel. O gel foi imerso em solução tampão Tris – borato e EDTA 90 mM tri-borato e 2mM EDTA, pH8.0 e submetido à corrente elétrica de 110 V por quatro horas. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultra-violeta (UV), utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA).

### 2.2.5 Análise dos dados

Os fragmentos polimórficos de bandas mais consistente foram quantificados visualmente para obter os dados binários sendo atribuído valor 0 e 1 para ausência e presença de banda respectivamente. A partir dos dados, obteve-se a matriz de dissimilaridade utilizando o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (Cruz e Carneiro, 2003) através da expressão:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

a: número de coincidência do tipo 1 – 1, para cada par de genótipos;

b: número de coincidência do tipo 1 – 0, para cada par de genótipos;

c: número de coincidência do tipo 0 – 1, para cada par de genótipos.

A partir desta matriz foi realizado o agrupamento dos isolados, pelo método UPGMA, que foi expresso na forma de um dendograma e de um plano cartesiano. Para estas análises, foi utilizado o software Genes, versão For Windows 2007.0.0 (Cruz, 2001; Cruz, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de amplificação geraram 106 (cento e seis) bandas polimórficas, que foram analisadas a fim de se calcular os valores de dissimilaridade genética. Os valores obtidos mostraram similaridade mínima de 12,5% e máxima de 95,6%. A partir desses valores, elaborou-se o dendograma. Os isolados analisados neste estudo foram separados em 3 (três) grupos, considerando dissimilaridade relativa de 60% para delimitação dos grupos. O grupo I foi formado por 17 isolados MSRVG01, EMACG01, COACG04, LURVG01, COACG02, P9PNT02, EMACG06, P9PNT01, MSRVG03, MSRVG05, MSRVG02, COACG01, COACG03, EMACG03, LURVG02, EMACG02 e EMACG05, provenientes de lavouras de soja dos municípios de Acreúna – GO e Porto Nacional – TO, caracterizados por altitudes (inferior a 800m) e temperaturas elevada, além de Rio Verde – GO, em que os isolados foram obtidos de microrregiões de altitude e temperatura semelhantes àquelas de Acreúna e de Porto Nacional; O grupo II foi formado pelos isolados de número NIRVG03, NIRVG04, A7MOG01, A7MOG06, A7MOG03, NICAPR4, CDMOG01, NICAPR1, NIRVG02, CDMOG03, NIRVG06 e CDMOG02, provenientes de microrregiões de Rio Verde – GO e de Montividiu – GO que se destacam por altitudes superiores a 900m e temperaturas noturnas amenas, além de isolados provenientes de Cascavel - PR; e o grupo III formado pelos isolados CASOMT5, CASOMT3, CASOMT1 e CASOMT4, provenientes de Sorriso – MT, caracterizado por altitude baixa e temperatura constantemente elevados (Figura 3).

O menor valor de assimilaridade (12,5%) foi encontrado entre os isolados MSRVG01 e EMACG01, coletados na microrregião de Rio Verde – GO e de Acreúna – GO, respectivamente, com altitude inferior a 800m, embora provenientes de cultivares diferentes (tabela 5). Entretanto, o maior valor de dissimilaridade (95,6%) foi encontrado entre os isolados EMACG02 e CASOMT5, coletados em Acreúna – GO e Sorriso – MT, respectivamente (tabela 5). Neste caso, as condições ambientais entre as duas regiões são distintas quanto à temperatura. A região de Sorriso – MT apresenta constância de temperaturas elevadas, o que não ocorre na região de Acreúna – GO.

Os isolados coletados em Sorriso - MT mostraram-se bastante similares sendo todos incluídos no grupo III, indicando a possível ocorrência de isolados com características e comportamento diferenciados e específicos para essa região, que, provavelmente, está relacionado ao fator de temperatura.

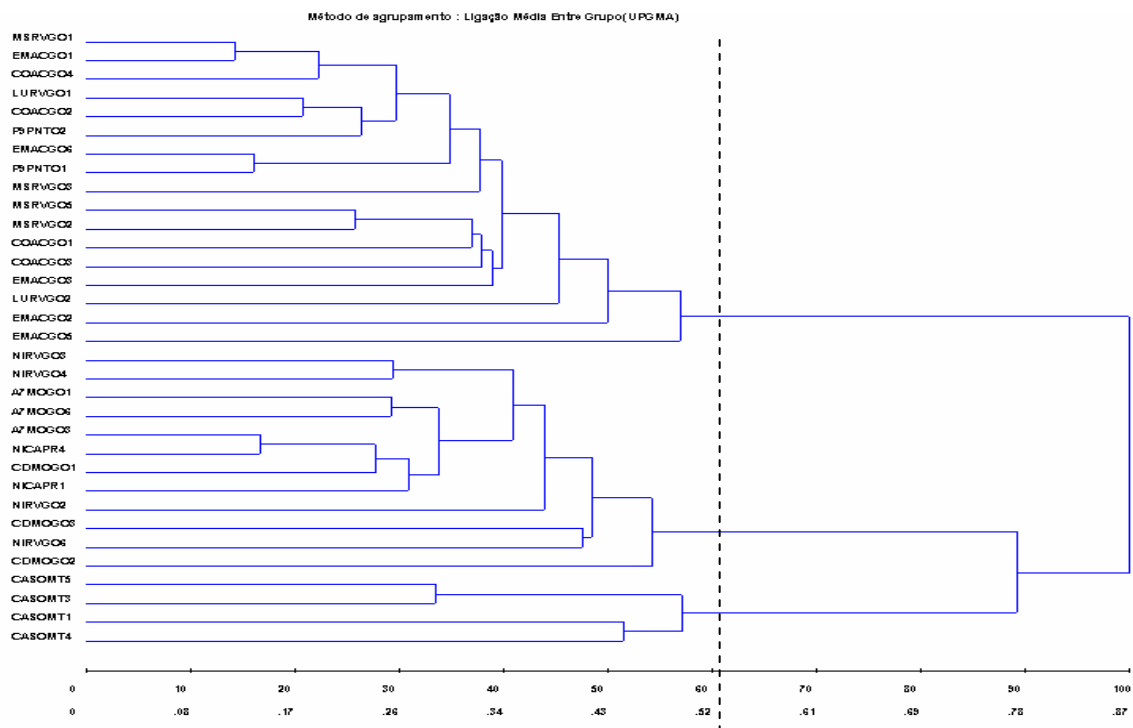


Figura 3 Dedograma de dissimilaridade genética de 33 isoladas oriundos dos estados de GO, MT, TO, PR, agrupados pelo método UPGMA com base no coeficiente de Jaccard.

Os dois isolados coletados em Cascavel-PR e todos os isolados coletados em Montividiu – GO, além desses, isolados coletados em Rio Verde-GO, cuja variedade é desconhecida, encontram-se no grupo II, entre eles, a distância genética variou de 14,6% a 53,8% (tabela 5).

Os isolados coletados em Porto Nacional- TO e em Acreúna- GO, foram todos reunidos no grupo I, mostrando similaridade entre os isolados dessa região; além de alguns isolados de Rio Verde – GO (região que se assemelha a Acreúna quanto ao aspecto climático) coletados das variedades MonSoy 6101 e Luziânia. Nesse grupo, a distância genética variou de 12,5% a 90% (tabela 5).

Dessa forma, pôde-se observar que apesar de haver variabilidade genética entre os isolados, já que nenhum demonstrou dissimilaridade nula, o agrupamento ocorreu, basicamente, em função do local de ocorrência do fungo.

Em trabalho realizado por Câmara (1994), isolados de *C. truncatum* obtidos no Brasil apresentaram variabilidade em termos de morfologia de colônia, além disso, os mesmos mostraram grande variabilidade no que se refere à patogenicidade. No mesmo trabalho, Câmara (1994) mostra a existência de nove níveis de virulência entre 26 isolados de *C.*



*truncatum* quando inoculados em soja da cultivar FT-Cristalina. Esses dados estão de acordo com os reportados por Lin & Wu (1966) e Rodriguez – Marcano & Sinclair (1980).

Apesar da variabilidade apresentada, observamos a ocorrência de isolados semelhantes em locais com grande distância geográfica, ou seja, isolados de Montividiu- GO e de Cascavel- PR estão no mesmo grupo de similaridade (figura 4); assim como os isolados de Acreúna – GO e de Porto Nacional- TO que também estão no mesmo grupo de similaridade. Esse fato pode estar relacionado às condições climáticas das regiões, ou seja, as regiões de Cascavel- PR e Montividiu- GO são de temperaturas mais amenas, enquanto que Acreúna- GO e Porto Nacional- TO são de temperatura mais elevadas. Segundo Kelly et AL. (1994), o fator temperatura pode ser responsável pela maior diversidade genética entre algumas espécies de *C. lindemuthianum*.

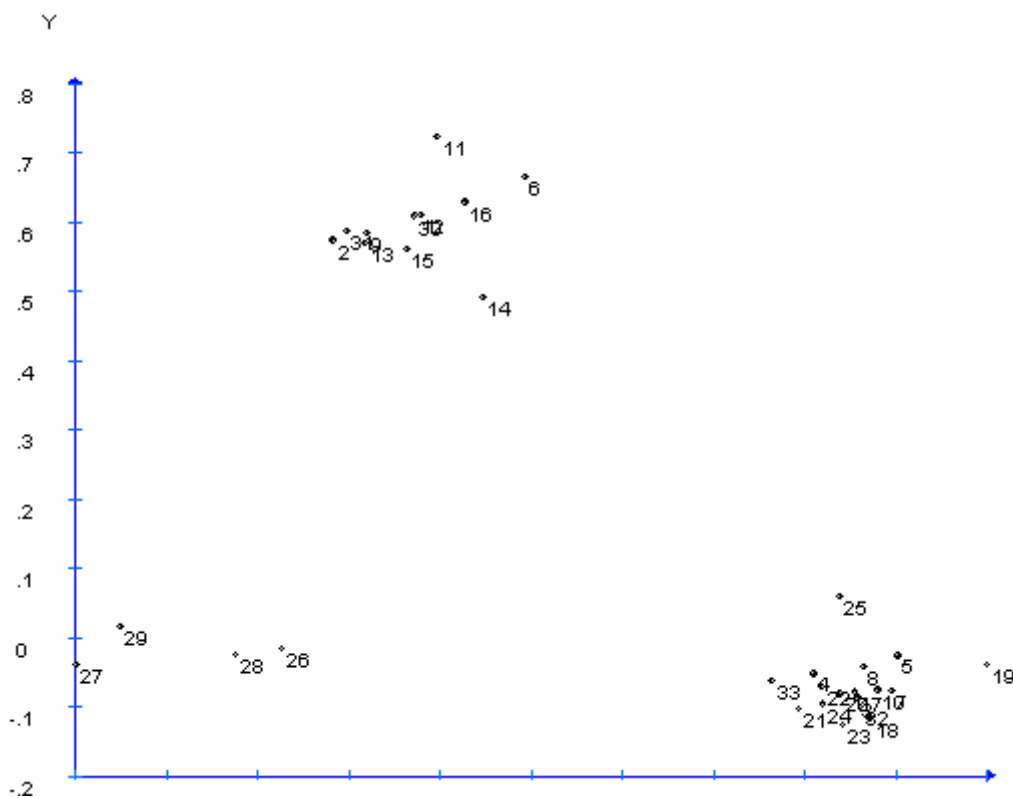


Figura 4 Projeção gráfica das distâncias genéticas de 33 isoladas de *C. T.* coletados com lavouras de soja dos estados, com base no coeficiente de Jaccard.



Os isolados obtidos em Rio Verde- GO foram os que apresentaram maior diversidade genética, uma vez que podemos encontrá-los em dois dos três grupos formados, diferenciados pelas cultivares, embora a representatividade para Rio Verde – GO tenha sido maior em função dos números de amostras, essas se diferiram pelas microrregiões distintas.

Talamini (2006), ao estudar a divergência entre e dentro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando RAPD, observou que os maiores valores de similaridade estavam correlacionados com a região de origem dos isolados, o que também foi observado neste experimento.

Vasconcelos (1994) realizou um trabalho com o objetivo de estabelecer a variabilidade genética entre cinco isolados de *C. truncatum* e observou que a técnica RAPD foi bastante eficiente para estudar essa variabilidade entre os isolados, pois, através dessa técnica, conseguiu agrupar, de forma clara, os cinco isolados estudados em três grupos diferentes, assim como no presente trabalho.

Silva-Mann (2002) utilizou RAPD para estudar a variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro. Com a técnica, a autora conseguiu diferenciar, separando em dois grupos os isolados *C. gossypii* e *C. gossypii* var *cephalosporioides*. Também ressalta a importância e a eficiência do uso do RAPD na identificação e diferenciação de importantes fungos fitopatogênicos, Correl et al (1993), Crous et al (1993), Sherriff et al (1994), Vasconcelos et al (1994), Sherriff et al (1995), Vilarinhos (1995) e Vieira (1996).

#### 4 CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados de *Colletotrichum truncatum* foram separados em três grupos distintos. Predominando uma distribuição conforme a localidade.
- ✓ A distância genética entre os isolados variou de 12,5% (entre os isolados MSRVGO1 de Rio Verde-GO e EMACGO1 de Acreúna-GO) a 95,6% (entre os isolados EMACGO2 de Acreúna-GO e CASOMT5 de Sorriso-MT).
- ✓ As condições de ambiente, provavelmente temperatura similares entre regiões, pode ter contribuído para o agrupamento dos isolados.
- ✓ O método RAPD foi eficiente no estudo da variabilidade genética dos isolados.

## REFERENCIAS

- CARVALHO, F. A.; SARTORATO, A. **Meio líquido para a produção de micélio de *Phaesariopsis griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum***. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. Anais. Viçosa. 2002. p. 130-132
- CORREL, J.C.; RHOADS, D. D.; GUEBER, J. C. **Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism, DNA fingerprints and Randomly Amplified Polimorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare***. Phitopathology 83: 1199-1204. 1993.
- CROUS, P. W.; ALFENAS, A. C. ;WINGFIELD, M. J. ***Calonectria scoparia* and *Calonectria morginii* sp. Nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium* anamorphs**. Micology Research 6: 701-708. 1993.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: Versão for windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 648p. 2001
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: análise multivariada e simulação. Editora UFV. Viçosa/ MG. 175p. 2006
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. C. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Editora UFV. Viçosa – MG. 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12:13-15. 1990.
- EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região central do Brasil**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2003. 32p. (Sistema de Produção n.1).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA – CENARGEN. Documentos, 20)
- SHERIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; LAFAY, J. F.; BRYGOO, Y. & BAILEY, J. A. **Ribossomal DNA sequence analysis reveals new species of groupings in the genus *Colletotrichum***. Experimental mycology 18: 121-138. 1994.

SHERIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAILEY, J. A. **rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*.** Mycology Research 99: 475-478. 1995.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M.; G. G. C.; MACHADO, J. C. **Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares de inoculação em plantas.** Fitopatologia Brasileira, 27: 27-32. 2002.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; EDSON, A. P.; SILVA, G.; ISHIKAWA, F. H.; JÚNIOR, O. A. C. **Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD.** Fitopatologia Brasileira, 31:545-550. 2006.

VASCONCELOS, M. J. V.; MACHADO, M. A.; ALMEIDA, A. M. R.; HENNING, A. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. **Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA.** Fitopatologia Brasileira, 19:520-523. 1994.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro.** (Tese-Doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 1996.

VILARINHOS, A. D.; PAULA JR, J. T.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. **Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique.** Fitopatologia Brasileira 20: 194-198. 1995.

WELSH, J.; MACCLELLAND, M. **Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic Acids Research, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. C. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as generic markers.** Nucleic Acids Research, v. 18, n.22, p.6531-6335, 1990.