



MANOEL BATISTA DA SILVA JÚNIOR

FOSFITOS NO MANEJO DA ANTRACNOSE DA SOJA

**LAVRAS - MG
2017**

MANOEL BATISTA DA SILVA JÚNIOR

FOSFITOS NO MANEJO DA ANTRACNOSE DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende

Coorientador
Dr. Edson Ampélio Pozza

**LAVRAS - MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva Júnior, Manoel Batista da.

Fosfitos no manejo da antracnose da soja / Manoel Batista da
Silva Júnior. - 2017.

89 p.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Antracnose. 2. Indução de resistência. 3. Atividade
enzimática. I. Resende, Mário Lúcio Vilela de. . II. Título.

MANOEL BATISTA DA SILVA JÚNIOR

FOSFITOS NO MANEJO DA ANTRACNOSE DA SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de outubro de 2017.

Dr. Hudson Teixeira	EPAMIG
Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães	UFLA
Dr. Élberis Pereira Botrel	UFLA

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

Dr. Edson Ampélio Pozza
Coorientador

LAVRAS - MG
2017

*A Manoel Batista da Silva, Aparecida de Fátima Batista da Silva, Guilherme Batista da Silva,
Juventina Cândida de Jesus (in memoriam) e Antônio Batista da Silva Filho (in memoriam),
por todo o incentivo dado sempre na busca pelo conhecimento e aprimoramento da
qualificação profissional.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e paz em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura e os conhecimentos obtidos nos quatro anos e meio de graduação e cinco anos e meio de mestrado e doutorado.

Aos professores do DFP, em especial ao professor José da Cruz Machado, pelo auxílio nos experimentos. Aos técnicos e demais funcionários do DFP, Ana Maria, Carzinho, Silvio, Tarlei, Ângela, Elenice, Adriana, Angélica, Luana, Ralf, Rogério e Talita.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Moisés, Alexandre, Dario, Joyce, José Diogo, Tharyn, Ariana, Eliane, Pedro, André, Marcinho, Deila, Tulio, Lucas, Roberto, Alexandre Vidal, Pedro Felipe, Camila Carvalho, Camila Lage, João Paulo, Ana Cristina e Gustavo, pela contribuição nos experimentos.

Aos professores e orientadores Mário Lúcio e Edson, pelos ensinamentos e confiança.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Aos membros das gestões 2014, 2015 e 2016 do Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT), em especial ao amigo Stélio Gadaga (*in memoriam*).

A minha mãe, Aparecida de Fátima; meu irmão, Guilherme; meu pai, Manoel; minha avó, Juventina (*in memoriam*); meu tio, Antônio (*in memoriam*) e demais familiares, pela confiança e carinho. À minha namorada, Acleide, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos amigos das repúblicas Viracopos e Destelados Anônimos, pelos bons momentos compartilhados.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que mais esta etapa fosse cumprida, obrigado!

RESUMO

A temperatura e a densidade de inóculo podem afetar diretamente a manifestação da antracnose em soja. A detecção do patógeno em sementes é primordial para se obter lavouras saudáveis e a técnica de qPCR apresenta precisão para este fim. O manejo com químicos, tanto por tratamento de sementes quanto por pulverização, oferece riscos. Sendo assim, os fosfitos são uma alternativa promissora, viável e sustentável. Os mesmos podem atuar por nutrição e indução de resistência no hospedeiro e toxidez direta ao patógeno. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da temperatura e da densidade de inóculo na severidade da antracnose, detectar o patógeno por qPCR em sementes e avaliar fosfitos no manejo da doença em sementes e vagens. No primeiro estudo avaliaram-se o efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *C. truncatum* e o efeito da densidade de inóculo na severidade da antracnose em sementes, e desenharam-se *primers* específicos para a detecção do patógeno por qPCR. Houve diferença significativa no crescimento dos isolados em função da temperatura. Houve efeito significativo da densidade de inóculo na germinação e sanidade das sementes de soja. O isolado LAPS473 foi o mais severo para as sementes. Os *primers* desenhados foram específicos na detecção de *C. truncatum* e houve amplificação até a diluição de 20 fg. No segundo ensaio, as sementes foram inoculadas com o isolado mais severo e tratadas com fosfitos de Cu, K, Mn e Zn. Foram montados testes de vigor, germinação e sanidade, e avaliado o modo de ação dos fosfitos por indução de resistência e toxidez direta. Os fosfitos de Mn e Zn foram eficazes no manejo da doença, incrementando a germinação e o vigor, e reduzindo a incidência do patógeno. O fosfito de Mn promoveu aumentos na atividade da CAT e da POX e incremento no teor de lignina. O fosfito de zinco aumentou a atividade da POX. Ambos os produtos foram tóxicos a *C. truncatum*. No terceiro ensaio, os mesmos fosfitos foram avaliados no manejo da antracnose em vagens de soja, no controle da transmissão do patógeno de vagens a sementes e na ativação dos mecanismos de defesa. A inoculação foi realizada mediante pulverização de suspensão de inóculo em R₄. A aplicação dos produtos foi realizada em V₄, R₁ e R₃, com volume de calda de 200 L.ha⁻¹ e pressão de 40 psi. Foram realizadas cinco avaliações da doença e calculados a AACPS e o controle de cada tratamento. Todos os produtos reduziram a severidade da antracnose nas vagens e na transmissão do patógeno de vagens a sementes, porém, os fosfitos de Cu, Mn e K promoveram maior controle. O fosfito de potássio aumentou o teor de lignina. O fosfito de Mn incrementou a atividade da CAT e o teor de lignina. Já o fosfito de cobre aumentou a atividade da CAT e da POX.

Palavras-chave: Antracnose. Indução de resistência. Atividade enzimática. Tratamento de sementes.

ABSTRACT

Temperature and inoculum density may directly affect the manifestation of anthracnose in soybean. Detection of the pathogen in seeds is paramount for healthy crops. The qPCR technique presents precision for this purpose. Chemical control by both seed treatment and spray treatment offers risks. Thus phosphites are a promising, viable and sustainable alternative for this purpose. These products can act by nutrition and induction of resistance in the host and direct toxicity to the pathogen. The objective of this study was to evaluate the effect of temperature and inoculum density on anthracnose severity, to detect the pathogen by qPCR in seeds and to evaluate phosphites in the management of the disease in seeds and pods. In the first study the effect of temperature on the mycelial growth of *C. truncatum* isolates, effect of inoculum density on the severity of the anthracnose in seeds and specific primers for the detection of the pathogen by PCR was evaluated. There was a significant difference in the growth of the isolates as a function of temperature. There was significant effect of the inoculum density on the germination and sanity of the soybean meal. The LAPS473 isolate was the most severe to the seeds. The primers designed were specific in the detection of *C. truncatum* and there was amplification until the dilution of 20 fg. In the second test the seeds were inoculated with the most severe isolate and treated with Cu, K, Mn and Zn phosphites. Vigor, germination and sanity tests were performed and the mode of action of the phosphites was evaluated by induction of resistance and direct toxicity. Mn and Zn phosphites were effective in the management of the disease, increasing germination and vigor and reducing the incidence of the pathogen. Mn phosphite promoted increases in CAT and POX activity and increase in lignin content. Zinc phosphite increased POX activity. Both products were toxic to *C. truncatum*. In the third trial the same phosphites were evaluated in the management of anthracnose in soybean pods, in the control of the transmission of the pathogen from pods to the seeds and in the activation of the defense mechanisms. The inoculation was performed by spraying the inoculum suspension in R₄. The application of the products was carried out in V₄, R₁ and R₃ with volume of application of 200 L.ha⁻¹ and pressure of 40 psi. Five evaluations of the disease were performed and the AACPS and control of each treatment were calculated. All the products reduced the severity of the anthracnose in the pods and the transmission of the pathogen from the pods to the seeds, but the phosphites of Cu, Mn and K promoted greater control. Potassium phosphite increased the lignin content. Mn phosphite increased CAT activity and lignin content. Copper phosphite increased CAT and POX activity.

Keywords: Environment. Soybean Anthracnose. Molecular Detection. Alternative Control. Induction of Resistance.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A cultura da soja no Brasil.....	12
2.2	Antracnose da soja	12
2.3	Inoculação artificial e qPCR na detecção de fungos em sementes.....	13
2.4	Efeito da temperatura na intensidade das doenças de plantas	14
2.5	Indução de resistência e explosão oxidativa no manejo de doenças de plantas....	16
2.6	Fosfitos no manejo de doenças de plantas.....	17
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE.....	26
	ARTIGO 1 <i>Colletotrichum truncatum</i> em sementes de soja: inoculação por restrição hídrica e detecção por qPCR.....	26
	ARTIGO 2 Fosfitos no manejo da antracnose em sementes de soja e caracterização dos mecanismos de ação por indução de resistência e toxidez direta.....	50
	ARTIGO 3 Fosfitos no manejo da antracnose em vagens de soja, no controle da transmissão do patógeno de vagens a sementes e caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa	71
	ANEXO I.....	88

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal cultura de grãos produzida no Brasil e apresenta constantes aumentos de produção e comercialização a cada safra. No último ano agrícola foi obtida uma produção de 114 milhões de toneladas em uma área plantada de 34 milhões de hectares. Nas últimas três décadas, a soja foi a cultura que apresentou maior crescimento e ocupa, atualmente, 49% da área plantada com grãos no Brasil. Dentre os fatores que causam reduções no rendimento da soja nas diversas regiões de cultivo no país destacam-se as doenças (ALMEIDA et al., 2012; ARRUDA et al., 2012; CONAB, 2017).

Esta cultura é atacada por um grande número de doenças fúngicas (BARROS et al., 2005) e entre elas destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, considerada uma das mais frequentes e prejudiciais à soja por afetar todo o seu ciclo, desde sementes até plantas adultas. O patógeno pode causar morte de plântulas, necrose nos pecíolos e nervuras, manchas nas folhas, hastes e vagens, e as perdas podem chegar a até 100%, sob condições de temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento do fungo (GALLI et al., 2007; SILVA et al., 2012). A disseminação do patógeno ocorre por sementes, portadoras do inóculo inicial que causa focos primários da doença (MACHADO, 2000). Sendo assim, a detecção do patógeno antes do plantio é imprescindível.

A temperatura e a densidade de inóculo podem influenciar o desenvolvimento de *C. truncatum* e, com isso, afetar a severidade da antracnose em sementes e vagens, com a consequente redução na produtividade da soja (DIAS et al., 2005; LUCK et al., 2011; SILVA et al., 2012). Estudos sobre o crescimento micelial do fungo podem determinar a temperatura ideal de crescimento de um determinado isolado e, assim, estipular a condição na qual o patógeno terá seu micélio e seus esporos mais viáveis para inoculações. A técnica da restrição hídrica (MACHADO et al., 2001) permite simular diferentes densidades de inóculo e a técnica de qPCR pode quantificar a concentração de inóculo nas sementes (MUNKVOLD, 2009). Para tanto, é necessário desenhar *primers* específicos e desenvolver um protocolo de qPCR para detectar o patógeno nas sementes.

O tratamento de sementes (MACHADO, 2000; PEREIRA et al., 2009) e a pulverização da parte aérea com fungicidas (PESQUEIRA et al., 2016) são as principais medidas de controle da antracnose da soja. De acordo com Pereira et al. (2009), o tratamento de sementes de soja com fludioxonil + mefenoxan e thiabendazole + thiram é eficiente no

controle de *C. truncatum* e melhora o desempenho fisiológico das sementes. Segundo Pesqueira et al. (2016), a aplicação foliar de carbendazim, associado ou não a ciproconazol + picoxistronin e ciproconazol + piraclostrobin, promove controle da antracnose na parte aérea e aumento na produtividade da soja. Porém, o uso de fungicidas químicos em tratamento de sementes ou aplicação foliar oferece riscos ao aplicador e ao ambiente. Além disso, também pode limitar a inoculação das sementes com *Bradyrhizobium* e prejudicar a nodulação (PEREIRA et al., 2009). Assim, é importante buscar por soluções alternativas no manejo dessa doença.

Os fosfitos são sais inorgânicos derivados da reação do ácido fosforoso com uma base forte (hidróxido de K, Cu, Mn, Zn, etc.) e podem atuar na nutrição e na ativação dos mecanismos de resistência do hospedeiro ou por toxidez direta ao patógeno (Dalio et al., 2012). A aplicação de fosfitos na parte aérea de soja foi estudada por Silva et al. (2011). Estes autores observaram que o aumento da dose de fosfito de potássio gera redução linear do míldio da soja (*Peronospora manshurica*), além de incrementos no índice de área foliar de plantas em condições de campo. Neves & Blum (2014) observaram que a aplicação de fosfito de potássio após a aplicação de pyraclostrobin + epoxiconazol, tiofanato metílico + flutriafol e tebuconazol promoveu controle da ferrugem asiática da soja. Em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), Gadaga et al. (2017) verificaram a eficiência de formulações comerciais de fosfitos de K e Mn no controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em campo.

Em alguns trabalhos é citada a eficácia de fosfitos aplicados via tratamentos de sementes no manejo de doenças em soja e em outras culturas. Segundo Simonetti et al. (2015), a aplicação de fosfito de manganês, associado à bactéria *Pseudomonas fluorescens*, reduziu a severidade da podridão carvão (*Macrophomina phaseolina*) em soja. Segundo Lobato et al. (2008), sementes de batata das cultivares Shepody e Kennebec, inoculadas com *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*, tratadas com fosfitos de cálcio e de potássio, têm maior emergência, quando comparadas com sementes inoculadas e não tratadas. De acordo com Abbasi e Lazarovits (2006), o tratamento de sementes de pepino com uma formulação de fosfonato (molécula quimicamente análoga aos fosfitos) reduz a incidência do tombamento (*damping-off*) por *Pythium* nas plântulas emergidas. Foi obtido estande de 63% no tratamento com fosfonato e 18% nas plantas não tratadas. Já Tambascio et al. (2014) verificaram que uma formulação de fosfito de potássio aplicado no sulco de plantio em tubérculos de batata semente (*Solanum tuberosum*) aumentou a emergência, a área foliar e a matéria fresca das plantas.

Com base no exposto, objetivou-se estudar as condições ambientais favoráveis ao patógeno e o efeito da densidade de inóculo na germinação de sementes, desenhar *primers* específicos para detecção de *C. truncatum* em sementes de soja por qPCR e avaliar formulações de fosfitos no manejo da antracnose em sementes e vagens de soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da soja no Brasil

A soja (*Glycine max* L.) é uma planta pertencente à família Fabaceae e originária da Ásia. Há registros do seu cultivo datando de cinco mil anos atrás, na China. Há três mil anos os cultivos se expandiram na Ásia e o grão foi, então, utilizado como alimento. Na América, os primeiros cultivos ocorreram nos Estados Unidos, no início do século XIX (BORGES et al., 2017).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, na Bahia, de onde se espalhou pelo restante do país. Entre as décadas de 1960 e 2010, foi a cultura de maior expansão em área plantada, sendo, hoje, correspondente a 49% da área agrícola do Brasil (BORGES et al., 2017). A produção destina-se à fabricação de farelo e ração para alimentação animal, óleo para consumo humano e outros produtos, como farinha, sabão, cosméticos e, mais recentemente, a produção de biocombustíveis (DOMINGUES et al., 2014).

De acordo com levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na última safra foram produzidas 114 milhões de toneladas do grão em uma área total de 34 milhões de hectares. Os maiores estados produtores são o Mato Grosso, o Paraná e o Rio Grande do Sul, que respondem por 60% da produção nacional (CONAB, 2017). Além disso, a produção e o consumo mundial de soja crescem consideravelmente. Nos últimos 40 anos, a variação do crescimento da produção mundial da soja foi de 801,95%, tendo saído de 28.698 mil toneladas, em 1965, para 230.143 mil toneladas, em 2005 (AFONSO, 2006).

O complexo da soja representa um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira, cujas exportações registraram valores de mais de 145 bilhões de dólares, até agosto de 2017, o que é equivalente a 17% das exportações agropecuárias do Brasil (ABIOVE, 2017). As altas produtividades nem sempre são obtidas devido a fatores bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam as doenças.

2.2 Antracnose da soja

No Brasil, há cerca de 40 doenças identificadas na cultura da soja, responsáveis por perdas anuais de 15% a 20% na produção (KLINGELFUSS et al., 2001). A antracnose é uma importante doença neste cultivo, principalmente em regiões tropicais, que afeta todos os estádios de desenvolvimento da cultura e causa a morte de plântulas. Necrose em pecíolos

manchas e deiscência de vagens e manchas em folhas e hastes estão entre os principais danos. Em condições favoráveis ao patógeno as perdas podem atingir 100% (GALLI et al., 2007).

Essa doença tem como agente etiológico mais comum o fungo ascomiceto *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore. Recentemente, foi também relatada a espécie *Colletotrichum cliviae* como causadora dessa doença. A espécie *C. truncatum* forma acérvulos pretos com setas. Os conídios são unicelulares e hialinos. Esse patógeno pode sobreviver em restos de cultura e, principalmente, em sementes infectadas que constituem o inóculo inicial da doença (BARBIERI et al., 2017; GODOY et al., 2016).

O controle desta doença pode ser realizado mediante resistência genética, tratamento químico de sementes e aplicação de fungicidas na parte aérea. De acordo com Yang e Hartman (2015), a cultivar Mandarin 507 se apresenta como altamente resistente à antracnose, quando comparada à cultivar Williams 82, nos Estados Unidos. No Brasil, Costa et al. (2006) estudaram a reação de cultivares comerciais de soja à infecção por *C. truncatum* e observaram níveis variados de resistência entre os materiais vegetais testados, porém, nenhum deles apresentou imunidade à doença. Segundo Pereira et al. (2009), o tratamento de sementes de soja com fludioxonil + mefenoxam, tiabendazol + thiram e carboxin + thiram promoveu controle da incidência de *C. truncatum* e incrementos na germinação das mesmas. Pesqueira et al. (2016) avaliaram o efeito de fungicidas aplicados via foliar e observaram controle da antracnose e aumento na produtividade da soja, quando aplicado carbendazim associado ou não a ciproconazol + picoxistronin e ciproconazol + piraclostrobin.

Entretanto, o uso intensivo de fungicidas traz alguns efeitos negativos, como o desenvolvimento de resistência do patógeno ao ingrediente ativo, toxidez a humanos, danos a organismos benéficos, poluição do ambiente e redução na viabilidade de *Bradyrhizobium*, com consequente dano na nodulação (BEGUM et al., 2010).

2.3 Inoculação artificial e qPCR na detecção de fungos em sementes

Grande parte dos fungos patogênicos à soja é transmitida por sementes infectadas, sendo *C. truncatum* um dos mais frequentemente detectados. Além disso, a maior incidência desse patógeno nas sementes tem correlação direta com as perdas na produtividade da soja (GALLI et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Rocha et al. (2014) verificaram que o aumento na proporção de sementes infectadas com *Aspergillus ochraceus* reuziu drasticamente a qualidade e a germinação de sementes de soja. Níveis acima de 50% causaram destruição das sementes e, abaixo de 50%, reduziram o

seu desempenho fisiológico. Sendo assim, os estudos sobre o nível de inóculo desse patógeno em sementes e sua detecção tornam-se necessários para que testes com produtos ou cultivares sejam realizados de forma precisa.

A técnica de inoculação artificial de *C. truncatum* em sementes mais comumente utilizada é a da restrição hídrica (MACHADO et al., 2001), que consiste na adição de manitol no meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA). A adição de manitol reduz o potencial osmótico do meio de cultura, indisponibiliza a água para as sementes e inibe sua germinação. De acordo com estes autores, até o potencial osmótico de -1,0 MPa há condições de se manter as sementes em contato com o fungo por mais tempo e, assim, podem ser estudados diferentes densidades de inóculo ou tempos de exposição das sementes ao patógeno.

Araújo et al. (2006) observaram maior incidência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e menor germinação de sementes de algodoeiro com o aumento do tempo de contato das sementes com o fungo de 72 a 108 horas. Segundo Sousa et al. (2008), o aumento no tempo de contato de sementes de algodão com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* promove aumento no índice de doença.

Já para detecção molecular, a técnica de PCR em tempo real é a que tem apresentado resultados mais rápidos e precisos. A técnica se baseia na utilização de *primers* específicos que irão induzir a enzima TaqDNA polimerase a amplificar um segmento do DNA do patógeno. Utiliza-se junto um corante (SYBR Green) ou uma sonda (Taqman), que se ligam à dupla fita de DNA formada na amplificação e liberam fluorescência que é captada no aparelho. Assim correlaciona-se a fluorescência com a densidade de inóculo na amostra (MUNKVOLD, 2009).

Wang et al. (2008) desenharam *primers* e criaram um protocolo de PCR duplex para detecção de *Colletotrichum lindemuthianum*. Houve a detecção do patógeno até a concentração de 1 pg na amostra e os pares de *primers* amplificaram apenas o DNA do fungo alvo. Já Chen et al. (2007) formularam uma reação de Nested-PCR para detecção de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão. Houve amplificação até 10 fg e, de acordo com os autores, o protocolo pode ajudar a reduzir o uso desnecessário de fungicidas e incentivar o uso de sementes sadias.

2.4 Efeito da temperatura na intensidade das doenças de plantas

O ambiente pode afetar diretamente a intensidade das doenças de plantas, atuando na susceptibilidade do hospedeiro e/ou na virulência do patógeno. Os principais fatores

ambientais são a temperatura, a pluviosidade, a umidade relativa do ar, a intensidade luminosa, a fertilidade e o pH do solo, além da concentração de CO₂ atmosférico, entre outras (LUCK et al., 2011).

A temperatura pode influenciar diretamente a virulência dos patógenos, pois as enzimas respondem aos mais diversos estádios metabólicos do ciclo de vida dos patógenos fúngicos, os quais apresentam uma temperatura ótima para realizar suas funções durante a infecção (DIAS et al., 2005). Com isso, a intensidade do ataque do patógeno pode ser influenciada pela temperatura.

Cutinases, poligalacturonases e pectinases são exemplos de enzimas essenciais à virulência de *C. truncatum* (RAMOS et al., 2010; AUYONG et al., 2015). A soja é cultivada em todas as regiões do Brasil, onde são encontrados diversos tipos de climas, como equatorial, tropical, semiárido e subtropical (PEEL et al., 2007). Portanto, as temperaturas médias no país variam entre as regiões e essa amplitude térmica pode afetar de forma direta a suscetibilidade da soja e/ou a severidade da antracnose. Trabalhos desse tipo com a antracnose em soja não são listados na literatura, porém, há outros realizados com outras culturas e outros patógenos da soja.

De acordo com Schrem & Yang (1996), os sintomas da morte súbita da soja (*Fusarium solani*) são mais severos com a temperatura do solo próxima de 15 °C e, acima dessa temperatura, houve redução na intensidade da doença. Dias et al. (2005) verificaram que houve efeito da temperatura no crescimento micelial, na esporulação e na germinação de esporos de *Colletotrichum* spp. isolado de plantas de café (*Coffea arabica*). Segundo Araújo et al. (2006), houve maior incidência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) com o aumento na temperatura. A 15 °C houve 7% de incidência e, a 30 °C, ela foi de 89%.

Em soja, Schuh & Adamowicz (1993) observaram maior severidade da mancha de *Septoria glycines* com o aumento no molhamento foliar, sendo os maiores valores de severidade obtidos na temperatura de 25 °C, em relação às de 15 °C, 20 °C e 30 °C. Já Alves et al. (2007) verificaram maior intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja na temperatura de 25 °C, nas cultivares Savana, Conquista e Suprema. Segundo Pinheiro et al. (2010), temperaturas entre 25 °C e 30 °C favoreceram a formação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em soja. De acordo com Dorrance et al. (2003), houve um número maior de lesões de *Rhizoctonia solani* no hipocótilo de plantas de soja com o aumento na temperatura.

2.5 Indução de resistência e explosão oxidativa no manejo de doenças de plantas

A resistência das plantas pode ser caracterizada como a capacidade da planta em atrasar ou impedir a entrada e a subsequente atividade de um determinado patógeno em seus tecidos (STANGARLIN et al., 2011). O processo de resistência é dividido em quatro etapas, que são o reconhecimento, ou percepção; a transdução, ou sinalização; a transcrição e a tradução ou resposta (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2015; SILVA et al., 2008).

O reconhecimento é realizado por receptores celulares que percebem um determinado sinal de um eliciador. Os receptores são proteínas codificadas por genes R da planta, capazes de reconhecer produtos de genes Avr do patógeno. Como exemplos de receptores têm-se as proteínas TIR-NBS-LRR, CC-NBS-LRR, LRR quinase, Pto, eLRR e CA-CC. Os eliciadores são substâncias ou compostos reconhecidos pelos receptores, dentre os quais existem os bióticos e os abióticos. Os principais eliciadores bióticos são os padrões moleculares associados ao patógeno, ou PAMPs e os oligolaguronídeos, ou OGAs. Os PAMPs são compostos essenciais ao ciclo de vida dos patógenos e, com isso, sempre que eles tentam invadir a célula vegetal, a planta os reconhece. Como exemplos podem-se citar o flg22 da flagelina, a quitina e a capa proteica dos vírus. Os OGAs são fragmentos de pectina formados pela ação da enzima poligalacturonase, que degrada a parede celular. Os eliciadores abióticos são substâncias capazes de causar este mesmo efeito na planta, como os fosfitos, os silicatos, os hormônios, etc. A transdução é o processo de transmissão direta ou indireta do sinal da membrana ao núcleo, realizado por fosforilação de proteínas quinases e mensageiros secundários, sendo os mais comuns as proteínas-G, o íon Ca^{2+} , Ca^{2+} -calmodulina, adenosina monofosfato cíclica (cAMP), inositol 1,1,4-trifosfato (IP_3), o ácido diacilglicerol (DAG), as espécies ativas de oxigênio, o óxido nítrico, os ácidos salicílico e jasmônico, e o etileno. A terceira etapa consiste na transcrição dos genes de resistência ativados pelos fatores de transcrição (WRKY), formando os mRNAs para serem lidos no citoplasma. Por último, ocorre a tradução de proteínas que podem atuar diretamente sobre o patógeno (proteínas inibidoras de poligalacturonases - PGIPs, quitinases e glucanases) ou que vão levar à formação de compostos tóxicos a ele, como as fitoalexinas, por exemplo (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2015; RESENDE et al., 2007; SILVA et al., 2008).

A indução de resistência consiste na ativação dos mecanismos de resistência latentes da planta. Existem dois tipos de resistência induzida, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (RSI). A SAR pode ser disparada por eliciadores bióticos (PAMPs, OGAs) ou abióticos; a sinalização é mediada pelo ácido salicílico e ocorrem o

acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), síntese de fitoalexinas e HR. A RSI é disparada por não patógenos, como rizobactérias e agentes de controle biológico. A sinalização é feita pelo ácido jasmônico e o etileno, não ocorre acúmulo de PRPs e a planta exibe alteração chamada de efeito “priming” (BARROS et al., 2010; STANGARLIN et al., 2011). De acordo com Walters et al. (2013), o acybenzolar-S-metil (ASM), o ácido β -aminobutírico (BABA), o probenazol, os fosfitos, além de organismos benéficos (agentes de controle biológico, rizobactérias e micorrizas promotoras de crescimento e endofíticos), extratos e eliciadores de algas, sacharina e biochar (biocomposto), são os principais agentes capazes de induzir resistência em plantas.

Entre as respostas de defesa induzida das plantas destaca-se a explosão oxidativa. Este processo consiste na rápida formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs ou ROS), iniciada pela enzima da NADPH-oxidase, localizada na membrana celular. Esta enzima oxida o oxigênio molecular formando o ânion superóxido (O_2^-). A superóxido-dismutase (SOD) converte o superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2); em seguida, a peroxidase (POX) e a catalase (CAT) convertem o peróxido de hidrogênio a água (H_2O) e oxigênio (O_2). As ROS se acumulam rapidamente no início do processo infeccioso e podem (a) atuar diretamente sobre o patógeno, inibindo o seu desenvolvimento, (b) fortalecendo a parede celular por favorecer a ligação cruzada de proteínas estruturais e na (c) na peroxidação de lipídeos da membrana, o que reduz sua fluidez e fortalece sua integridade; d) o peróxido de hidrogênio, espécie ativa de oxigênio mais estável e prontamente transportada através da membrana, pode regular a ativação de genes de defesa, atuar junto o óxido nítrico na indução da reação de hipersensibilidade (HR) e na formação da lignina e na síntese do ácido salicílico (RESEDE et al., 2007; SILVA et al., 2008; STAGARLIN et al., 2011).

Entre as respostas resultantes da explosão oxidativa pode-se citar o acúmulo de lignina e de compostos fenólicos. A lignina é um polímero que é depositado na parede celular, o que torna a célula mais resistente à penetração do patógeno. Já os compostos fenólicos são produzidos rapidamente após a infecção e apresentam toxidez aos patógenos. Como exemplos de fenólicos podem-se citar os ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico (BARROS et al., 2010).

2.6 Fosfitos no manejo de doenças de plantas

Os fosfitos são sais inorgânicos resultantes da reação de uma base forte (hidróxidos de cálcio, potássio, etc.) com o ácido fosforoso (H_2PO_3). O resultado da reação é chamado de fosfito de cálcio, potássio, etc. (Figura 2). No Brasil é comercializado como fertilizante foliar.

Estes produtos atuam no patossistema por nutrição e ativação dos mecanismos de resistência latentes das plantas ou por toxidez direta ao fungo (DALIO et al., 2012). Entretanto, a nutrição é realizada apenas no nutriente que acompanha o íon fosfito, visto que a planta não assimila essa fonte de fósforo, em detrimento do fosfato (RATJEN & GERENDÁS, 2009). Além disso, os fosfitos podem ser translocados na planta via xilema e floema e, devido à translocação descendente, têm sido largamente utilizados no manejo de patógenos radiculares, principalmente espécies de *Phytophthora* (GROVES et al., 2014). Outra característica importante dos fosfitos é o custo reduzido, quando comparado ao dos fungicidas químicos (BUFFARA et al., 2013).

Figura 1 – Modo de ação dos fosfitos em plantas por indução de resistência e toxidez direta (DALIO et al., 2012).

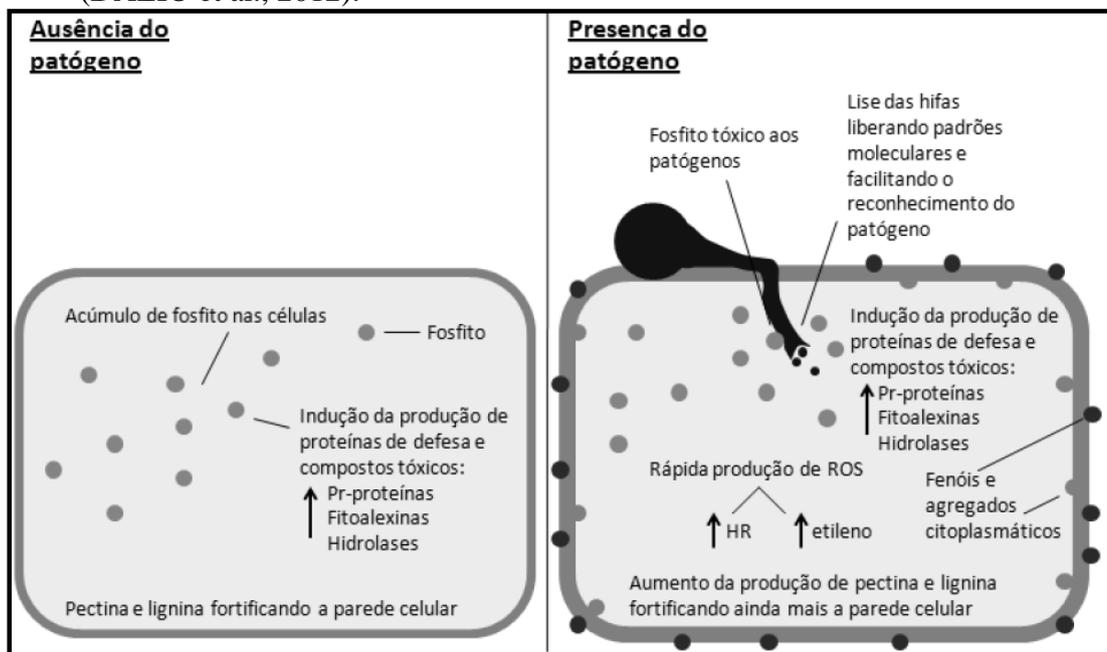
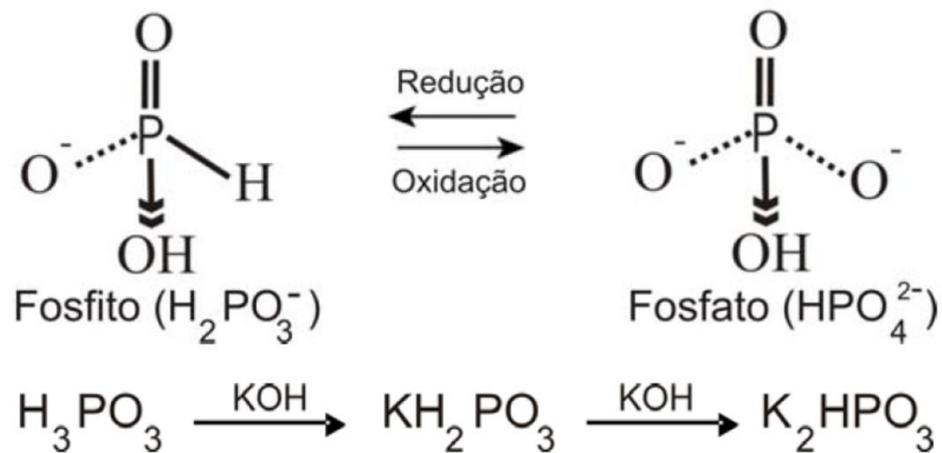


Figura 2 - Diferença entre o fosfito e o fosfato e reação de formação do fosfito de potássio (DALIO et al., 2012).



Araújo et al. (2008) verificaram que uma formulação de fosfito de potássio promoveu controle da mancha foliar gala em macieira (*Mallus domestica*) e reduziu *in vitro* o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* com o aumento nas doses do fosfito, sendo este mais ativo em pH 2,0 que em pH 7,0. Já Buffara et al. (2013) observaram controle da ferrugem em videira (*Vitis vinifera*), proporcionado por uma formulação de fosfito de potássio e redução da germinação de urediniósporos de *Phakopsora euvitis* coletados em folhas tratadas com o produto. Segundo Lobato et al. (2010), formulações comerciais de fosfitos de cálcio, potássio e cobre promoveram redução no crescimento micelial de *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Streptomyces scabies* isolados de batata (*Solanum tuberosum*).

Em feijoeiro, Gadaga et al. (2017) estudaram o efeito de fosfitos no manejo da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). Houve controle da doença com formulações de fosfitos de manganês e potássio, e aumento na atividade da peroxidase (POX) e da polifenoloxidase (PPO). Além da atividade de enzimas, os fosfitos podem induzir fitoalexinas. A aplicação de fosfito de potássio promoveu aumentos na concentração de gliceolina em plantas de soja das cultivares TMG 1066 RR e BRS 184 (CASTANHO et al., 2014). De acordo com Araújo et al. (2015), uma formulação de fosfito de potássio promoveu controle da murcha de ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) em manga (*Mangifera indica*) e incrementou o teor de diversos compostos fenólicos e a formação de barreiras físicas, como tiloses.

Na literatura não são encontrados trabalhos sobre fosfitos aplicados via pulverização foliar para o manejo de *C. truncatum* em soja, mas são encontrados com outras doenças na própria soja e em outras culturas. De acordo com Silva et al. (2011), uma formulação de

fosfito de potássio promoveu controle do míldio em folhas de soja no campo e reduziu a incidência do patógeno nas sementes colhidas. Neves & Blum (2014) observaram que a aplicação de fosfito de potássio após a aplicação de pyraclostrobin + epoxiconazol, tiofanato metílico + flutriafol e tebuconazol promoveu controle da ferrugem asiática da soja. Segundo Gadaga et al. (2017), a aplicação de fosfitos de potássio e manganês promoveu controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em campo e promoveu atividade de enzimas de defesa.

De acordo com Simonetti et al. (2015), a aplicação de fosfito de manganês associado à bactéria *Pseudomonas fluorescens*, via tratamento de sementes, reduziu a severidade da podridão carvão (*Macrophomina phaseolina*) em soja (*G. max*). Tambascio et al. (2014) verificaram que uma formulação de fosfito de potássio aplicado no sulco de plantio em tubérculos de batata semente (*Solanum tuberosum*) aumentou a emergência, a área foliar e a matéria fresca das plantas. Segundo Lobato et al. (2008), sementes de batata inoculadas com *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*, tratadas com fosfitos de cálcio e potássio, têm maior emergência, quando comparadas com sementes inoculadas e não tratadas. De acordo com Abbasi & Lazarovits (2006), o tratamento de sementes de pepino com uma formulação de fosfonato (molécula análoga aos fosfitos) reduz a incidência do tombamento (*damping-off*) por *Pythium* nas plântulas emergidas. Observou-se, em campo, um estande de 63% das plantas oriundas de sementes tratadas com fosfonato, enquanto, na ausência de tratamento, observou-se estande de 18%. Já Borin et al. (2017) verificaram que a associação de fosfito de potássio com o fungicida carbendazim + thiram foi eficaz no controle de patógenos em sementes de milho.

REFERÊNCIAS

ABBASI, P. A. & LAZAROVITS, G. Seed treatment with phosphonate (AG3) supresses *Pythium* damping-off of cucumber seedlings. **Plant Disease**, v. 90, p. 459-464, 2006.

ABIOVE. Exportações do Complexo Soja. Disponível em:
http://www.abiove.com.br/exporta_br.html. Acesso em: 20/09/2017 às 15:00.

AFONSO, H. C. A. G. **Análise dos custos de transporte da soja brasileira**. Rio de Janeiro: IME, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de transporte) – Instituto Militar de Engenharia – IME.

ALVES, M. DE C.; POZZA, E. A.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; MUNIZ, M. F. S.; ZAMBENEDETTI, E. B.; MACHADO, J. C. Intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja (*Glycine max* L.) Merr.) nas cultivares Conquista, Savana e Suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 239-244, 2007.

ARAUJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 35-40, 2006.

ARAUJO, L.; BISPO, W.; RIOS, V.; FERNANDES, S.; RODRIGUES, F. A. Induction of the Phenylpropanoid Pathway by Acibenzolar-S-Methyl and Potassium Phosphite Increases Mango Resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, v. 99, p. 447-459, 2014.

ARAUJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA R. M. Fosfíto de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 54-59, 2008.

ARRUDA, R. S.; MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 164-172, 2012.

AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology and Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2015.

BARBIERI, M. C. G.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; MORAES, S. R. G.; BONALDO, S. M.; ROGÉRIO, F.; LINHARES, R. R.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, p. on-line, 2017.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C.. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 231-239, 2010.

BARROS, H. B.; SEDIYAMA, T.; REIS, M. S.; CECON, P. R.. Efeito da aplicação de fungicidas e da época de colheita na qualidade sanitária de sementes de soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 4, p. 639-645, 2005.

BEGUM, M. M.; SARIAH, M.; PUTEH, A. B.; ZAINAL AABIDIN, M. A.; RAHMAN, M. A.; SIDDIQUI, Y. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. **Biological Control**, v. 53, p. 18-23, 2010.

BORGES, S. C. ; SIMOES, F. S. B. ; TRINDADE, S. L. . A RELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE SOJA E O PIB NO MUNICÍPIO DE DOM PEDRITO/RS. **AGROPAMPA- Revista de Gestão do Agronegócio da Unipampa**, v. 2, p. 2, 2017.

BORIN, R. C.; POSSENTI, J. C.; REY, M. S.; BERNARDI, C.; MAZZARO, S. M. Fosfito de potássio associado a fungicidas para controle de doenças e sanidade de sementes de milho. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 10, n. 1, p. 83-92, 2017.

BUFFARA, C. R. S.; ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D. J.; SOUZA, C. D.; VIDA, J. B.. Atividade de fosfito de potássio na pré e pós-infecção de *Phakopsora euvitis* em folhas de videira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3333-3339, 2013.

CASTANHO, G.; SANTOS NETO, J.; SILVA, C. M.; ALVES, D. S.; ANDRADE, L. M.. Fosfito de potássio como indutor de gliceolina em soja. **Iniciação Científica - CESUMAR**, v. 16, p. 131-137, 2014.

CENTURION, M. A. P. C. & GHINI, R. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças e o desenvolvimento da soja no Brasil**. In: Raquel Ghini; Hemília Hamada. (Org.). *Mudanças Climáticas: Impactos sobre as doenças de plantas no Brasil*. 1ed. Brasília: Embrapa informações tecnológicas, 2008, Cap 10 , p. 191-200.

CHEN, Y. Y.; CONNER, R. L.; GILLARD, C. L.; BOLAND, G. J.; BABCOCK, C., CHANG, K. F.; HWANG, S. F.; BALASUBRAMANIAN, P. M. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. **Plant Disease**. v. 91, p.1271-1276, 2007.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Décimo primeiro levantamento da safra 2016/2017 de grãos / Agosto de 2017**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_10_11_27_12_boletim_graos_agosto_2017.pdf. Acesso em 10/09/2017 às 14:00.

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

DALIO, R. J. D.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V.; SILV, A. C.; BLUMER, S.; PEREIRA, V. F.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S. F. **O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas..** In: Wilmar C. Luz. (Org.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 20, p.206-242, 2012.

- DIAS, M. B.; POZZA, E. A.; ABREU, M. S.; MIRANDA, E. O. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L.. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 545-552, 2005.
- DOMINGUES, M. S.; BERMANN, C.; MANFREDINI, S. A Produção de soja no Brasil e sua relação com o desmatamento na amazônia. **Revista Presença Geográfica**, v. 1, p. 32-47, 2014.
- DORRANCE, A. E.; KLEINHENZ, M. D.; McCLURE, S. A.; TUTTLE, N. T. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. **Plant Disease**, v. 87, p. 533-538, 2003.
- GADAGA, S. J. C.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L.V.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.. Phosphites for control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017.
- GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.163-165, 2007.
- GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. **Doenças da Soja**. In: L. Amorim, J.A.M. Rezende, A Bergamin Filho, L.E.A. Camargo. (Org.). Manual de Fitopatologia. 5ed.Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2016, v. 2, p. 657-676.
- GROVES, E.; HOWARD, K.; HARDY, G.; BURGESS, T. Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi* – *Lupinus angustifolius* model system. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 559-569, 2014.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G.. **Responses to plant pathogens**. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L.. Biochemistry and molecular biology of plants, 2^oed, p. 984-1050, 2015.
- KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; PEREIRA, J. E. Época de aplicação de fungicidas para controle de doenças de final de ciclo em soja, *Glycine max* (L.) Merrill. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 5, p. 1287-1292, 2001.
- LOBATO, M. C.; OLIVIERI, F. P.; GONZÁLEZ ALTAMIRANDA, E. A.; WOLSKI, E. A.; DALEO, G. R.; CALDIZ, D. O.; ANDREU, A. B. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 349-358, 2008.
- LUCK, J.; SPACKMAN, M.; FREEMAN, A.; TREBICKI, P.; GRIFFITHS, W.; FINLAY, K.; CHAKRABORTY, S. Climate change and diseases of food crops. **Plant Pathology**, v. 60, p. 113-121, 2011.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. C. G.; ALVES M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MUNKVOLD, G. P. Seed Pathology progress in academia and industry. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 285-311, 2009.

NEVES, J. S. & BLUM, L. E. B.. Influência de fungicidas e fosfito de potássio no controle da ferrugem asiática e na produtividade da soja. **Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 75-82, 2014.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; McMAHON, T. A.. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions Copernicus Publications**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; ROSA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. E.; NETO, J. C. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2390-2395, 2009.

PESQUEIRA, A. S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203-202, 2016.

PINHEIRO, V. R.; SEIXAS, C. D. S.; GODOY, C. V.; SOARES, R. M.; OLIVEIRA, M. C. N.; ALMEIDA, A. M. R. . Development of *Sclerotium rolfsii* sclerotia on soybean, corn, and wheat straw, under different soil temperatures and moisture contents. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 332-334, 2010.

RAMOS, A. M.; GALLY, M.; GARCIA, M. C.; LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, p. 186-190, 2010.

RATJEN, A. M. & GERENDÁS, J. A critical assessment of suitability of phosphite as a source of phosphorus. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, p. 821-828, 2009.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R.; PEREIRA, L. M. ; CAMPOS, M. A.. **Percepção e transdução de sinais para ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos**. In: Wilmar C. Luz. (Org.). Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 15, p. 129-198, 2007.

ROCHA, F. S.; CATAO, H. C. R. M.; BRANDAO, A. A. ; GOMES, L. A. A. . Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2895-2904, 2014.

SCHERM, H. & YANG, X. B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, v. 86, p. 642-649, 1996.

SCHUH, W. & ADAMOWICZ, A. Influence of assessment time and modeling approach of the relationship between temperature-leaf wetness periods and disease parameters of *Septoria glycines* on soybeans. **Phytopathology**, v. 83, p. 941-948, 1993.

SILVA, A. C.; SOUZA, P. E.; MACHADO, J. C.; SILVA, B. M.; PINTO, J. E. B. P. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Topical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 305-313, 2012.

SILVA, O. C.; SANTOS, H. A. A.; DALLA PRIA, M.; MAY-DE-MIO, L. L. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, v. 30, p. 598-604, 2011.

SILVA, R.A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. . **Defesa de Plantas contra o Ataque de Fitopatógenos** - serie documentos 250. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008 (Periódico Serie Documentos), 49p.

SIMONETTI, E.; PIN VISO, N.; MONTECCHIA, M.; ZILLI, C.; BALESTRASSE, K.; CARMONA, M. Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. **Microbiological Research**, v. 180, p. 40-48, 2015.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAUJO, D. J.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2008.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O J ; TOLEDO, M. V. ; PORTZ, R L ; SCHWANESTRADA, K R F ; PASCHOLATI, S F . A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 18-46, 2011.

TAMBASCIO, C.; COVACEVICH, F.; LOBATO, M. C.; LASA, C.; CALDIZ, D.; DOSIO, G.; ANDREU, A. The foliar application of K phosphite to seed tubers enhanced emergence, early growth and mycorrhizal colonization in potato (*Solanum tuberosum*). **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 132-137, 2014.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WANG, W.; TANG, J. H.; WANG, Y. C. Molecular detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by duplex PCR. **Journal of Phytopathology**, v. 156, p. 431-437, 2008.

YANG, H. & HARTMAN, G. L.. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**. V. 99, p. 143-148, 2015.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

***Colletotrichum truncatum* em sementes de soja: inoculação por restrição hídrica e detecção por qPCR**

Manoel Batista da Silva Júnior*, Sarah da Silva Costa, Aceide Maria Santos Cardoso, Edson Ampélio Pozza, Mário Lúcio Vilela de Resende, José da Cruz Machado, Alexandre Ribeiro Maia de Resende

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, PO Box 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

*Corresponding author:

Palavras-chave: Antracnose. *Glycine max*. Detecção molecular

Resumo

A temperatura é um fator ambiental capaz de influenciar a intensidade das doenças de plantas. Essa variável pode afetar o crescimento e a virulência de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja, afetando a produção e a eficiência de inóculo. A densidade do inóculo nas sementes também pode afetar o desenvolvimento da doença. Com isso, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito da temperatura no crescimento micelial e do tempo de exposição na virulência de isolados de *C. truncatum* em sementes de soja e desenhar e validar *primers* específicos para a detecção deste patógeno. Foram utilizados quatro isolados, LAPS045, 134, 327 e 473 e sementes da cultivar TMG 1176 RR. Para o ensaio de crescimento micelial foram depositados, no centro de placas de Petri contendo meio BDA+manitol (-1,0 MPa), discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro. As placas foram incubadas em BODs, a 18 °C, 21 °C, 24 °C, 27 °C e 30 °C, até que um dos isolados crescesse até a borda da placa. Foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e, com base nele, calculadas as temperaturas de máximo crescimento micelial (TMCM) de cada isolado. Os isolados foram, então, cultivados nas suas respectivas TMCMs. Em seguida, foram distribuídas nas placas as sementes de soja, as quais ficaram em contato com o fungo por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram, então, realizados testes de germinação das sementes e da incidência do fungo. A partir destes dados foram determinados os tempos de exposição que inibiram 50% da germinação (TE₅₀) e a incidência no TE₅₀ (I₅₀). Foi realizado o desenho de *primers* específicos para reação de PCR em tempo real, visando detectar o fungo nas sementes de soja e comprovar o dano complementar à I₅₀. Os dados foram submetidos à análise de regressão no software R 3.1.3 e os ensaios foram montados em DBC, com esquema fatorial com quatro repetições. Em todos os ensaios, a temperatura e o tempo de exposição apresentaram efeito significativo no IVCM, no TE₅₀ e na I₅₀. Os isolados 045, 134, 327 e 473 apresentaram crescimento máximo nas temperaturas de 27,7 °C, 28,2 °C, 29,3 °C e 27,0°C, respectivamente. Os mesmos isolados proporcionaram TE₅₀s de 66,50; 53,17; 36,83 e 27,80 e I₅₀s de 100, 100, 96 e 82,

respectivamente. Portanto, a temperatura apresenta efeito significativo no crescimento micelial dos isolados testados, e o tempo de exposição apresenta efeito significativo na incidência do fungo e na germinação das sementes, sendo o isolado LAPS473 o mais virulento. Os *primers* apresentaram especificidade e apenas nas amostras inoculadas houve amplificação do DNA de *C. truncatum*. O patógeno foi detectado até a concentração de 180 fg. Portanto os *primers* testados foram específicos e sensíveis na detecção de *C. truncatum* em sementes de soja.

Introdução

A soja (*Glycine max* L.) é a principal cultura de grãos do Brasil, com área total plantada de 32 milhões de hectares e produção de 96 milhões de sacas (CONAB, 2015). Uma das principais doenças da cultura é a antracnose, cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum truncatum*. Essa doença é considerada uma das mais frequentes e prejudiciais à cultura, pois afeta todos os seus estádios de crescimento e de desenvolvimento, desde sementes até plantas adultas. Os danos decorrentes da doença são morte de plântulas, necrose em pecíolos e nervuras, manchas foliares, hastes e vagens. Em casos severos, as vagens podem abrir e os grãos serem perdidos antes da colheita. As perdas podem chegar a até 100%, sob condições de temperatura e umidade favoráveis ao patógeno no plantio, devido à redução significativa na germinação das sementes (Galli et al., 2007; Silva et al., 2012). As principais táticas para o seu manejo são o controle químico via tratamento de sementes e resistência genética (Pereira et al., 2009; Yang & Hartman, 2015). No entanto, para avaliar fungicidas e variedades resistentes é necessário reproduzir o inóculo e inocular esse patógeno em ambiente com temperatura e umidade controlada, em ambos os casos, para obter sucesso na infecção e, assim, avaliar os sintomas da doença. Devido a isso, torna-se necessário conhecer essas variáveis para se obter sucesso na condução de experimentos nesse patossistema.

O ambiente é um dos fatores responsáveis por maiores taxas de progresso de epidemias de doenças de plantas e pode atuar na suscetibilidade do hospedeiro e na virulência do patógeno. Os principais fatores ambientais citados são a temperatura, a pluviosidade, a umidade relativa do ar, a intensidade luminosa e a concentração de CO₂ atmosférico, entre outras (Luck et al., 2011). A temperatura pode influenciar diretamente a virulência dos patógenos, pois as enzimas respondem aos mais diversos estádios metabólicos do ciclo de vida dos patógenos fúngicos e apresentam uma temperatura ótima para realizar as suas funções durante a infecção (Dias et al., 2005). Com isso, a intensidade do ataque do patógeno pode ser influenciada pela temperatura.

Cutinases, poligalacturonases e pectinases são exemplos de enzimas essenciais à virulência de *C. truncatum* (Ramos et al., 2010; Auyong et al., 2015). A soja é cultivada em

todas as regiões do Brasil, nas quais são encontrados diversos tipos de climas, como o equatorial, o semiárido e o subtropical (Peel et al., 2007). Portanto, as temperaturas médias no país variam entre as regiões e a amplitude térmica pode afetar de forma direta a suscetibilidade da soja e/ou a virulência de isolados de *C. truncatum*. Estudos relacionando a atividade de enzimas com as temperaturas das áreas produtoras de um país são escassos. Entretanto, Chen et al. (2002) verificaram atividade percentual máxima de cutinase produzida pelo fungo *Fusarium solani pisi* próxima de 30 °C e o aumento ou a redução na temperatura promoveram redução na atividade da enzima citada.

A densidade do inóculo também pode afetar a virulência de *C. truncatum*. Esse fungo é transmitido por sementes e o nível de inóculo nelas está diretamente relacionado à maior intensidade da antracnose e à redução na produtividade da soja (Silva et al., 2013). A técnica comumente utilizada para a inoculação experimental de fungos em sementes de soja é a restrição hídrica (Machado et al., 2001), a qual permite simular diferentes densidades de inóculo equivalentes aos tempos de exposição das sementes ao fungo. Pode-se, então, obter informações sobre a virulência de isolados de *C. truncatum* em sementes de soja e compará-la com a quantidade de inóculo infectante. Essa quantificação pode ser validada com precisão por reação de PCR em tempo real (Capote et al., 2012).

Estudos sobre densidade de inóculo de *C. truncatum* nas sementes de soja e sua relação com a doença são raros na literatura, entretanto, Araújo et al. (2006) verificaram maior incidência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e menor germinação de sementes de algodão com o aumento no tempo de exposição ao fungo em meio com restrição hídrica.

Assim, os estudos sobre a temperatura ideal de crescimento micelial e do tempo de exposição das sementes de soja na virulência de *C. truncatum* se fazem necessários, pois isolados desse fungo oriundos de diferentes locais, com diferentes climas e cultivares, podem apresentar comportamentos distintos quanto ao crescimento e à virulência. Estes estudos podem aprimorar os experimentos desse patossistema, proporcionando inoculações mais precisas e reprodutíveis.

Com base no exposto, o objetivo, neste trabalho, foi avaliar o efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum truncatum* e efeito do tempo de exposição das sementes ao patógeno em sua virulência, e desenhar e validar *primers* específicos para a detecção do patógeno em sementes de soja por reação de qPCR.

Material e métodos

Cultivar utilizada e isolados do patógeno

Foram utilizadas sementes do cultivar TMG 1176 RR, provenientes da Fundação Mato Grosso, produzidas na safra 2014/2015, com germinação média de 95% e susceptíveis a *C. truncatum*. Os quatro isolados de *C. truncatum* utilizados nos ensaios foram obtidos no Laboratório de Análise e Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os mesmos foram isolados de sementes de soja em diferentes locais do Brasil (Tabela 1). Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Tabela 1 - Características dos isolados de *C. truncatum* utilizados nos experimentos. Lavras, MG, 2017.

Código	Clima*	Município	Ano
LAPS045	Aw**	Rio Verde, GO	2010
LAPS134	Aw**	Primavera do Leste, MT	2010
LAPS327	Aw**	Ibiá, MG	2011
LAPS473	Cwa***	Patos de Minas, MG	2013

*Classificação climática de Koppen, citada por Peel et al. (2007)

**Aw – clima tropical com inverno seco

***Cwa – clima temperado úmido com inverno seco e verão quente (tropical de altitude)

Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *C. truncatum*

Para cultivar os isolados de *C. truncatum* foi utilizado o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), acrescido de manitol (70 g.L^{-1}). A adição do manitol reduziu o potencial osmótico a $-1,0 \text{ MPa}$, para inibir a germinação das sementes de soja. Discos de 5 mm de micélio do fungo foram depositados no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL do BDA. As placas foram incubadas em BODs sob fotoperíodo de 12 horas de luz tipo growlux, nas temperaturas de 18 °C, 21 °C, 24 °C, 27 °C e 30°C. O ensaio foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, em esquema fatorial com quatro isolados x cinco temperaturas, e a parcela foi composta por uma placa. Foram, então, realizadas avaliações diárias dos diâmetros ortogonais da colônia fúngica. Com base na média dos dois diâmetros, em cada avaliação foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme metodologia de Maguire (1962). As avaliações foram realizadas até que um dos isolados atingisse a borda da placa.

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar os pressupostos da análise de variância. Em caso de significância, os dados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Os dados do ensaio foram, então, submetidos à análise de variância no teste F e, em caso de resultado significativo, foram submetidos à análise de regressão ($p \leq 0,05$), com o ajuste dos modelos linear e quadrático. O modelo escolhido para representar os dados foi o de maior R^2 , parâmetros da equação significativos e desvio de regressão não significativo. Todas as análises foram realizadas no software R 3.1.3. Após a escolha do modelo, utilizou-se a equação para determinar a temperatura de máximo crescimento micelial (TM_{IVCM}) dos isolados a partir do ponto de máximo da equação obtido, igualando a zero a derivada de primeira ordem do modelo ajustado (Petter et al., 2012). Para determinar o isolado de maior IVCM substituiu-se na equação da temperatura x IVCM o valor da temperatura e obteve-se o IVCM máximo ($IVCM_{MAX}$) de cada isolado.

Efeito do tempo de exposição das sementes à colônia fúngica na virulência de isolados de *C. truncatum* nas sementes de soja

Ao fim do primeiro ensaio, os quatro isolados foram cultivados nas suas respectivas TM_{IVCMS} em BODs, sob fotoperíodo de 12 horas de luz growlux 20W. Para tanto, foram depositados três discos de micélio de cada isolado por placa contendo o meio BDA+manitol e, em seguida, realizada a incubação das mesmas. Quando a colônia fúngica dos isolados cresceu totalmente nas placas, as sementes de soja foram depositadas aleatoriamente sobre a colônia fúngica, sendo mantidas em contato com o fungo por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Após a inoculação das sementes nestes respectivos tempos de exposição, elas foram encaminhadas para realizar os testes de germinação em rolo de papel e de sanidade (*Blotter-test*), conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

O teste de germinação foi montado em esquema fatorial com cinco isolados x cinco tempos de exposição, sob delineamento em blocos casualizados com oito repetições de cinquenta sementes cada, sendo cada repetição correspondente a um rolo de papel. Neste teste foi determinado o número de plântulas normais, anormais, mortas e infectadas. Com base na relação entre o número de normais e o total foi determinada a germinação. Já o teste de sanidade foi realizado em placas de acrílico com 40 sementes cada, em esquema fatorial e delineamento em blocos casualizados com dez repetições, sendo cada repetição composta por uma placa. As placas foram analisadas em microscópio para a determinação da presença/ausência do fungo nas sementes. Com base no número de sementes infectadas e o total foi determinada a incidência.

Para determinar o isolado mais virulento foi realizada análise de regressão da germinação e da incidência em função do tempo de exposição das sementes à colônia do fungo. Para tanto, os resíduos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, em caso de significância, os dados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Para a análise de variância, os dados foram submetidos ao teste F e, caso significativo, foi realizada a regressão, a 5% ($p \leq 0,05$), nos modelos linear e quadrático. O modelo escolhido para a representação dos dados foi o de maior R^2 , parâmetros da equação significativos e desvios de regressão não significativos. As análises citadas foram realizadas no software R 3.1.3.

Com base na curva da germinação em função do tempo de exposição foi determinado o tempo de exposição que inibiu 50% da germinação das sementes (TE_{50}), conforme metodologia de Torres-Calzada et al. (2015). Foi considerado mais virulento o isolado com menor TE_{50} . Com base na curva da incidência obtida no teste de sanidade foi determinada a incidência no TE_{50} (I_{50}), para confirmar se o ataque do fungo realmente causou a redução na germinação das sementes.

Desenvolvimento e validação de *primers* específicos para detecção de *C. truncatum* em sementes de soja por PCR em tempo real

Para verificar o nível de incidência do fungo nas sementes foi realizada a reação de PCR em tempo real. Para tanto, foram desenhados *primers* específicos para detecção do fungo.

Análise de sequências e desenho dos *primers*

Foram gerados alinhamentos múltiplos para as sequências parciais de DNA da região gênica, desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) de *Colletotrichum truncatum*, e outras espécies do *Colletotrichum*, utilizando a ferramenta Clustal W, implementada no programa Mega 5 (Damm et al., 2009; Tamura et al., 2011). Sítios únicos foram identificados nas sequências de *C. truncatum* e utilizados para desenhar *primers* específicos para a espécie. Os *primers* desenvolvidos foram analisados quanto às características de desempenho, como estrutura em forma de hairpin, formação de autodímero potencial e estabilidade do terminal 3', utilizando a plataforma OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Extração de DNA

Os isolados foram repicados em 100 mL de meio extrato de malte líquido a 2% (20 g de extrato de malte G-1; Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubados, por três dias, em agitador rotativo, a 100 rpm. Os micélios foram filtrados e macerados em nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega Brasil, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações e a qualidade do DNA foram estimadas em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e visualmente em gel de agarose 1,2%.

Especificidade dos *primers* desenhados

A especificidade dos *primers* foi testada por meio da amplificação por PCR convencional de 69 isolados de *C. truncatum*, outras espécies de *Colletotrichum* e de espécies associadas à soja, tais como *Colletotrichum* sp., *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia* sp., *Cercospora* sp., *Diaphorte* sp. e *Macrophomina phaseolina* (Anexo I). A PCR foi realizada utilizando-se o kit GoTaq® Colorless Master Mix em 25 µL da reação contendo 12,5 µL de Go Taq, 0,7 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol, 9,1 µL de água ultrapura e 2,0 µL de DNA (20ng. µL⁻¹). A reação foi realizada em termociclador My Cyclyer thermal cycler TM (BIO-RAD) e as condições para amplificação foram 94 °C, por 5 minutos; 40 ciclos de 94 °C, por 45 segundos; 65 °C, por 45 segundos, 72 °C, por 2 minutos e extensão final de 72 °C, por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com GelRed (Biotium®, Hayward, CA, EUA). A visualização das bandas foi realizada em fotodocumentador de UV MiniBis Pro (Uniscience) e o tamanho dos fragmentos foi comparado com um marcador de DNA de 100 pb (New England Biolabs). As reações foram repetidas três vezes, para confirmação dos resultados.

Determinação da sensibilidade e detecção de *primers* de *C. truncatum* em sementes

A sensibilidade dos *primers* específicos de *C. truncatum* foi testada por meio de PCR em tempo real com SYBR Green. A concentração do DNA genômico purificado do isolado LAPS473 de *C. truncatum* foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) e foram preparadas sete diluições seriadas do DNA, nas concentrações finais de 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg e 100 fg.

Para validação dos *primers* foi realizada qPCR utilizando sementes inteiras de soja inoculadas com o isolado LAPS473 no seu TE₅₀. O DNA da amostra foi extraído de 400 sementes inoculadas e não inoculadas, as quais foram moídas separadamente em moinho A11

Basic IKA, contendo nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Brasil, São Paulo, Brasil), conforme recomendações do fabricante. A reação de qPCR foi realizada utilizando-se um volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green PCR kit" (Qiagen), 0,7 µL de cada *primers* específico na concentração final de 0,28 µM, 9,10 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA da amostra. As condições da reação foram um ciclo de 94 °C, por 1 minuto; 32 ciclos de 94 °C, por 30 segundos e 55 °C, por 45 segundos. Como controle positivo, foi utilizado o DNA puro do isolados LAPS473 de *C. truncatum*, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura esterilizada.

Foram considerados os valores em nanogramas de DNA expressos através do Ct (Cycle Threshold), para cada reação e, por meio dessas diluições, foi estabelecida a curva padrão nas concentrações finais de 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg e 100 fg. Os valores de Ct foram determinados utilizando-se o Rotor-Gene 6500 (Corbett Research, Mortlake, Austrália), software versão 1.7.75.

Resultados

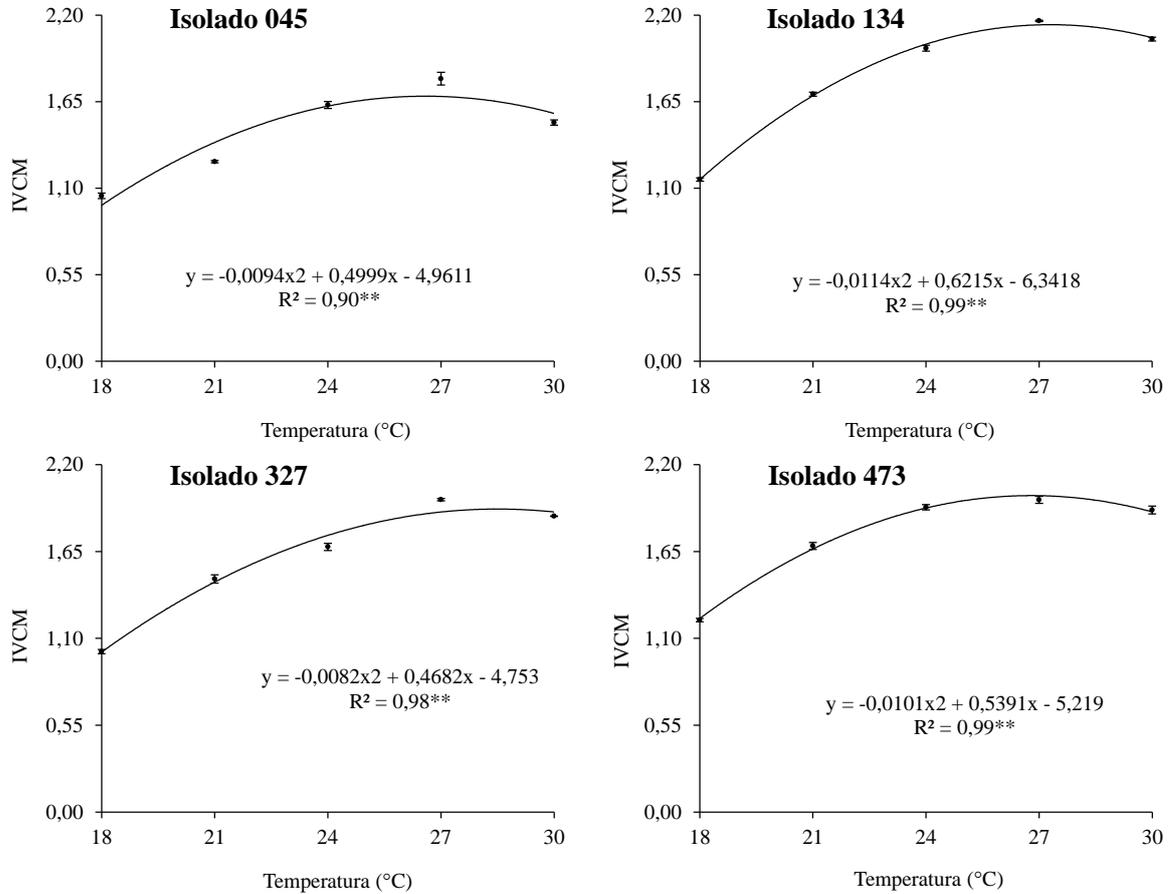
Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da temperatura no crescimento micelial dos quatro isolados testados, no crescimento deles em cada temperatura e na interação isolado x temperatura (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de variância temperatura x isolados no crescimento micelial de *C. truncatum*. Lavras, MG, 2017.

Fator	Significância (Teste F)	Normalidade (Shapiro-Wilk)
Isolado	**	NS
Temperatura	**	NS
Temperatura x isolado	**	NS
Bloco	NS	NS

O melhor modelo para explicar o crescimento dos isolados em função da temperatura foi o quadrático, pois todos cresceram até um ponto máximo e tiveram o crescimento reduzido em seguida com maiores R^2 , desvios de regressão não significativos e parâmetros da equação significativos (Figura 1). Com base nas equações de regressão, foram obtidas TM_{IVCMS} de 27,0 °C; 27,7 °C; 28,2 °C e 29,3 °C, para os isolados LAPS473, LAPS045, LAPS134 e LAPS327, respectivamente. (Tabela 2). Portanto, o intervalo de temperatura ideal para o máximo crescimento micelial dos isolados testados variou de 27,0 °C a 29,3 °C.

Figura 1 - Efeito da temperatura sobre o índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados de *C. truncatum* utilizados no ensaio.



Houve diferença significativa no crescimento micelial dos isolados em cada temperatura testada. Todos os isolados cresceram mais nas temperaturas de 27 °C e 30°C (Figura 2). Foram obtidos $IVCM_{MAX}$ de 1,96; 2,42; 2,09 e 2,04, para os isolados LAPS045, LAPS134, LAPS327 e LAPS473, respectivamente (Tabela 2). Portanto, a temperatura afetou de forma significativa o crescimento micelial dos isolado de *C. truncatum*.

Figura 2 - Índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados em cada uma das temperaturas testadas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($P \leq 0,05$), pelo teste de Scott-Knott.

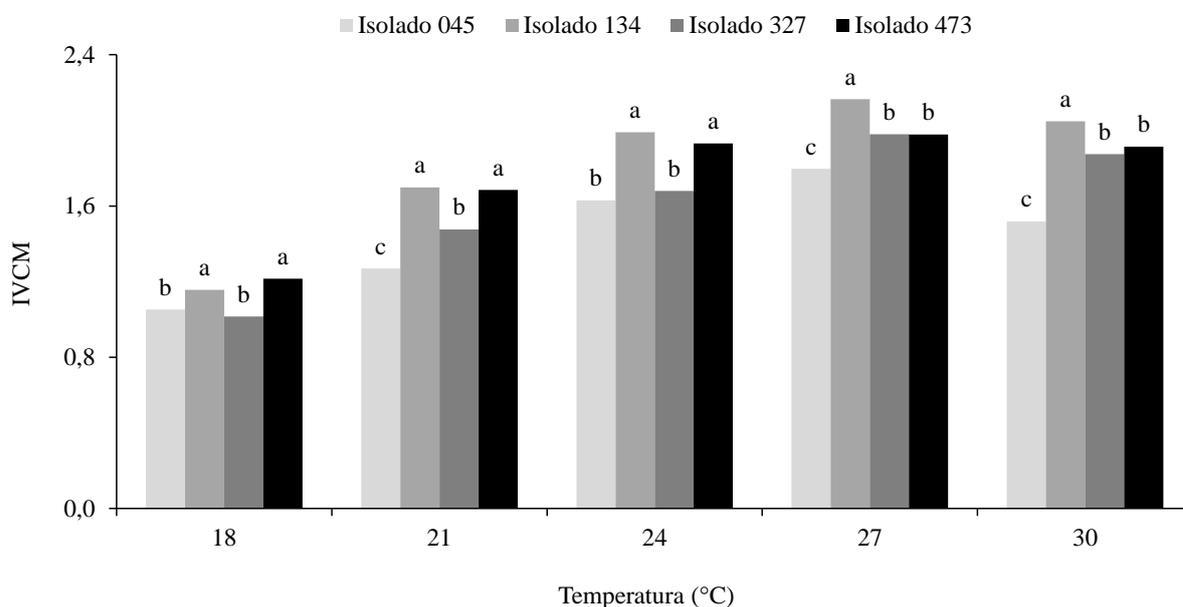


Tabela 3 - Temperatura de máximo índice de velocidade de crescimento micelial (TM_{IVCM}) e índice de velocidade de crescimento micelial máximo ($IVCM_{MAX}$) para os isolados testados. Lavras, MG, 2017.

Isolado	TM_{IVCM} (°C)	$IVCM_{MAX}$
LAPS045	27,70	1,96
LAPS134	28,20	2,42
LAPS327	29,30	2,09
LAPS473	27,00	2,04

Nos testes de germinação em rolo de papel e de sanidade (*nBlotter-test*) houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da temperatura na germinação das sementes e na incidência do fungo nelas, dos isolados nas temperaturas testadas para ambas as variáveis e na interação temperatura x isolados na germinação e na incidência (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância tempo de exposição x isolados de *C. truncatum* na germinação de sementes de soja. Lavras, MG, 2017.

Germinação das sementes (%)			Incidência do fungo nas sementes (%)		
Fator	Significância (Teste F)	Normalidade (Shapiro-Wilk)	Fator	Significância (Teste F)	Normalidade (Shapiro-Wilk)
Tempo	**	NS	Tempo	**	NS
Isolado	**	NS	Isolado	**	NS
Tempo*	**	NS	Tempo*	**	NS
Isolado			Isolado		
Bloco	NS	NS	Bloco	NS	NS

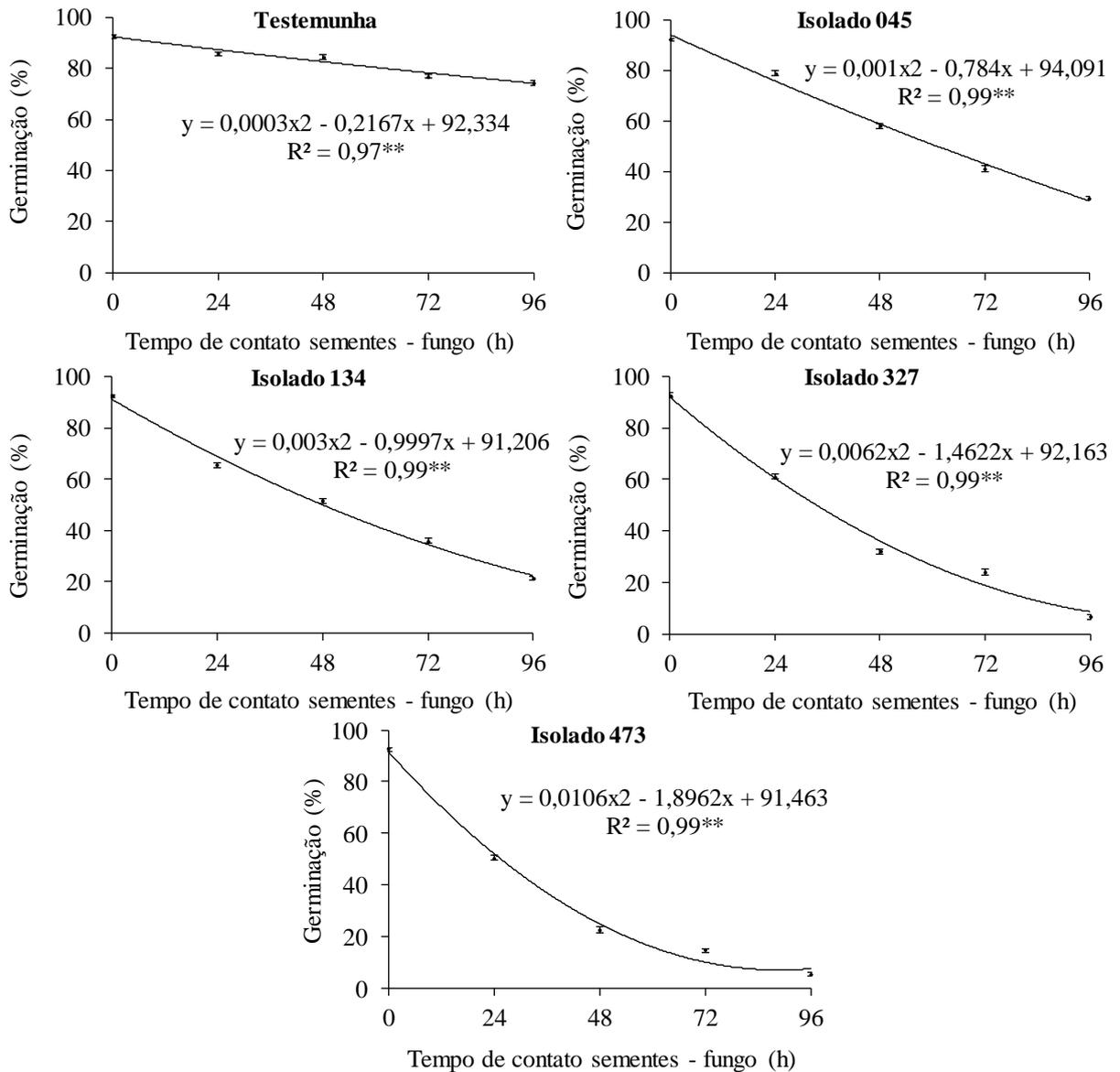
** Significativo a 1% ($P \leq 0,01$)

* Significativo a 5% ($P \leq 0,05$)

NS Não significativo

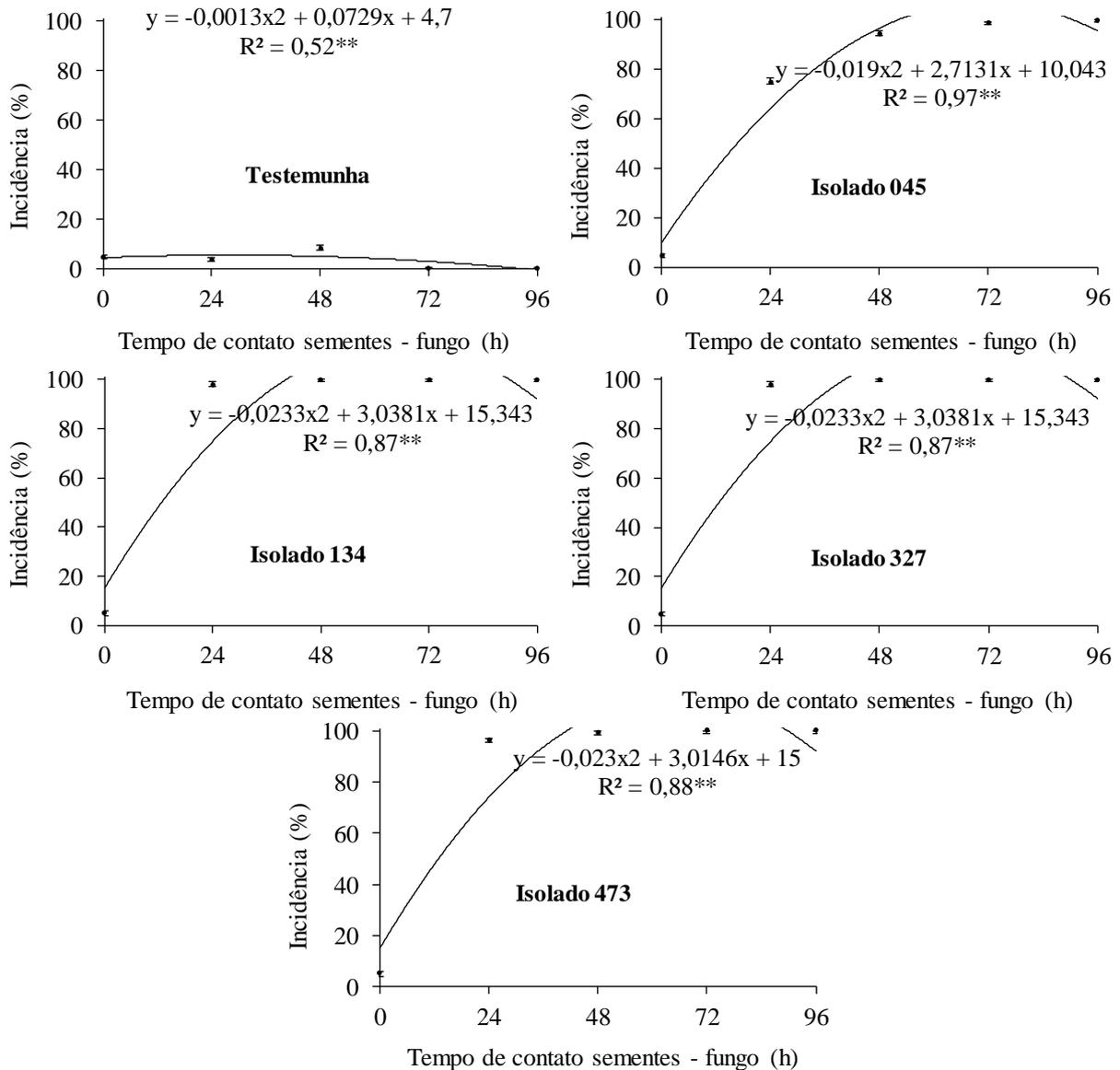
O modelo quadrático explicou melhor o comportamento da germinação das sementes e da incidência do patógeno em função do tempo de exposição, por apresentar os maiores R^2 , desvios de regressão não significativos e parâmetros da equação significativos (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Efeito do tempo de contato das sementes com o fungo (tempo de exposição) na sua germinação.



**Significativo a 1% ($P \leq 0,01$).

Figura 4 - Efeito do tempo de contato das sementes com o fungo (tempo de exposição) na incidência do patógeno nelas.



**Significativo a 1% ($P \leq 0,01$).

Houve redução da germinação com aumento do tempo de exposição e foram obtidos TE_{50} s de 66,50; 53,17; 36,83 e 27,80 horas para os isolados LAPS045, LAPS134, LAP 327 e LAPS473, respectivamente. A incidência aumentou com o aumento do tempo de exposição. Após 24 horas de exposição das sementes, todos os isolados, exceto LAPS473, proporcionaram nível de incidência próximo de 100%. Sementes inoculadas com o isolado LAPS473 atingiram este nível às 48 horas de exposição. Foram proporcionadas I_{50} s de 100,00%, 100,00%, 96,03% e 82,02% nos isolados LAPS045, LAPS134, LAPS327 e LAPS473, respectivamente. Não foi possível determinar o TE_{50} e a I_{50} da testemunha, pois os valores se encontram fora do intervalo de tempo testado (Tabela 4). Em cada tempo de

exposição houve diferenças significativas para os isolados e a testemunha, a qual se manteve significativamente inferior aos isolados na incidência e superior na germinação (Figura 5). Portanto, o tempo de exposição das sementes ao fungo promove aumento na incidência e redução na germinação das sementes. O isolado LAPS473 foi mais virulento porque reduziu a 50% a germinação das sementes em tempo menor que os demais. No seu TE_{50} foi obtida a incidência de 82,02%, o que mostra o efeito deste isolado na queda da germinação das sementes.

Figura 5 - Efeito dos isolados na germinação e na incidência nos tempos de exposição avaliados.

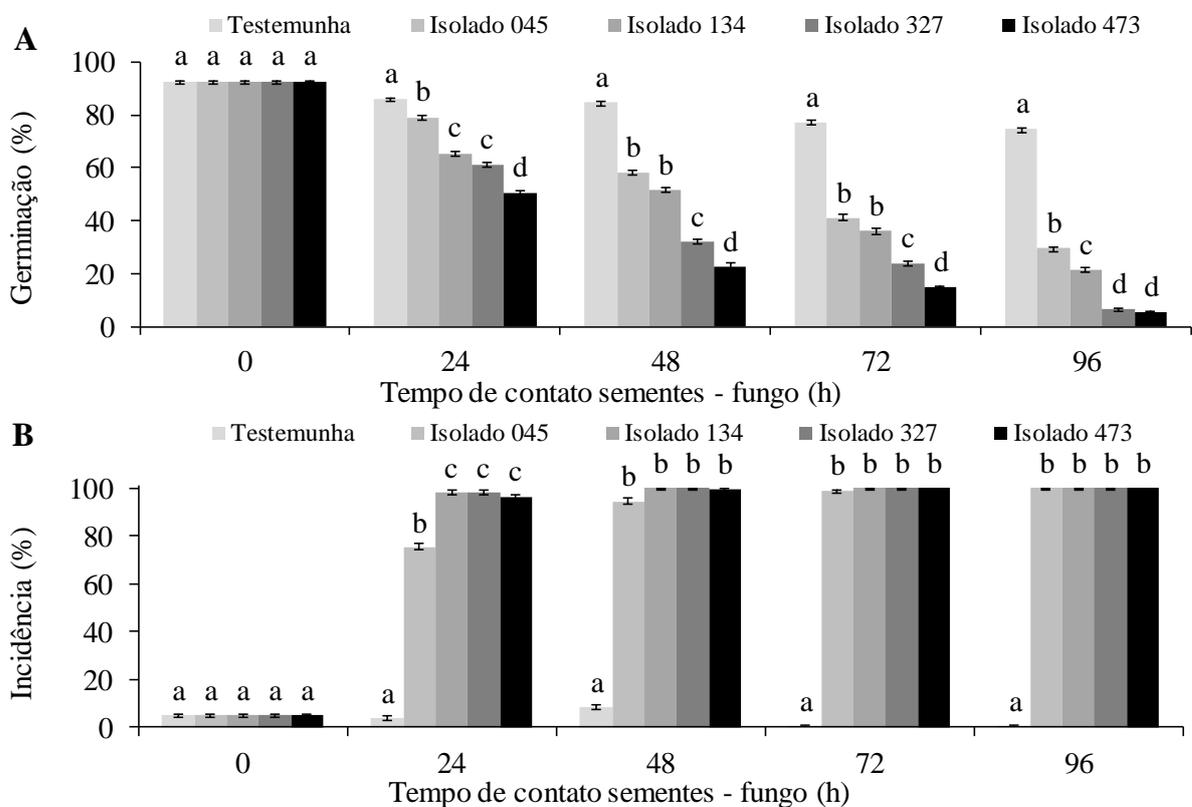
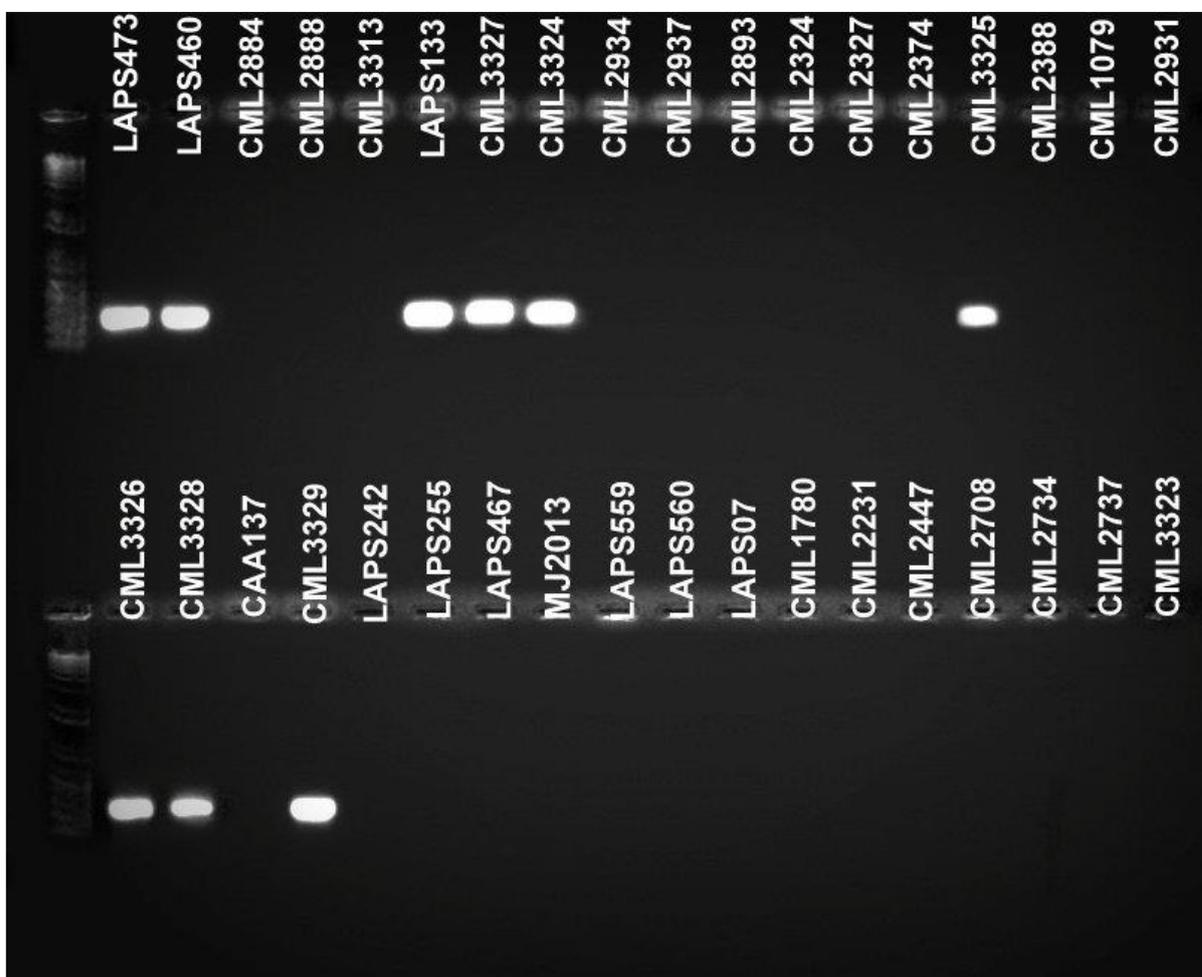


Tabela 5 - Tempo de exposição que inibe 50% da germinação das sementes (TE_{50}) e incidência de *C. truncatum* nas sementes no TE_{50} (I_{50}), para os isolados testados. Lavras, MG, 2017.

Isolado	Variável	
	TE_{50} (h)	I_{50} (h)
LAPS045	66,50	100,00
LAPS134	53,17	100,00
LAPS327	36,83	96,03
LAPS473	27,80	82,02

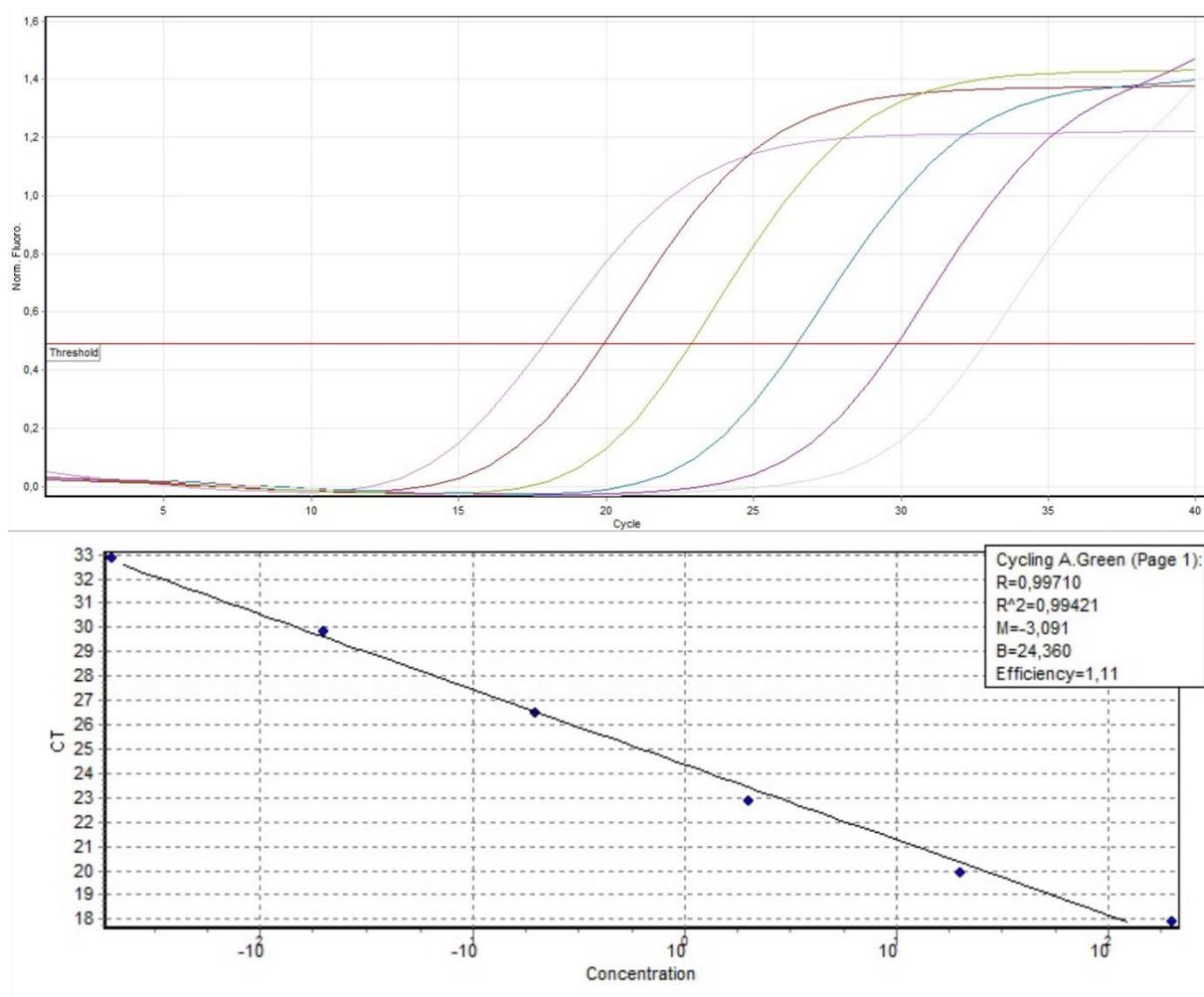
Os *primers* específicos desenhados a partir da região gênica GAPDH para *C. truncatum* apresentaram as seguintes sequências: C trunc F1 (5'-ATGTATCACCCCACTCTACCCCTCAAAAC -3') e C trunc R1 (5'-CAGTAAACCATTGAGCTTGAC -3') e amplificaram um fragmento de 211 pb. A pesquisa no BLASTn revelou alta especificidade do par de *primers* CtruncF1/CtruncR1 entre as sequências de *C. truncatum* depositadas no GenBank. Os *primers* amplificaram apenas o DNA de *C. truncatum*, não havendo amplificação de outras espécies de *Colletotrichum* e nem de outros patógenos da soja testados (Figura 3).

Figura 3 - Especificidade do par de *primers* CtruncF1/CtruncR1 para isolados de *C. truncatum* e outras espécies de fungos associados a soja: LAPS473 - *C. truncatum*; LAPS 460 - *C. truncatum*; CML2884 - *C. siamense sensu lato*; CML2888 - *C. tropicale*; CML3313 - *C. brevisporum*; LAPS 133 - *C. truncatum*; CML3327 - *C. truncatum*; CML3324 - *C. truncatum*; CML2934 - *C. theobromicola*; CML 2937 - *C. siamense sensu lato*; CML2893 - *C. asianum*; CML2324 - *C. gossypii*; CML2327 - *C. gossypii*; CML2374 - *C. gossypii* var. *cephalosporiodes*; CML3325 - *C. truncatum*; CML2388 - *C. gossypii* var. *cephalosporiodes*; CML1079 - *C. dematium*; CML2391 - *C. gossypii*; CML3326 - *C. truncatum*; CML3328 - *C. truncatum*; CAA137 - *C. fructicola*; CML3329 - *C. truncatum*; LAPS 242 - *Sclerotinia* sp.; LAPS 255 - *Cercospora* sp.; LAPS 467 - *C. cassiicola*; MJ2013 - *C. cassiicola*; LAPS 559 - *Diaphorte* sp.; LAPS 560 - *Colletotrichum* sp.; LAPS 07 - *M. phaseolina*; CML1780 - *F. paranense*; CML2231 - *F. brasiliense*; CML2447 - *F. tucumaniae*; CML2708 - *A. flavus*; CML2734 - *A. clavatus*; CML2737 - *A. chevalieri* e CML3323 - *M. phaseolina*.



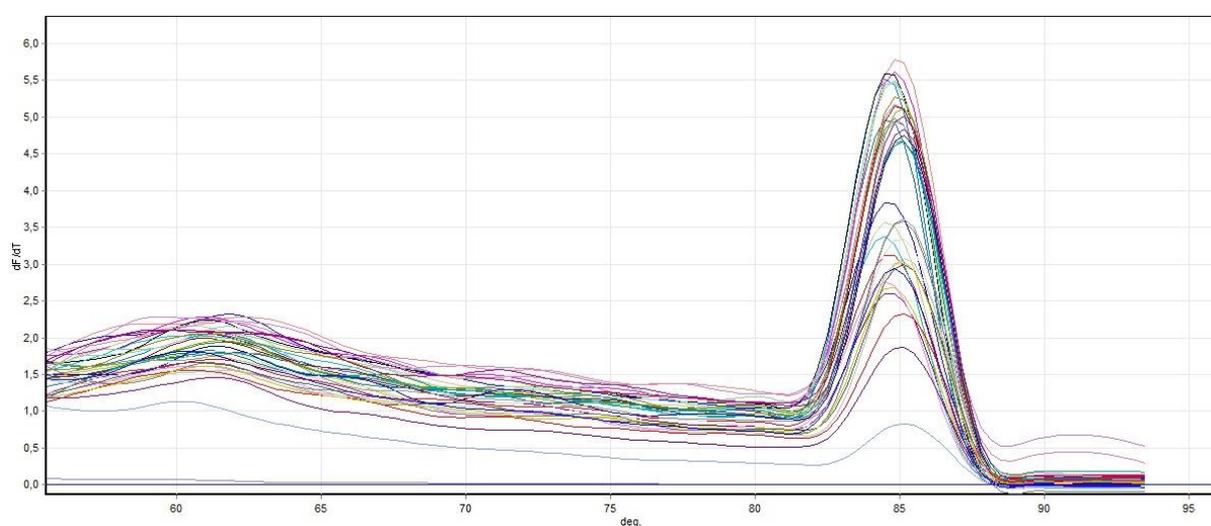
Em relação à sensibilidade dos *primers*, verificou-se que houve amplificação de DNA do isolado LAPS473 de *C. truncatum* até a concentração de 180 fentogramas, com um valor de Ct de 33,3. A curva padrão obtida mostrou correlação linear entre o número de cópia do DNA e valores Ct, com eficiência (E) de 1,11 e valor de R² de 0,994 (Figura 4).

Figura 4 - Curva padrão do qPCR, baseada do DNA do isolado LAPS473 de *C. truncatum*, variando de $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ fg.}\mu\text{L}^{-1}$ por PCR versus os valores quantitativos correspondentes (Ct).



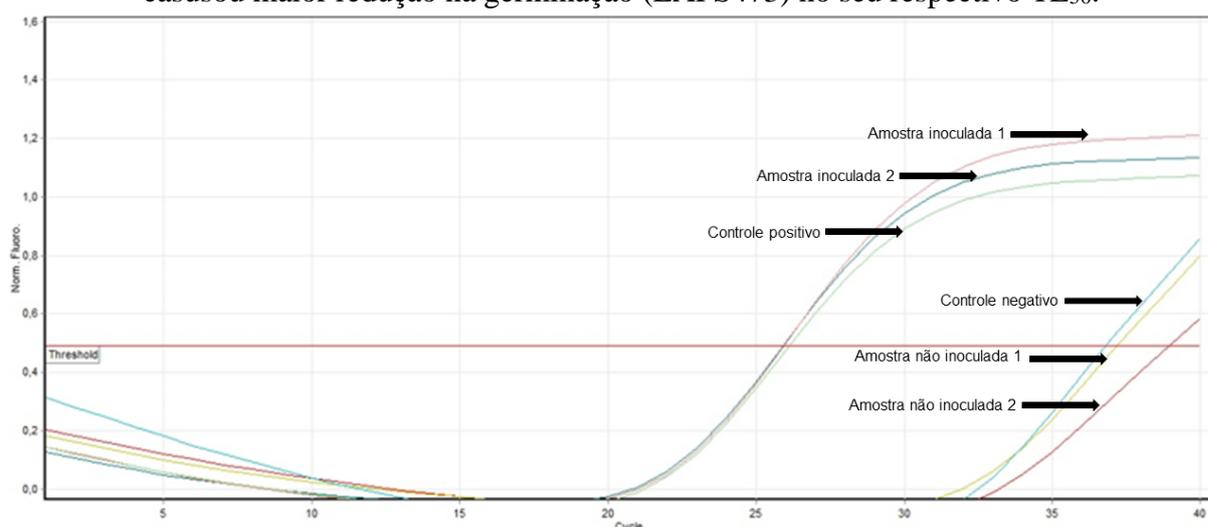
A análise da curva de Melting mostrou um único pico com um ponto de fusão de $85 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 5).

Figura 5 - Curva de Melting para o DNA alvo de *C. truncatum* com ponto de fusão de $85 \text{ }^\circ\text{C}$.



No qPCR foi observada amplificação exponencial na amostra inoculada e no controle positivo a partir de 20 ciclos de amplificação. Na amostra não inoculada, no controle negativo, na água e no mix não houve amplificação exponencial (Figura 5). Os valores de Ct das amostras inoculadas variaram de 25,92 a 25,94.

Figura 4 - Reação de PCR em tempo real com sementes inoculadas ou não com o isolado que casou maior redução na germinação (LAPS473) no seu respectivo TE₅₀.



Discussão

Os estudos sobre o efeito do ambiente na intensidade das doenças de plantas são imprescindíveis para que o manejo seja realizado no exato momento de impedir o crescimento de uma epidemia. Nesse contexto, a temperatura é uma variável essencial no crescimento ou na redução da intensidade de epidemias. Conhecer a temperatura ideal de crescimento de determinado isolado fúngico pode favorecer a inoculação de experimentos e estes dados podem ser aplicados ao manejo de forma mais precisa. A antracnose é uma importante doença da soja, entretanto, não são encontrados, na literatura, trabalhos sobre a temperatura ideal de crescimento de isolados e a virulência dos mesmos. Como esta cultura é plantada em todo país, a diversidade de climas leva a uma amplitude térmica grande entre regiões e isto pode influenciar diretamente o comportamento do fungo *C. truncatum*, agente etiológico da doença.

No presente trabalho foram verificadas diferenças entre os isolados testados quanto à temperatura ideal de crescimento micelial. Dentre os isolados testados, LAPS045, LAPS134 e LAPS327 são provenientes de municípios com clima Aw (tropical com inverno seco), e LAPS473 é proveniente de município com clima Cwa (temperado úmido com inverno seco). No ensaio de crescimento micelial, os três isolados obtidos de locais com clima Aw tiveram

TM_{IVCMS} maiores, quando comparados com o isolado proveniente de local com clima Cwa. Como no clima Aw as temperaturas médias são superiores às do clima Cwa, este efeito pode ser devido à adaptação do isolado LAPS473 a temperaturas mais baixas quando comparado aos demais.

Outro ponto importante no qual atua a temperatura é a atividade de enzimas de virulência do patógeno. Algumas enzimas utilizadas por *C. truncatum* para vencer barreiras de defesa da soja, tais como cutinases, poligalacturonases e pectinases (Ramos et al., 2010; Auyong et al., 2015), são essenciais para que ocorra a infecção. Essas enzimas, assim como quaisquer outras, necessitam de uma temperatura ideal para a sua atividade. Portanto, mudanças na temperatura podem afetar a atividade delas e, conseqüentemente, os processos da doença. Os resultados obtidos comprovam efeito significativo da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados de *C. truncatum* testados. Para a soja não são citados trabalhos, entretanto, de acordo com Cardoso et al. (2015), na cultura do cacaueteiro a proteína TcCYS4 atua na virulência de *Moniliophthora perniciosa* (vassoura-de-bruxa) e temperaturas mais altas promovem redução na sua atividade, havendo, assim, diminuição na intensidade dos sintomas da doença.

Em trabalhos com outras espécies de *Colletotrichum* são citados resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Segundo Dias et al. (2005), a temperatura promoveu aumentos no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.), obtidos de diferentes regiões produtoras, tendo as temperaturas de máximo IVCMS obtidas presentes no intervalo sido de 22 °C a 28 °C. Já Maia et al. (2011) não verificaram diferenças de três isolados de *Colletotrichum* associados à mangueira (*Mangifera indica* L.), quanto ao crescimento micelial, em função da temperatura, entretanto, os três isolados testados foram obtidos no mesmo município. Resultados do trabalho realizado por Teramoto et al. (2013) também concordam com os dados obtidos no presente ensaio. Segundo os autores citados, isolados de *Corynespora cassicola*, agente etiológico da mancha alvo da soja, obtidos de diferentes hospedeiros e regiões tem diferenças no crescimento micelial em função da temperatura. O crescimento máximo foi obtido entre 23,3 °C a 29,5 °C.

O tempo de exposição ou potencial de inóculo pode afetar significativamente a intensidade de determinadas doenças transmitidas por sementes, como a antracnose da soja. Como *C. truncatum* é transmitido por sementes, o inóculo inicial está presente nelas, que irão disseminar o patógeno a longas distâncias. Sendo assim, estudos sobre a densidade de inóculo são importantes para se obter maior controle da antracnose, seja em situações de maior ou menor densidade de inóculo. Neste contexto, a restrição hídrica apresenta grande importância

nos estudos de patógenos transmitidos por sementes, devido à facilidade na inoculação e às possibilidades de condução dos mais variados estudos sobre o fungo citado.

No presente trabalho houve, de forma significativa, redução na germinação das sementes e aumento da incidência do fungo nelas, com o aumento no tempo de exposição. Cada isolado apresentou um comportamento diferente em relação à virulência nas sementes de soja. Ao analisar os TE_{50} s, o isolado LAPS473 apresentou maior virulência e LAPS045 a menor, sendo a diferença entre ambos de 38,7 horas. Portanto, o isolado LAPS473 reduziu em 50% a germinação das sementes em tempo menor. Isso comprova o efeito na densidade de inóculo na maior intensidade da antracnose da soja e que isolados de diferentes locais apresentam variação quanto à virulência. A redução na germinação das sementes foi causada pelo fungo, pois, na reação de PCR em tempo real, houve amplificação do DNA de *C. truncatum* apenas em amostras inoculadas, visto que as sementes apresentavam, inicialmente, germinação de 92,7%. Portanto, esta técnica apresenta precisão na detecção do fungo citado em sementes de soja.

Na literatura não são citados trabalhos conduzidos com o objetivo de diferenciar isolados de *C. truncatum* quanto à virulência, mas são citadas pesquisas com outros patógenos da soja e de outras culturas. Camera et al. (2014) verificaram diferenças entre três raças de *Cercospora sojina* em relação à severidade, ao número de lesões por folíolos e ao diâmetro das lesões da mancha olho de rã, tendo as raças 24 e 25 sido mais virulentas, quando comparadas à raça 23. As raças citadas são provenientes dos estados de Goiás, Piauí e Maranhão e, assim como os isolados de *C. truncatum* LAPS473 e LAPS045, são de estados distintos. Segundo Camera et al. (2014), a inoculação de *C. sojina* por atomização de suspensão de inóculo na concentração de $3,5 \times 10^4$ conídios por mL promoveu severidade máxima da mancha olho de rã. De acordo com Rocha et al. (2014), o aumento no tempo de exposição de sementes de soja a *Aspergillus ochraceus* promoveu redução significativa no índice de velocidade de emergência (IVE), em comparação com a testemunha sem inoculação e o tratamento fungicida.

Em trabalhos com a cultura do algodão, da cevada e do trigo também é citado o mesmo efeito encontrado neste estudo. Araújo et al. (2006) observaram aumento na severidade da ramulose do algodoeiro com o aumento do tempo de exposição de 36 para 108 horas. De acordo com Barba et al. (2004), o aumento na densidade de inóculo de *Bipolaris sorokiniana* em folhas de cevada promove aumento na severidade da mancha marrom, sendo a concentração de inóculo ideal próxima de $1,5 \times 10^4$ conídios por mL. Farias et al. (2010)

verificaram menor germinação de sementes de trigo com o aumento no tempo de exposição destas a *Bipolaris sorokiniana*.

Neste estudo, foi desenvolvida uma metodologia de diagnóstico baseada em PCR utilizando *primers* específicos obtidos a partir da região gênica GAPDH para o agente causal da antracnose em soja, *C. truncatum*. Esses *primers* específicos podem ser úteis na detecção do patógeno em sementes de soja em análises de PCR em tempo real ou Nested-PCR, podendo prevenir a disseminação do patógeno a longas distâncias por meio de sementes contaminadas.

No ensaio de qPCR, a técnica demonstrou-se eficiente para detectar *C. truncatum* em sementes de soja e de distingui-lo de outros patógenos que estão associados às sementes. A especificidade do *primers* foi evidenciada pelo pico único obtido na curva de Melting.

O desenvolvimento de metodologias utilizando técnicas rápidas, precisas e sensíveis de detecção de patógenos em sementes já vem ocorrendo há algum tempo. Em soja, Ramiro (2015) buscou desenvolver uma metodologia eficiente de detecção molecular de fungos fitopatogênicos em sementes e, para isso, desenhou *primers* específicos para *C. truncatum* e outros patógenos, como *Corynerspora cassiicola* e *Phomopsis*, a partir da região gênica ITS. Porém, os *primers* desenhados para *C. truncatum* demonstraram inespecificidade, amplificando outras espécies patogênicas à soja.

Portanto, a temperatura e o tempo de exposição ou densidade de inóculo podem afetar de forma direta a infecção de *C. truncatum* em sementes de soja e isolados de diferentes locais devem ser testados quanto a este comportamento, quando forem conduzidos ensaios com cultivares ou produtos de tratamento de sementes, visando obter um nível máximo de infecção e maior confiabilidade nos resultados obtidos. Sempre que se for formar uma lavoura, deve-se levar em conta o nível de inóculo nas sementes. Assim, o risco de perda na produtividade é menor. A detecção do patógeno obtida por qPCR é precisa e deve ser usada para este fim.

Conclusões

A temperatura proporcionou efeito significativo no crescimento micelial de isolados de *C. truncatum* provenientes de diferentes regiões do Brasil e estes, quando crescidos na sua temperatura ideal, são virulentos em sementes de soja.

O aumento no tempo de exposição das sementes ao fungo promoveu, de forma significativa, aumento na incidência de *C. truncatum* e redução na germinação das sementes. O isolado LAPS473 foi o mais virulento, por ter o menor TE₅₀, de 27,8 horas e deve ser utilizado em testes com produtos ou cultivares.

Os *primers* desenhados apresentaram especificidade a *C. truncatum* e a reação de PCR em tempo real apresentou precisão na detecção deste fungo em sementes de soja.

Referências bibliográficas

Araújo, D. V.; Pozza, E. A.; Machado, J. C.; Zambenedetti, E. B.; Celano, F. A. O.; Carvalho, E. M. & Camargos, V. N.. 2006. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Fitopatologia Brasileira, 31: 035-040.

Auyong, A. S. M.; Ford, R.; Taylor, P. W. J.. 2015. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology and Microbiology**. 6: 1 – 11.

Barba, J. T.; Reis, E. M.; Forcelini, C. A.. 2004. Efeito do substrato na morfologia de conídios de *Bipolaris sorokiniana* e da densidade de inóculo na intensidade da mancha marrom em cevada. **Fitopatologia Brasileira**, 29: 5-10.

BRASIL.. 2009. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 395p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento - http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_42_03_boletim_graos_setembro_2015.pdf - Acesso em 28/10/2015 11:11h.

Camera, J. N.; Deuner, C. C.; Reis, E. M.. 2012. Diferentes concentrações do inóculo de *Cercospora sojina* na intensidade da mancha foliar "olho-de-rã" em soja. **Summa Phytopathologica**, 38: 235-238.

Camera, J. N.; Deuner, C. C.; Reis, E. M.. 2014. Agressividade de três raças de *Cercospora sojina* em folhas de soja. **Revista Ceres**, 61: 434-438.

Capote, N.; Pastrana, A. M.; Aguado A.; Sánchez-Torres, P. 2012. Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance, **Plant Pathology**, 151 – 202. Dr. Christian Joseph Cumagun (Ed.), ISBN: 978-953-51-0489-6, In Tech.

Cardoso, T. H. S.; Freitas, A. C. O.; Andrade, B. S.; Sousa, A. O.; Santiago, A. S.; Koop, D. M.; Gramacho, K. P.; Alvim, F. C.; Michelli, F.; Pirovani, C. P.. 2015. TcCYPR04, a Cacao Papain-Like Cysteine-Protease Detected in Senescent and Necrotic Tissues Interacts with a Cystatin TcCYS4. **Plos One**, 10, 1-20.

Chen, S.; Tong, X.; Woodward, R. W.; Guocheng, D.; Chen, J.. 2008. Identification and characterization of bacterial cutinase. **Journal of Biological Chemistry**, 38: 25854–25852.

Damm, U.; Woudenberg, J. H. C.; Cannon, P. F.; Crous, P.W.. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, 39: 45-87.

Dias, M. B.; Pozza, E. A.; Abreu, M. S.; Miranda, E. O.. 2005. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L.. **Ciência e Agrotecnologia**, 29: 545-552.

Farias, C. R. J.; Del Ponte, E.; Correa, C. L.; Afonso, A. P.; Piebom, C. R.. 2010. Infecção de sementes de trigo com *Bipolaris sorokiniana* pela técnica de restrição hídrica. **Tropical Plant Pathology**, 35: 253-257.

Galli, J. A.; Panizzi, R. C.; Vieira R. D.. 2007. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74: 163-165.

Luck, J.; Spackman, M.; Freeman, A.; Trebicki, P.; Griffiths, W.; Finlay, K.; Chakraborty, S. 2011. Climate change and diseases of food crops. **Plant Pathology**, 60: 113-121.

Machado, J. C.; Oliveira, J. A.; Vieira, M. G. G. C.; Alves, M. C.. 2001. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, 23: 95:101.

Maguire, J. D.. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2: 176- 177.

Peel, M. C.; Finlayson, B. L.; McMahon, T. A.. 2007. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions, Copernicus Publications**, 11: 1633-1644.

Pereira, C. E.; Oliveira, J. A.; Rosa, M. C. M.; Oliveira, G. E.; Costa Neto, J.. 2009. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, 39: 2390-2395.

Petter, F. A.; Silva, J. A.; Pacheco, L. P.; Almeida, F. A.; Alcântara Neto, F.; Zuffo, A. M.; Lima, L. B. 2012. Desempenho agrônômico da soja a doses e épocas de aplicação de potássio no cerrado piauiense. **Revista de Ciências Agrárias**, 55: 172-179.

Ramos, A. M.; Gally, M.; García, M. C.; Levin, L.. 2010. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 27: 186-190.

Ramiro, J. **Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja**. Dissertação. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 88 p., 2015.

Rocha, F. S.; Catão, H. C. R. M.; Brandão, A. A.; Gomes, L. A. A.. 2014. Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja. **Semina Ciências Agrárias**, 35: 2895-2904.

Silva, A. C.; Souza, P. E.; Machado, J. C.; Silva, B. M.; Pinto, J. E. B. P.. 2012. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Topical Plant Pathology**, 37: 305-313.

Sousa, M. V.; Machado, J. C.; Simmons, H. E.; Munkvold, G. P.. 2014. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (Common bean) seeds. **Plant Pathology**, 63: 1-11.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S.. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.

Terramoto, A.; Parisi, M. C. M.; Cunha, M. G.. 2013. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassicola*. **Tropical Plant Pathology**, 38: 313-322.

Torres-Calzada, C.; Tapia-Tussell, R.; Higuera-Ciapara, I.; Martin-Mex, R.; Nexticapan-Garcez, A.; Perez-Brito, D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. **Plant Disease**, 99: 159-1595.

Yang, H.; Hartman, G. L.. 2015. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**. 99: 143-148.

ARTIGO 2

Fosfitos no manejo da antracnose em sementes de soja e caracterização dos mecanismos de ação por indução de resistência e toxidez direta

Manoel Batista da Silva Júnior¹; Mário Lúcio Vilela de Resende¹; Edson Ampélio Pozza¹; Alexandre Ribeiro Maia de Resende¹; Gustavo César Dias Silveira¹; André Costa da Silva²

Resumo

A soja é a principal cultura de grãos do Brasil. Dentre os fatores que causam perdas na produção destacam-se as doenças e, dentre elas, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*. Em condições favoráveis, as perdas podem atingir 100% no plantio, devido à redução da germinação das sementes. Dentre as fontes alternativas para o manejo de doenças de plantas destacam-se os fosfitos, que podem atuar por nutrição e indução de resistência no hospedeiro e por toxidez direta ao patógeno. Sendo assim, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito de formulações comerciais de fosfitos de Cu, K, Mn e Zn no manejo da antracnose em sementes de soja e caracterizar o modo de ação desses produtos por indução de resistência e toxidez direta. Foram utilizadas no ensaio sementes da cultivar TMG 1176 RR, susceptível à antracnose, obtidas junto à Fundação MT. O isolado fúngico utilizado foi o LAPS473, obtido junto ao Laboratório de Análise e Patologia de Sementes da UFLA. As sementes foram inoculadas pela técnica da restrição hídrica e tratadas com os produtos em sacos plásticos. Os fosfitos foram comparados com duas testemunhas, sendo uma inoculada e a outra não, e com um fungicida comercial (carbendazim + thiram). Após tratadas, as sementes foram submetidas aos testes de germinação em rolo de papel, sanidade (*blotter-test*) e vigor (emergência em areia). Foram avaliadas as variáveis germinação, incidência de *C. truncatum*, índice de velocidade de emergência, estande inicial e final, altura e comprimento de raízes, e peso seco da parte aérea e de raízes. Sementes foram inoculadas e tratadas com os fosfitos que proporcionaram controle da doença, e submetidas ao teste de germinação em rolo de papel para avaliação da atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) e do teor de lignina e fenóis solúveis totais. As enzimas foram avaliadas as 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a incubação e a lignina e os fenóis, às 192 horas. Com base na atividade de cada enzima foi calculada a área abaixo da curva de progresso da atividade (AACPACat, AACPAPOx e AACPASod). Para o teste de toxidez direta, os produtos foram misturados ao meio BDA fundente na dose utilizada; 2x a dose; ½ da dose e ¼ da dose. O meio foi, então, vertido em placas de Petri e foram depositados no seu centro disco de micélio do fungo com 0,5 cm de diâmetro. Foi avaliado diariamente o diâmetro da colônia e calculado o IVCm. As análises estatísticas foram realizadas no software R 3.1.3. Os fosfitos de Mn e Zn testados promoveram controle de *C. truncatum* e promoveram incrementos significativos no vigor e na germinação das sementes de soja com mesmo efeito do fungicida comercial. O fosfito de Mn aumentou significativamente a AACPACat e a AACPAPOx em relação à testemunha e promoveu incremento significativo na lignina. O fosfito de zinco aumentou significativamente a AACPACat. Não houve diferença significativa para o teor de fenóis e na AACPASod. Ambos os fosfitos foram diretamente tóxicos a *C. truncatum*. Os fosfitos de Zn e Mn testados foram eficazes no controle da antracnose em sementes de soja e atuam por toxidez direta ao patógeno e indução de resistência.

Palavras-Chave: Controle alternativo, *Colletotrichum truncatum*, Tratamento de sementes, *Glycine max* L.

Introdução

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo, social e economicamente. Os Estados Unidos ocupam a liderança na produção e o Brasil é o segundo maior produtor. Em 2013 esta cultura foi responsável por 26% das exportações brasileiras no agronegócio, totalizando 23 bilhões de dólares (OCDE – FAO, 2015). A produção brasileira cresce a cada safra. No ano agrícola 2016/2017 a produção foi de 114 milhões de toneladas, com área plantada de 34 milhões de hectares (CONAB, 2015).

As doenças se destacam por causar perdas significativas nesta cultura. A antracnose é uma das principais, por afetar todos os estádios fenológicos da soja. Ela é causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* e os principais sintomas são podridão de sementes, lesões deprimidas e escuras nas folhas e hastes e deiscência de vagens antes da colheita. As perdas podem chegar a 100%, em condições de umidade e temperatura favoráveis ao patógeno durante o plantio devido à significativa redução na germinação das sementes (Galli et al., 2007; Silva et al., 2012).

O manejo dessa doença é realizado mediante tratamento de sementes ou resistência genética (Pereira et al., 2009; Yang & Hartman, 2015). Entretanto, não são conhecidas cultivares altamente resistentes no Brasil. Assim, o controle químico é a forma mais comumente utilizada para este fim, tanto pela facilidade de aplicação, quanto pelo efeito rápido. Porém, o uso intensivo de fungicidas pode causar o desenvolvimento de resistência do patógeno ao ingrediente ativo, toxidez a humanos, danos a organismos benéficos, poluição do ambiente e redução na viabilidade de *Bradyrhizobium* com consequente dano na nodulação (Begum et al., 2010). Assim, novas alternativas de controle desta doença devem ser testadas.

Dentre os produtos alternativos disponíveis no mercado destacam-se os fosfitos. Estes produtos são obtidos por reação do ácido fosforoso com uma base (K^+ , Ca^{2+} , etc.) e podem atuar na nutrição e na indução de resistência no hospedeiro e na toxidez direta ao patógeno (Dalio et al., 2012). Além disso, os fosfitos podem ser translocados na planta via xilema e floema, e, devido à translocação descendente, têm sido largamente utilizados no manejo de patógenos radiculares, principalmente espécies de *Phytophthora* (Groves et al., 2014). Outra característica importante dos fosfitos é o custo reduzido, quando comparado ao dos fungicidas químicos (Buffara et al., 2013).

Não são encontrados na literatura trabalhos relacionados ao tratamento de sementes de soja com fosfitos para o controle da antracnose. Em alguns trabalhos foi demonstrada a eficiência dos fosfitos no manejo de patógenos de outras culturas e outros patógenos da soja. Em soja, Simonetti et al. (2015) estudaram o efeito da associação de um isolado de

Pseudomonas fluorescens com uma formulação de fosfito de manganês. Essa associação promoveu controle da podridão carvão (*Macrophomina phaseolina*). Tambascio et al. (2014) verificaram que uma formulação de fosfito de potássio aplicado no sulco de plantio em tubérculos de batata semente (*Solanum tuberosum*) aumentou a emergência, a área foliar e a matéria fresca das plantas. Segundo Lobato et al. (2008), sementes de batata inoculadas com *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* e tratadas com fosfitos de cálcio e potássio têm maior emergência, quando comparadas com sementes inoculadas e não tratadas. De acordo com Abbasi & Lazarovits (2006), o tratamento de sementes de pepino com uma formulação de fosfonato (molécula análoga aos fosfitos) reduz a incidência do tombamento (*damping-off*) por *Phytophthora* nas plântulas emergidas. Observou-se, em campo, um estande de 63% das plantas oriundas de sementes tratadas com fosfonato, enquanto, na ausência de tratamento, observou-se estande de 18%. Borin et al. (2017) verificaram que a associação de fosfito de potássio com o fungicida carbendazim + thiram foi eficaz no controle de patógenos em sementes de milho.

Sendo assim, os objetivos, com a realização do presente estudo foram avaliar o efeito de quatro formulações comerciais de fosfitos de cobre, manganês, potássio e zinco no manejo da antracnose em sementes de soja e caracterizar o seu modo de ação quanto à ativação dos mecanismos de defesa e à toxidez direta ao fungo *C. truncatum*.

Material e Métodos

Material vegetal, fúngico e condições experimentais

Foram utilizadas no ensaio sementes de soja da cultivar TMG 1176 RR, obtidas junto à Fundação Mato Grosso. O isolado de *C. truncatum* LAPS-473 foi obtido junto ao Laboratório de Análise e Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A partir da colônia foi obtida uma cultura monospórica que foi utilizada em todo o ensaio.

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Obtenção dos fosfitos e do fungicida

Foram utilizadas quatro formulações comerciais de fosfitos obtidos diretamente dos fabricantes (Tabela 1), sendo Reforce Cu[®] (fosfito de cobre; 4% Mn + 20,3% P₂O₅), Reforce Mn[®] (fosfito de manganês; 10% Mn + 51,5% P₂O₅), Reforce Zn[®] (fosfito de zinco; 10 % Zn + 34% P₂O₅) e Yantra[®] (fosfito de potássio; 29% K₂O + 33,6% P₂O₅), adquiridos da Agrichem do Brasil. Foi também utilizado como comparativo um fungicida padrão registrado

no manejo deste patógeno, o Protreat[®] (carbendazim + thiram), obtido da Novozymes BioAq Produtos para Agricultura Ltda.

Tabela 1 - Nome comercial, ingrediente ativo e doses dos produtos utilizados no ensaio.

Nome Comercial	Especificação	Doses (mL 100 kg ⁻¹ sementes*)
Testemunha inoculada	---	---
Testemunha não inoculada	---	---
Protreat [®]	Fungicida	200
Reforce Cu [®]	Fosfito de cobre	250
Reforce Mn [®]	Fosfito de manganês	500
Reforce Zn [®]	Fosfito de zinco	500
Yantra [®]	Fosfito de potássio	500

*mL 100 kg⁻¹sementes: mililitros de produto comercial por cem quilos de semente.

Inoculação e tratamento das sementes

As sementes de soja foram inoculadas pelo método da restrição hídrica (Machado et al., 2001). Para tanto, foi preparado o meio de cultivo BDA a um potencial osmótico de -1,0 MPa, valor obtido pela adição de manitol (restritor hídrico) e indicado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995) que foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Foram, então, adicionados três discos de micélio nas placas que foram incubadas em B OD, com fotoperíodo de 12 horas, a 27 °C, até o fungo crescer uniforme em toda a placa. Em seguida, sementes de soja foram depositadas em contato com a colônia fúngica por 28 horas.

Para o tratamento com os produtos as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos de 1 L de volume. Os fosfitos e o fungicida foram pipetados sobre as sementes e, em seguida, o saco plástico foi fechado e agitado, por 2 minutos, para distribuição uniforme dos produtos na semente. Nas testemunhas foi pipetada água.

Fosfitos na germinação, sanidade e emergência de sementes de soja inoculadas com *C. truncatum*

Após a inoculação e o tratamento as sementes foram submetidas aos testes de germinação em rolo de papel, sanidade (*blotter-test*) e emergência em bandeja com areia, conforme recomendação das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) e do Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009).

No teste de germinação em rolo de papel foi determinado o número de plântulas normais, anormais, mortas e infectadas. No teste de sanidade foi determinada a incidência do fungo nas sementes. No teste de emergência foram determinados o índice de velocidade de

emergência (Maguire, 1962), os estandes inicial e final, a altura das plantas, o comprimento de raízes e o peso seco da parte aérea e de raízes. Para o estande inicial foi determinado o percentual de plantas emergidas aos sete dias e, para o final, a emergência aos 14 dias. Aos 28 dias, as plantas foram cortadas à altura do coleto. As raízes foram separadas da parte aérea e mensurados o comprimento e a altura. Em seguida, o material foi seco em estufa, a 60 °C, até atingir peso constante, sendo então mensurado o peso seco da parte aérea e de raízes.

Fosfitos na ativação dos mecanismos bioquímicos de plântulas de soja e na toxidez direta a *C. truncatum*

Os fosfitos que promoveram controle da antracnose nas sementes de soja foram submetidos a experimento bioquímico e de toxidez direta.

Para o experimento bioquímico as sementes foram inoculadas e tratadas como descrito anteriormente. Em seguida, elas foram submetidas ao teste de germinação em rolo de papel, sendo cada rolo de papel preenchido com 25 sementes, para que as raízes não ficassem enoveladas. Foram, então, realizadas coletas do material às 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a incubação. O material vegetal foi coletado, envolvido com papel alumínio e armazenado em freezer, a -80 °C, até o início das análises.

Para o preparo dos extratos, 3,0 g material vegetal de cada amostra foram macerados separadamente em nitrogênio líquido e 0,5 g do pó macerado foram depositados em microtubos de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Para as amostras de lignina foram separados e acondicionados em vidros de penicilina 30 mg do pó macerado. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 g, a 4 °C, por 15 minutos, e os sobrenadantes separados e utilizados para as análises enzimáticas.

A quantificação da proteína total foi realizada segundo Bradford (1976), ajustada para microquantidades. Placas de 96 poços receberam 10 µL da amostra, 20 µL do tampão de extração e 170 µL do reagente de Bradford. Foi feita a leitura das microplacas a 595 nm. A curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina (BSA) entre 0 e 100 µg e os resultados foram correspondentes à média de três replicatas.

A atividade da peroxidase (POX) foi avaliada conforme metodologia de Urbanek et al. (1991), pela oxidação do guaiacol em microplacas com 96 cavidades. A mistura de reação foi composta por 30 µL da amostra, 20 µL de guaiacol 50 mM, 20 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 125 mM e 130 µL do tampão de extração. A absorbância foi mensurada a 480 nm e o

coeficiente de extinção molar de $1,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da POX (Chance & Maehley, 1955).

A catalase (CAT) foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, por 3 minutos, a 25 °C, em microplacas com 96 cavidades. Foram adicionados 10 μL do extrato enzimático, 60 μL de água, 100 μL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0 e 20 μL de H_2O_2 250 mM. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o cálculo da atividade desta enzima (Havir & McHale, 1987).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima de inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme Giannopolitis & Ries (1977), em microplacas com 96 cavidades. A reação foi composta por 10 μL do extrato enzimático 31 μL de água, 2 μL de riboflavina 0,2 mM, 2 μL de EDTA 10 μM , metionina 70 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8 e 15 μL de NBT 1 mM. As placas foram incubadas por 7 minutos em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30W. Em seguida, a leitura foi realizada a 560 nm e a unidade da enzima correspondeu à sua capacidade de inibir em 50% a fotoredução do NBT.

Com base na atividade das enzimas CAT, POX e SOD foi calculada a área abaixo da curva de progresso de atividade da CAT (AACPA_{Cat}), da POX (AACPA_{Pox}) e da SOD (AACPA_{Sod}), com base em metodologia de Shanner & Finey (1977).

A lignina foi determinada pela dissolução de 30 mg do material vegetal em ácido tioglicólico e HCl, conforme metodologia de Doster e Bostock (1988). A leitura foi realizada a 280 nm e o valor expresso em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de matéria seca. A avaliação do teor de fenóis solúveis totais foi realizada conforme metodologia de Spanos & Wrolstad (1990). A leitura foi realizada a 725 nm e a quantidade expressa em $\mu\text{L mg}^{-1}$ de matéria seca.

O teste de toxidez direta foi avaliado conforme metodologia de Araújo et al. (2010). Para tanto, o fungo foi crescido em meio de cultivo BDA para a obtenção do micélio. Os fosfitos selecionados foram adicionados ao meio de cultura BDA fundente na dose utilizada no ensaio, 2x a dose, $\frac{1}{2}$ da dose e $\frac{1}{4}$ da dose comparados com o fungicida na sua dose comercial e uma testemunha. Após a solidificação do meio de cultura foram depositados no centro das placas discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro. Foram, então, realizadas avaliações diárias dos dois diâmetros ortogonais na placa. Com base no diâmetro médio da colônia foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e, com base no IVCM, foi calculada a DL_{50} dos produtos, de acordo com metodologia de Torrez-Calzada et al. (2015).

Análises estatísticas

Para avaliação dos pressupostos da análise de variância os resíduos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, em caso de significância, os dados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Para aceitar ou rejeitar H_0 os dados foram submetidos ao teste F e, em caso de significância, foi realizada análise de regressão ou teste de médias, para diferenciar os tratamentos. Nos testes de germinação em rolo de papel, sanidade e vigor foi utilizado o teste de Scott-Knott. Nos ensaios com as enzimas, fenóis e lignina foi utilizado o teste de Tukey e, no ensaio *in vitro*, foi realizada análise de regressão do IVCM do fungo, em função das doses dos fosfitos e teste de Dunnet para comparar as doses dos fosfitos ao fungicida comercial.

Resultados

Todos os tratamentos diferiram da testemunha inoculada em relação à germinação das sementes em rolo de papel. O lote de sementes teve germinação inicial de 85,5%. Os fosfitos de potássio e cobre apresentaram valores de germinação intermediários e foram inferiores aos dos outros tratamentos. Os fosfitos de manganês e zinco apresentaram germinação semelhante à do fungicida e à da testemunha não inoculada. Para a incidência, todos os tratamentos diferiram da testemunha inoculada. O lote de sementes apresentou incidência natural de 4,5% de *C. truncatum*. Os fosfitos de cobre e potássio apresentaram controles intermediários da incidência e foram inferiores aos demais tratamentos. Os fosfitos de manganês e zinco se agruparam junto ao fungicida e foram inferiores à testemunha não inoculada (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos na germinação e sanidade de sementes de soja inoculadas com *C. truncatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Scott-Knott.

Tratamento	Germinação (%)	Incidência (%)	Controle da incidência (%)
Testemunha inoculada	25,50d	96,50e	0
Testemunha não inoculada	85,50a	4,50a	95
Fungicida	83,50a	27,00b	72
Fosfito de cobre	69,00b	70,00d	27
Fosfito de manganês	81,00a	29,50b	69
Fosfito de potássio	59,33c	49,00c	49
Fosfito de zinco	85,00a	33,50b	65
Coeficiente de variação (%)	8,57	11,47	

No teste de vigor observou-se que todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha inoculada em todas as variáveis avaliadas. Para o IVE, estande final, comprimento e peso seco de raízes os fosfitos de manganês e zinco foram semelhantes ao do

fungicida e inferiores apenas ao da testemunha não inoculada, exceto para o comprimento de raízes. Em relação ao estande inicial, o fosfito de zinco apresentou valor similar ao do fungicida e inferior ao da testemunha não inoculada. Para a altura, todos os tratamentos, exceto o fosfito de cobre, foram superiores à testemunha não inoculada. Já para o peso seco da parte aérea, todos os tratamentos, exceto o fosfito de cobre, foram semelhantes à testemunha não inoculada (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito dos tratamentos no vigor de sementes de soja inoculadas com *C. truncatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a de 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Scott-Knott.

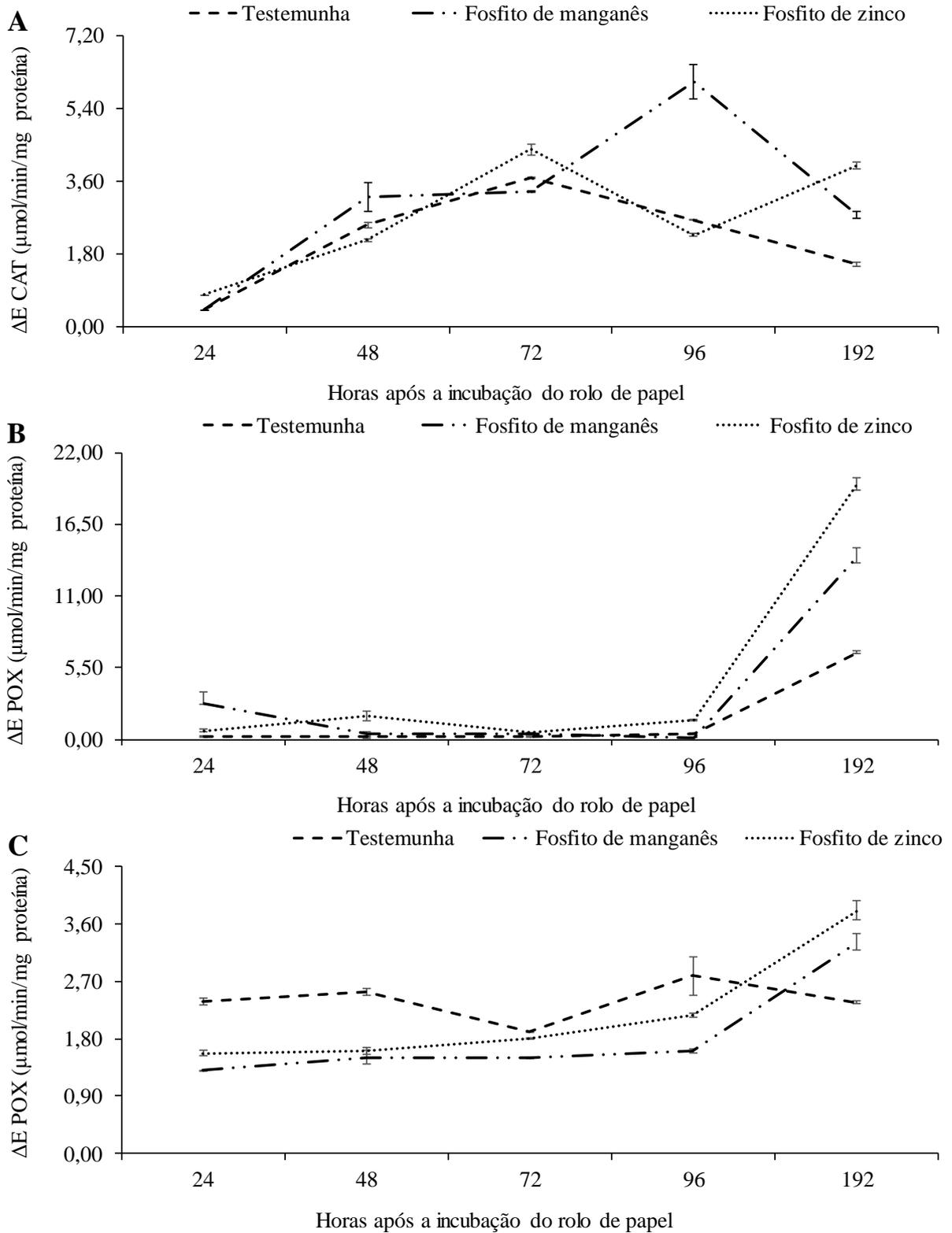
Tratamento	IVE*	EI* (%)	EF* (%)	ALT* (cm)	CR* (cm)	PSPA* (g)	PSR* (g)
Testemunha inoculada	21,57d	35,25e	34,00e	24,32c	20,42c	2,92c	1,70d
Testemunha não inoculada	65,76a	93,00a	95,00a	28,90b	32,82a	7,59a	5,17a
Fungicida	45,90b	71,00b	76,75b	30,30a	30,21a	6,52a	3,81b
Fosfito de cobre	33,36c	51,50d	55,00d	28,68b	25,00b	4,69b	2,68c
Fosfito de manganês	44,09b	62,50c	80,25b	30,59a	30,21a	6,85a	4,19b
Fosfito de potássio	39,00c	60,00c	64,00c	30,25a	24,41b	5,87a	2,38c
Fosfito de zinco	47,75b	75,75b	80,00b	31,94a	30,52a	7,05a	3,74b
Coefficiente de variação (%)	9,07	9,36	8,56	4,21	8,16	11,5	15,51

*IVE: índice de velocidade de emergência; EI: estande inicial aos sete dias; EF: estande final aos 14 dias; ALT: altura aos 28 dias; CR: comprimento de raízes aos 28 dias; PSPA: peso seco da parte aérea aos 28 dias; PSR: peso seco de raízes aos 28 dias.

Com base nos resultados, os fosfitos de manganês e de zinco foram os que promoveram maior controle da antracnose em sementes de soja e seu mecanismo de ação foi caracterizado quanto à ativação das enzimas CAT, POX e SOD e nos teores de lignina e fenóis solúveis totais e na toxidez direta ao fungo *C. truncatum*.

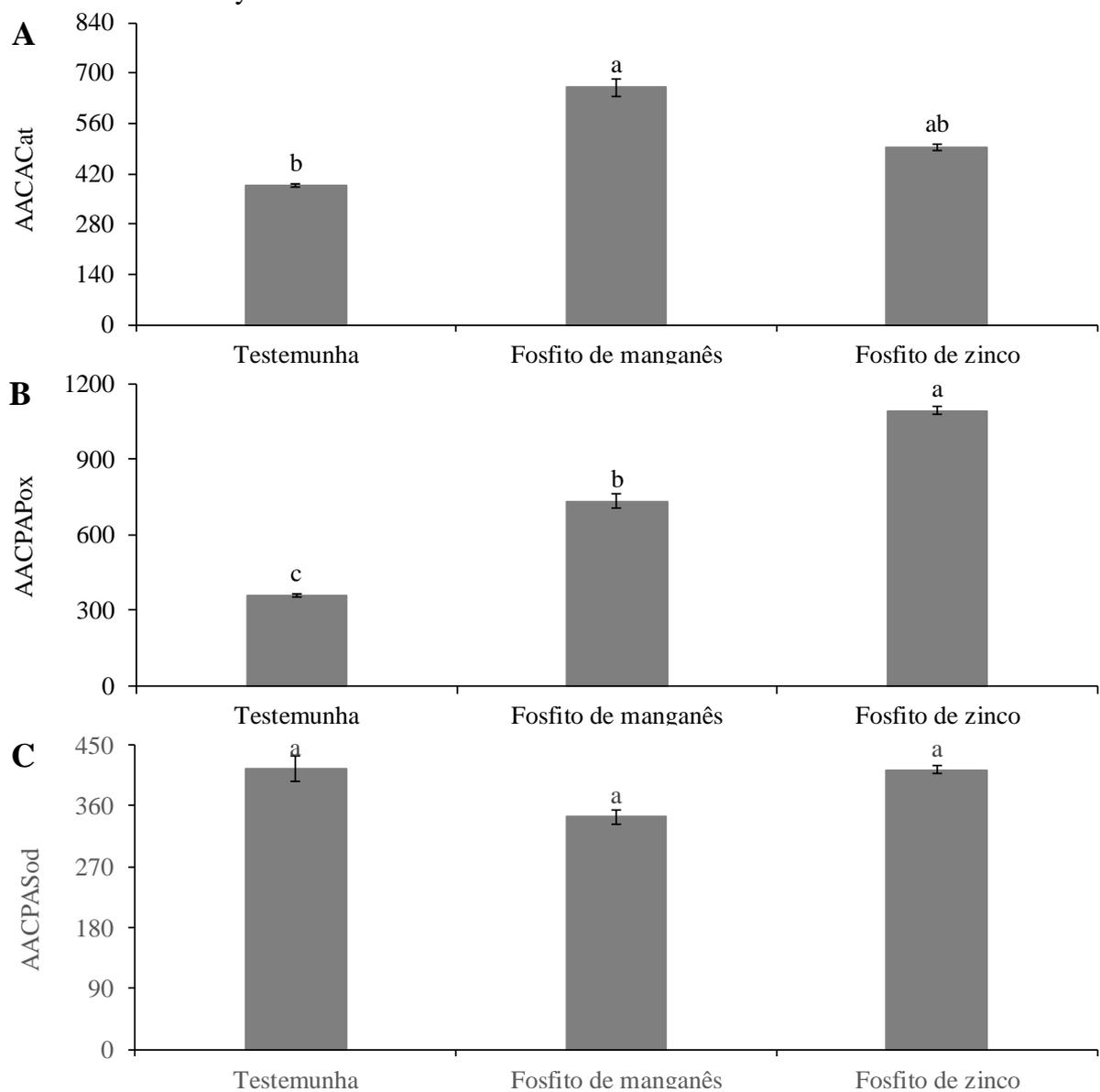
Ambos os fosfitos promoveram aumentos nas atividades das três enzimas testadas, sendo mais eficazes na ativação da CAT e da POX. A CAT atingiu seu pico de atividade às 96 horas, a POX às 192 horas e a SOD às 192 horas após a incubação dos rolos de papel (Figura 1).

Figura 1 - Efeito dos tratamentos na atividade da CAT (A), POX (B) e SOD (C), ao longo do tempo.



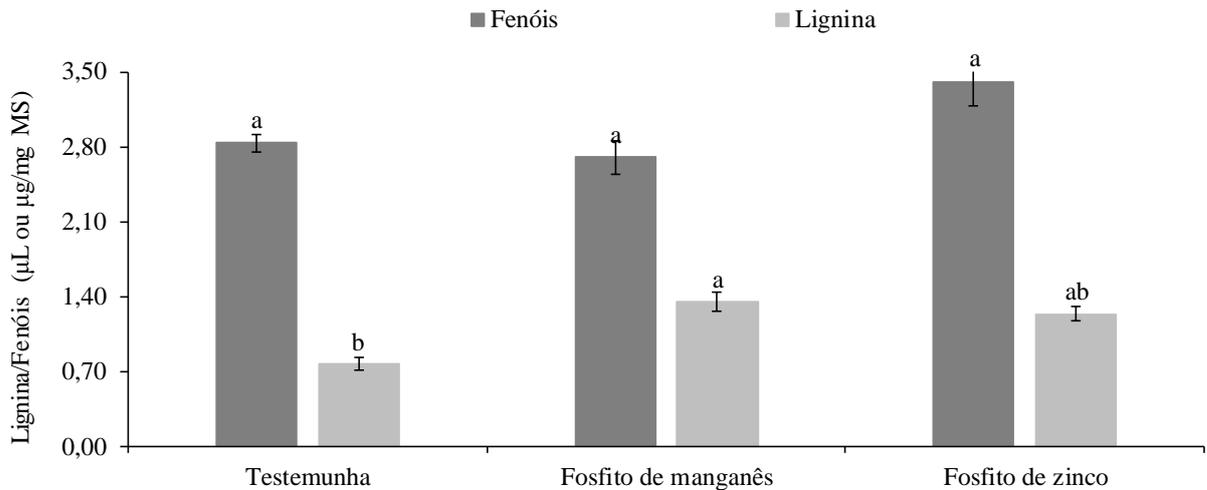
Não houve diferença significativa entre os fosfitos de manganês e zinco para a AACPASod (Figura 2C). Para a AACPACat, o fosfito de manganês diferiu da testemunha, enquanto o fosfito de zinco não. Já em relação à AACPAPox, ambos os fosfitos diferiram significativamente da testemunha, porém, o fosfito de zinco foi superior ao de manganês (Figura 2).

Figura 2 - Efeitos dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da catalase (AACPACat), peroxidase (AACPAPox) e superóxido dismutase (AACPASod). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.



Em relação ao teor de fenóis solúveis totais não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para o teor de lignina solúvel o fosfito de zinco não diferiu significativamente da testemunha. Já o fosfito de manganês diferiu da testemunha e proporcionou incremento significativo na lignina (Figura 3).

Figura 3 - Efeito dos tratamentos no teor de fenóis solúveis totais e lignina solúvel. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.



No teste *in vitro* verificou-se que os fosfitos de zinco e manganês reduziram o crescimento micelial de *C. truncatum* com o aumento nas suas doses (Figura 3), sendo, assim, diretamente tóxico ao fungo. A dose letal que inibiu 50% do crescimento micelial (DL_{50}) e a concentração de máxima inibição do crescimento micelial (CMI) de cada produto estão descritas na Tabela 4. A dose comercial dos fosfitos aplicados nas sementes foi convertida para mL/L e equivaliu a 5 mL/L. No teste de Dunnet observou-se que os produtos aplicados na dose de 10 mL.L^{-1} (2x a dose usada no ensaio) apresentaram efeito fungicida e, nas demais doses, efeito fungistático (Figura 4).

Figura 3 - Efeito das doses dos fosfitos de manganês (A) e zinco (B) sobre o IVCN de *C. truncatum*.

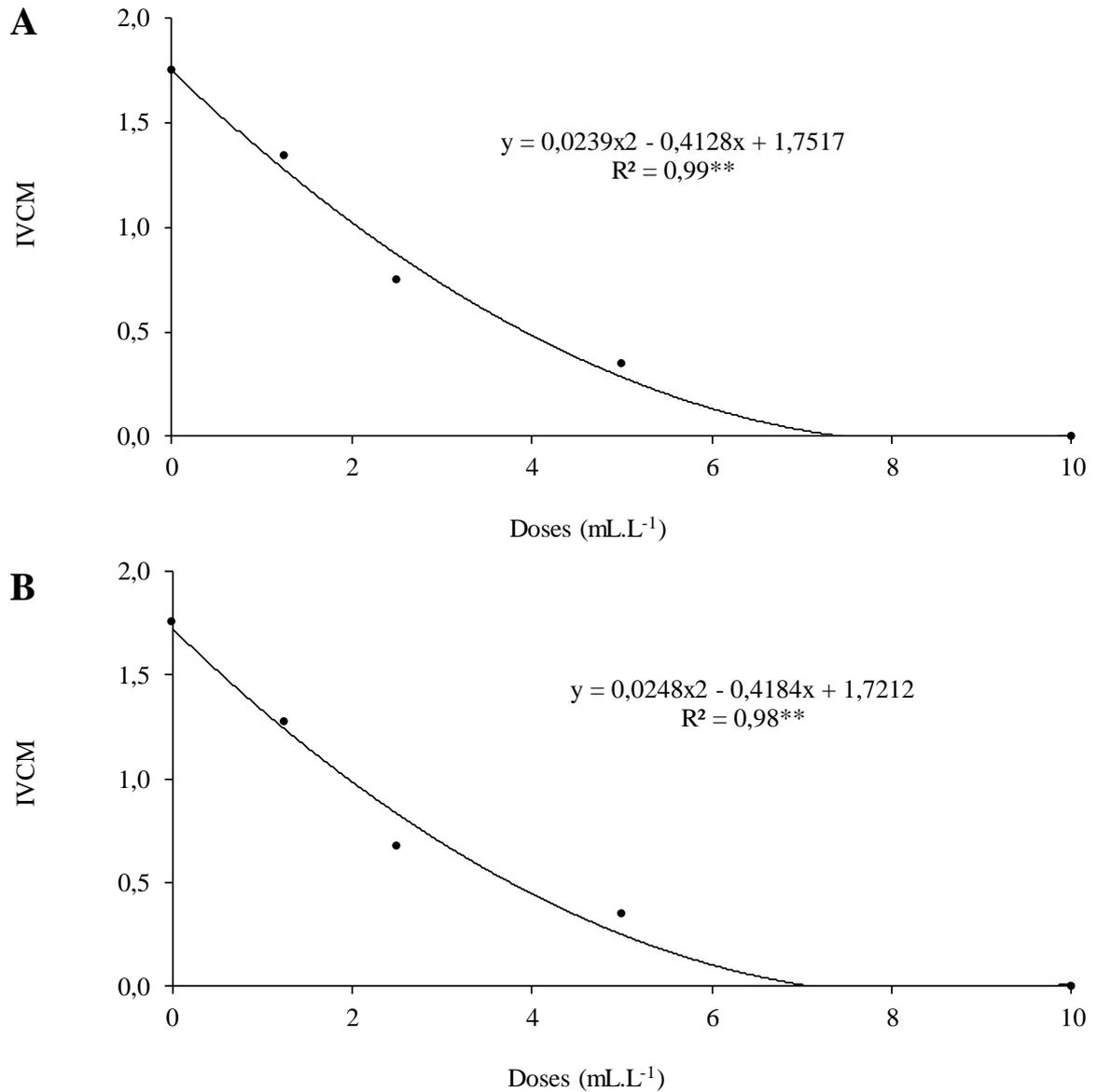
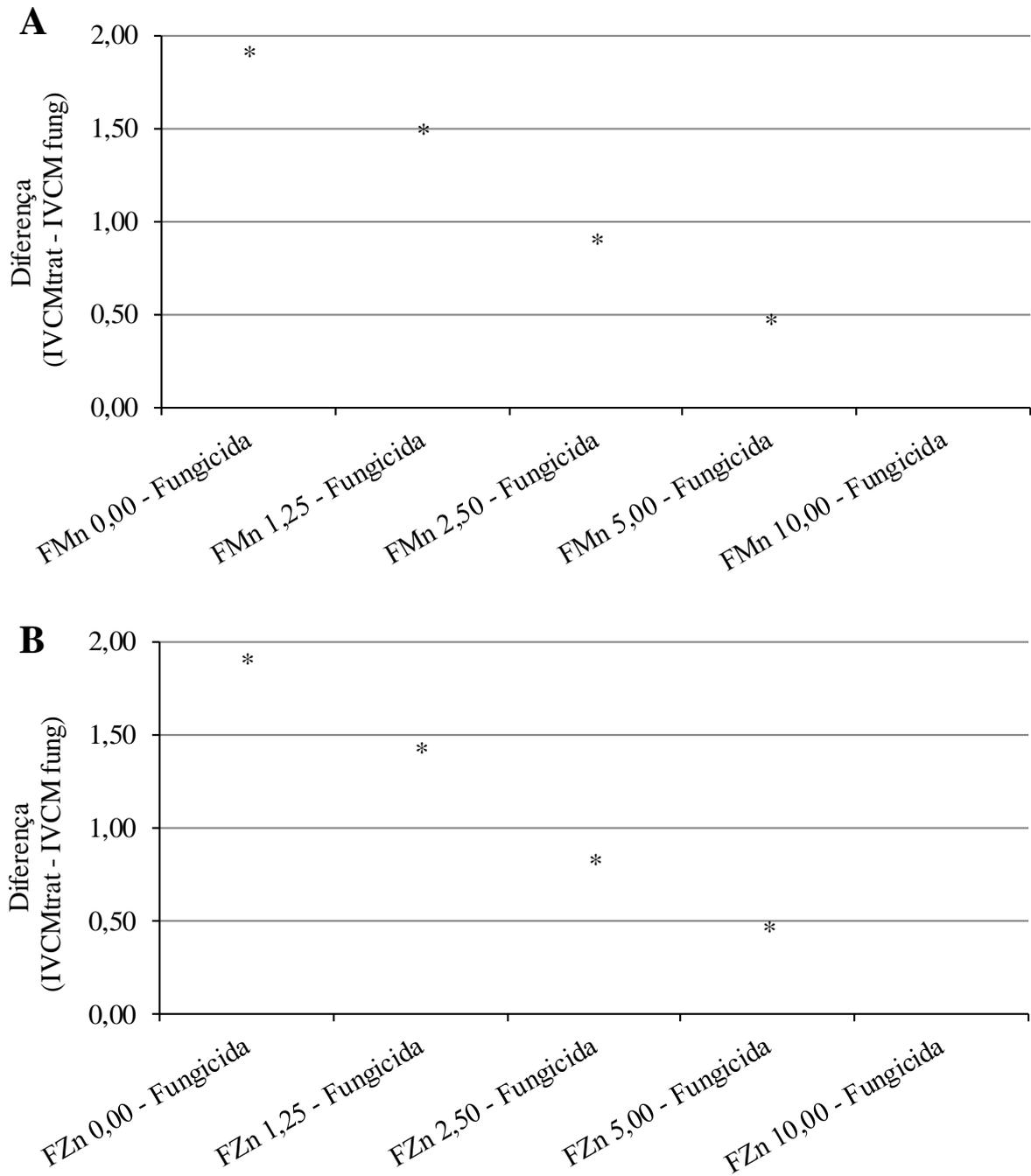


Tabela 4 - DL₅₀ e CMI para os fosfitos de manganês e zinco.

Tratamento	DL₅₀	CMI
Fosfito de manganês	2,48	8,64
Fosfito de zinco	2,35	8,44

Figura 4 - Teste de Dunnet comparando as doses testadas dos fosfitos de manganês (A) e zinco (B) com o fungicida carbendazim + thiram.



*difere significativamente, a 5% ($p \leq 0,05$).

Discussão

A antracnose sempre foi considerada uma doença secundária na soja e importante apenas em algumas regiões do país. Porém, atualmente, o panorama é outro e a doença está presente em praticamente todas as regiões produtoras do Brasil. As perdas causadas por ela têm levado os produtores a utilizarem, principalmente, o controle químico no manejo da

doença em sementes. Entretanto, o uso intensivo de fungicidas químicos na cultura da soja traz alguns efeitos negativos que podem afetar a produção, os aplicadores e o ambiente. Dentre estes efeitos destacam-se o risco de o patógeno adquirir resistência ao ingrediente ativo do fungicida, a toxidez aguda a humanos e animais, a poluição do ambiente com resíduos destes produtos e a toxidez a agentes benéficos, como agentes de controle biológicos e bactérias fixadoras, como as do gênero *Bradirrhizobium*, o que irá reduzir a nodulação (BEGUM et al., 2010). Com base no exposto, novas alternativas de controle de doenças em soja vêm sendo pesquisadas, destacando-se o uso de fertilizantes foliares, biofertilizantes, silicatos e indutores de resistência, por exemplo, entre os quais se encaixam os fosfitos.

Estes produtos vêm sendo utilizados, principalmente, no manejo de doenças foliares em soja e em outras culturas com bons resultados. No presente trabalho, os fosfitos de manganês e zinco promoveram controle da antracnose em sementes de soja, atuando por toxidez direta ao patógeno e na ativação das enzimas catalase e peroxidase, além de promover incrementos no teor de lignina solúvel. Em alguns trabalhos também foi comprovado o efeito positivo de fosfitos no manejo de patógenos em sementes. De acordo com Simonetti et al. (2015), a associação de uma formulação de fosfito de manganês com uma bactéria do gênero *Pseudomonas fluorescens* promoveu controle da podridão carvão causada por *Macrophomina phaseolina* em soja. Segundo Carmona et al. (2017), a aplicação de fosfito de manganês em sementes de soja (200 ou 400 mL.100 kg⁻¹ sementes) promoveu controle do *damping-off* causado por *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare* e *P. ultimum* em soja, com efeito superior ao do fungicida comercial fludioxonil + metalaxil. Houve emergência próxima de 97%, nas sementes tratadas e próxima de 10%, nas não tratadas. No tratamento com o fungicida houve emergência próxima de 73%. Já Puerari et al. (2013) verificaram que a aplicação de fosfito de manganês reduziu o número de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de plantas de soja.

Além da soja existem também trabalhos realizados com outras culturas. Segundo Lobato et al. (2008), a aplicação de fosfitos de cálcio e potássio promoveu controle dos fungos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora infestas* em sementes de batata e induziram a atividade de β -1,3-glucanases. Machinandiarena et al. (2012) observaram que a aplicação de fosfito de potássio promoveu incremento na produção de calose, nos teores de H₂O₂ e O²⁻ em plantas de batata. Abasi & Lazarovits (2006) avaliaram o efeito do tratamento de sementes de pepino por imersão em fosfonato, para controle do *damping-off* causado por *Pythium*. As plantas tratadas tiveram um estande de 63% e a testemunha, 18%. Monteiro et al.

(2016) verificaram que a aplicação de fosfito de manganês em mudas de cafeeiro promoveu controle de 63% na severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

A ativação das enzimas catalase e peroxidase se deve, provavelmente, ao fato de estes elementos atuarem como cofatores destas enzimas. No presente ensaio, a aplicação de fosfito de manganês promoveu aumentos na atividade da CAT e POX, além de incrementos no teor de lignina. Já o fosfito de zinco promoveu incremento significativo na atividade da POX. De acordo com Zhao et al. (2012), o acréscimo no suprimento de manganês promoveu aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, enquanto o acréscimo de zinco aumentou a atividade da peroxidase (POX) em plantas de caruru (*Phytolacca americana*), que têm a característica de acumular manganês. Já Demirevska-Kepova et al. (2004) verificaram que doses mais altas do manganês promoveram aumento significativo na atividade da catalase e da peroxidase de guaiacol em plantas de cevada. Monteiro et al. (2016) verificaram que uma formulação de fosfito de manganês induziu a atividade das enzimas acorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e polifenoloxidase (PPO) em mudas de cafeeiro inoculadas com *Hemileia vastatrix*.

Já o íon fosfito induz a transcrição de genes relacionados às rotas dos ácidos salicílico e jasmônico/etileno, indução de proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas, indução de espécies ativas de oxigênio e fortificação das barreiras naturais dos tecidos que ficam latentes. No momento da entrada do patógeno ocorre uma resposta rápida chamada “priming”, que também pode levar à produção rápida de espécies ativas de oxigênio, reação de hipersensibilidade, acúmulo de compostos fenólicos, lignina e etileno (Dalio et al., 2012). Monteiro et al. (2016) observaram aumento na expressão dos genes POX, CAT, GLU e PAL após a aplicação de uma formulação de fosfito de manganês. Todos estes genes codificam proteínas que participam da resposta de defesa das plantas. De acordo com Araújo et al. (2015), uma formulação de fosfito de potássio promoveu indução da rota dos fenilpropanoides. Esta rota metabólica regula a produção de diversos compostos do metabolismo secundário ativo na defesa das plantas contra *Ceratocystis fimbriata*, como alcaloides, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzoicos e favonoides. Estes compostos foram produzidos em maior quantidade em plantas tratadas com o fosfito, em detrimento da testemunha.

Em relação à lignina, Rengel et al. (1993) observaram que o aumento na concentração de manganês no solo induziu maior teor de lignina em plantas de trigo (*Triticum aestivum*). Estes autores correlacionaram o aumento no teor de lignina com a resistência das plantas ao fungo *Geumannomyces graminis*. De acordo com Dordas (2008), o manganês controla a

biossíntese de lignina e suberina pela ativação de inúmeras enzimas da rota do ácido chiquímico e dos fenilpropanoides, em que a peroxidase pode atuar. No presente trabalho, o manganês promoveu aumento significativo na AACPAPOX. A peroxidase catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de peróxido de hidrogênio, originando a lignina (Stangarlin et al., 2011). Portanto, o aumento na lignina está relacionado à maior atividade da POX.

Em relação à toxidez direta, ambos os fosfitos foram diretamente tóxicos a *C. truncatum*. Segundo Araújo et al. (2010), a toxidez direta dos fosfitos pode ser devido ao baixo pH desses produtos. De acordo com estes autores, a redução no pH de uma formulação de fosfito de potássio promoveu redução no diâmetro da colônia e no IVCN de *Colletotrichum gloeosporioides*. De acordo com Dalio et al. (2012), os fosfitos induzem o rompimento das paredes e membranas celulares dos patógenos e inibição no crescimento das hifas. Esses efeitos são causados por mudanças transcricionais em genes que codificam proteínas da biossíntese de compostos da parede celular, síntese de aminoácidos, metabolismo de proteínas, metabolismo energético e estresse oxidativo. Assim, ocorre o rompimento da hifa do fungo que irá liberar diversos compostos, como os padrões moleculares associados aos patógenos, ou “PAMPs”, que podem disparar a defesa. Lobato et al. (2010) verificaram que formulações de fosfitos de cálcio, potássio e cobre promoveram redução no crescimento micelial de *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Streptomyces scabies* isolados de batata. Araújo et al. (2008) observaram que o aumento nas doses de uma formulação de fosfito de potássio promoveu redução no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, sendo mais eficaz em pH 2,0 que em pH 7,0.

Conclusões

Os fosfitos de manganês e zinco testados promoveram controle da antracnose em sementes de soja inoculadas com *C. truncatum*. O fosfito de manganês atua no patossistema por ativação da CAT e da POX, indução no teor de lignina e por toxidez direta ao patógeno. Já o fosfito de zinco atua por indução na atividade da POX e por toxidez direta a *C. truncatum*.

Referências bibliográficas

Abbasi, P. A.; Lazarovits, G.. 2006. Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses *Pythium* damping-off of cucumber seedlings. **Plant Disease**. 90: 459-464.

Araújo, L.; Stadnik, M. J.; Borsato, L. C.; Valdebenito-Sanhueza, R. M.. 2008. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**. 33 (2): 148-152.

Araújo, L.; Valdebenito-Sanhueza, R. M.; Stadnik, M. J.. 2010. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**. 35 (1): 54-59.

Araújo, L.; Bispo, W. M. S.; Rios, V. S.; Fernandes, S. A.; Rodrigues, F. A.. 2015. Induction of phenylpropanoid pathway by acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, 99: 447-459.

Begum, M. M.; Sariah, M.; Puteh, A. B.; Zainal Aabidin, M. A.; Rahman, M. A.; Siddiqui, Y.. 2010. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. **Biological Control**. 53: 18 – 23.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS. 399 p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 200p.

Buffara, C. R. S.; Angelotti, F.; Tessmann, D. J.; Souza, C. D.; Vida, J. B. . 2013. Atividade de fosfito de potássio na pré e pós-infecção de *Phakospora euvitis* em folhas de videira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3333-3340.

Chance, B.; Maehley, A. C.. 1955. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2: 764-775.

Carmona, M. A.; Sautua, F. J.; Grijalba, P. E.; Cassina, M.; Pérez-Hernández, O.. 2017. Effect of K and Mn phosphites in the control of *Pythium* damping-off: a feasible alternative to fungicide seed treatments. **Pest Management Science**, DOI: 10.1002/ps.4714.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Décimo primeiro levantamento da safra 2016/2017 de grãos / Agosto de 2017**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_10_11_27_12_boletim_graos_agosto_2017.pdf. Acesso em 10/09/2017 às 14:00.

Dalio, R. J. D.; Ribeiro Júnior, P. M.; Resende, M. L. V.; Silva, A. C.; Blumer, S.; Pereira, V. F.; Osswald, W.; Pascholati, S. F.. 2012. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas.. In: Wilmar C. Luz. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 20: 206-242.

Demirevska-Kepova, K.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.; Holzer, R.; Feller, U.. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, 52 (3): 253-266.

Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 28 (1): 33-46.

Doster, M. A. & Bostock, R. M.. 1988. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, 78: 473-477.

Galli, J. A.; Panizzi, R. C.; Vieira R. D.. 2007. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74: 163-165.

Gianopolitis, C. N. & Ries, S. K.. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59 (2): 309-314.

Groves, E.; Howard, K.; Hardy, G.; Burgess, T. Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi* – *Lupinus angustifolius* model system. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 559-569, 2014.

Havir, E. A. & McHale, N. A.. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84 (2): 450-455.

Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; González Altamiranda, E. A.; Wolski, E. A.; Daleo, G. R.; Caldiz, D. O.; Andreu, A. B.. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**. 122: 349–358.

Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B. 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**. 117: 102-109.

Machado, J. C.; Oliveira, J. A.; Vieira, M. G. C. G.; Alves, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Feldman, M. L.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B.. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, 169 (14): 1417-1424.

Maguire, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

Michel, B. E.; Radcliffe, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n.1, 131-136, 1995.

Monteiro, A. C. A.; Resende, M. L. V.; Valente, T. C. T.; Ribeiro Júnior, P. M.; Pereira, V. F.; Costa, J. R.; Silva, J. A. G.. 2016. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**. 164: 1043-1053.

OCDE – FAO. 2015. **Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024**. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>. Acesso em 01/02/2016 09:50.

Pereira, C. E.; Oliveira, J. A.; Rosa, M. C. M.; Oliveira, G. E.; Neto, J. C..2009. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, 39: 2390-2395.

Puerari, H. H.; Dias-Arieira, C.; Tavares Silva, C. A.; Arieira, J. O.; Biela, F.; Poletine, J. P.. 2013. Ecolife nd manganese phosphite in the controle of Meloidogyne javanica and in the developmente of soybean cultivars susceptible and resistant to the nematode. **Nematropica**. 43: 105-112.

Rengel, Z.; Graham, R. D.; Pedler, J. F.. 1993. Manganese nutrition and accumulation of phenolics and lignina as related to differential resistance of wheat genotypes to the take-all fungus. **Plant and Soil**, 151: 255-263.

Shaner, G. & Finney, R. F.. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression. Of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, 67: 1051-1056.

Silva, O. C.; Santos, H. A. A.; Dalla Pria, M.; May-De Mio, L. L. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**. 30: 598-604.

Silva, A. C.; Souza, P. E.; Machado, J. C.; Silva, B. M.; Pinto, J. E. B. P.. 2012. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Topical Plant Pathology**, 37: 305-313.

Simonetti, E.; Pin Viso, N.; Montecchia, M.; Zilli, C.; Balestrasse, K.; Carmona, M.. 2015. Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. **Microbiological Research**. 180: 40-48.

Spanos, G. A. & Wrolstad, R. E.. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 38 (7): 1565-1571.

Stangarlin, J. R.; Kuhn, O. J.; Toledo, M. V.; Portz, R. L.; Schan-Estrada, K. R. F.; Pascholati, S. F.. 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, 10: 18-46.

Torres-Calzada, C.; Tapia-Tussel, R.; Higuera-Ciapara, I.; Nexticapan-Garcez, A.; Perez-Brito, D.. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resitant isolates. **Plant Disease**, 99: 1590-1595.

Urbanek, H.; Kuzniak-Gebarowska, E.; Herka, H.. 1991. Elicitation of defence responses in bean comom leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, 13 (1): 43-50.

Yang, H. C.; Hartman, G. L.. 2015. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, 99: 143-148.

Zhao, H.; Wu, L.; Chai, T.; Zhang, Y.; Tan, J.; Ma, S.. 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Journal of Plant Physiology**, 169: 1243-1252.

ARTIGO 3

Fosfitos no manejo da antracnose em vagens de soja, no controle da transmissão do patógeno de vagens a sementes e caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

Manoel Batista da Silva Júnior¹; Mário Lúcio Vilela de Resende¹; Edson Ampélio Pozza¹; Alexandre Ribeiro Maia de Resende¹; Victor Augusto Maia Vasconcelos¹; Ana Cristina Andrade Monteiro¹

Resumo

A soja é a principal cultura de grãos do Brasil. As doenças causam perdas significativas e a antracnose tem sido problema em todo o país, nas últimas safras. Em alguns trabalhos já foi demonstrada a resistência do patógeno a fungicidas. Dentre as fontes alternativas para manejo de doenças de plantas destacam-se os fosfitos, que podem atuar por nutrição e indução de resistência no hospedeiro e por toxidez direta ao patógeno. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de formulações comerciais de fosfitos de Cu, K, Mn e Zn no manejo da antracnose em vagens de soja e da transmissão do patógeno de vagens a sementes e caracterizar o modo de ação desses produtos por indução de resistência. Foram utilizadas no ensaio plantas de soja da cultivar TMG 1176 RR, susceptível à antracnose, obtidas junto à Fundação MT. O isolado fúngico utilizado foi o LAPS473, obtido junto ao Laboratório de Análise e Patologia de Sementes da UFLA. Os tratamentos foram aplicados via pulverização com pulverizador manual pressurizado. Foram utilizadas como padrões duas testemunhas, sendo uma inoculada e a outra não, além de um fungicida comercial (epoxiconazol+piraclostrobina). A inoculação foi realizada mediante pulverização de suspensão de inóculo (1×10^6 conídios/mL). Após o aparecimento dos sintomas foram realizadas cinco avaliações, a cada cinco dias, da severidade da doença nas vagens. Com base na severidade foram calculados a área abaixo da curva e os progressos da severidade (AACPS) e o controle propovido em cada tratamento. Foram avaliados também a atividade das enzimas CAT, POX e SOD e o teor de lignina solúvel e fenóis solúveis totais. As enzimas foram avaliadas às 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a incubação e a lignina e os fenóis, às 192 horas. Com base na atividade de cada enzima foi calculada a área abaixo da curva de progresso da atividade (AACPACat, AACPAPOx e AACPASod). As análises estatísticas foram realizadas no software R 3.1.3. Os fosfitos de Cu, Mn e K testados promoveram controle da antracnose e da transmissão. O fosfito de Mn aumentou significativamente a AACPAPOx e promoveu incremento significativo na lignina. O fosfito de cobre aumentou significativamente a AACPAPOx e a AACPASod. O fosfito de potássio promoveu incremento no teor de lignina. Não houve diferença significativa para o teor de fenóis e na AACPASod. Os fosfitos de Cu, Mn e K testados foram eficazes no controle da antracnose em vagens de soja e atuam por indução de resistência.

Palavras-chave: Controle alternativo, *Colletotrichum truncatum*, Pulverização Foliar, *Glycine max* L.

Introdução

A soja é a principal cultura de grãos do Brasil. Seu complexo representa um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira, cujas exportações registraram valores de mais de 145 bilhões de dólares até agosto de 2017, sendo esse valor equivalente a 17% do total agropecuário do Brasil (Abiove, 2017). Além disso, a área plantada e a produção nacional crescem a cada ano. Na safra 2007/2008, a produção foi de 58 milhões de toneladas em uma área de 20 milhões de hectares. Já na última safra foram registradas 114 milhões de toneladas em uma área de 34 milhões de hectares (CONAB, 2008; CONAB, 2017).

As doenças se destacam por causar perdas significativas nesta cultura, sendo a antracnose uma das principais, por afetar todos os estádios fenológicos da soja. A referida doença é causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* e os principais sintomas são podridão de sementes, lesões deprimidas e escuras nas folhas e hastes, e deiscência e podridão de vagens. As perdas podem chegar a 100% em condições de umidade e temperatura favoráveis ao patógeno durante o plantio, devido à significativa redução na germinação das sementes (Galli et al., 2007; Silva et al., 2012) e à deiscência e podridão de vagens antes da colheita. O patógeno é transmitido por sementes, as quais são o inóculo inicial que irá causar as novas epidemias. A carência de produtos capazes de controlar o patógeno na parte aérea demanda a busca por fontes alternativas e eficazes de controle da doença e da transmissão do patógeno para as sementes. Além disso, o uso intensivo de fungicidas pode causar alguns efeitos negativos, como o desenvolvimento de resistência do patógeno ao ingrediente ativo (Begum et al., 2010).

Dentre os produtos alternativos disponíveis no mercado destacam-se os fosfitos. Estes produtos são obtidos por reação do ácido fosforoso com uma base (K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , etc.) e podem atuar na nutrição e na indução de resistência no hospedeiro e na toxidez direta ao patógeno (Dalio et al., 2012). Devido ao seu triplo modo de ação, o risco de resistência do patógeno é menor, se comparado aos fungicidas. Além disso, os fosfitos podem ser translocados na planta via xilema e floema e apresentam custo reduzido em relação aos fungicidas químicos (Groves et al., 2014; Buffara et al., 2013).

Trabalhos sobre fosfitos no manejo de *Colletotrichum truncatum* em soja não são encontrados na literatura. Alguns trabalhos publicados demonstram a eficiência dos fosfitos no manejo de outras doenças foliares da soja. Avaliando fungicidas, Silva et al. (2011) observaram redução na intensidade do míldio da soja (*Peronospora manshurica*) em condições de campo, com o aumento da dose de uma formulação de fosfito de potássio. Segundo Neves & Blum (2014), a aplicação de fosfito de potássio após a aplicação de

pyraclostrobin + epoxiconazol, tiofanato metílico + flutriafol e tebuconazol promoveu maior controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachrhizi*) da soja. De acordo com Gadaga et al. (2017), formulações de fosfito de potássio e manganês controlaram a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em campo e promoveram aumentos nas atividades de enzimas relacionadas à defesa das plantas. Portanto, estes produtos podem apresentar eficácia no controle da antracnose da soja.

Em relação à transmissão também não há trabalhos sobre fosfitos e *C. truncatum*. Porém, Lobato et al. (2011) verificaram que a aplicação foliar de fosfito de potássio promoveu controle de *Phytophthora infestns*, *Fusarium solani* e *Erwinia carotovora* em tubérculos de batata colhidos ao fim do ensaio. Além disso, houve aumento da atividade de quitinases, peroxidases, polifenoloxidasas e incrementos na síntese de fitoalexinas nestes tubérculos.

Sendo assim, este ensaio foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito de quatro formulações comerciais de fosfitos de Cu, K, Mn e Zn no manejo da antracnose em vagens de soja e no controle da transmissão de *C. truncatum* de plantas a sementes de soja e caracterizar seu modo de ação por indução de resistência.

Material e Métodos

Material vegetal, fúngico e condições experimentais

Foram utilizadas no ensaio plantas de soja da cultivar TMG 1176 RR. As sementes foram obtidas junto à Fundação Mato Grosso. O isolado de *C. truncatum* LAPS-473 foi obtido junto ao Laboratório de Análise e Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras. A partir da colônia foi obtida uma cultura monospórica que foi utilizada em todo o ensaio. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

O ensaio de controle da doença foi conduzido em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 27 °C e umidade relativa do ar em torno de 70-80%. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com três plantas. Já o ensaio enzimático foi conduzido em casa de vegetação e laboratório, sob delineamento inteiramente casualizado com três repetições de três plantas cada. Nos dois ensaios as plantas foram conduzidas em vasos de 4 L de volume contendo substrato composto por terra de barranco, areia e substrato orgânico (2:1:1). Todos os tratos culturais (adubação, irrigação, controle de pragas, etc.) foram realizados conforme recomendação para a cultura.

Obtenção dos fosfitos e do fungicida

Foram testadas quatro formulações comerciais de fosfitos obtidos diretamente dos fabricantes, comparadas com um fungicida comercial e duas testemunhas, sendo uma inoculada e outra não (Tabela 1).

Tabela 1 - Nome comercial, ingrediente ativo e doses dos produtos utilizados no ensaio.

Nome comercial	Especificação	Doses (L.ha ⁻¹)
Testemunha inoculada	---	---
Testemunha não inoculada	---	---
Opera [®]	Fungicida (epoxiconazol+piraclostrobina)	0,50
Reforce Cu [®]	Fosfito de cobre (4% Mn + 20,3% P ₂ O ₅)	0,50
Active Mn [®]	Fosfito de manganês (10% Mn + 51,5% P ₂ O ₅)	0,50
Reforce Zn [®]	Fosfito de zinco (10 % Zn + 34% P ₂ O ₅)	0,50
Yantra [®]	Fosfito de potássio (29% K ₂ O + 33,6% P ₂ O ₅)	1,00

*L ha⁻¹: litros de produto comercial por hectare.

Aplicação dos tratamentos e inoculação do patógeno

Para a aplicação dos tratamentos foram utilizados pulverizadores manuais pressurizados. As caldas foram preparadas conforme as doses descritas na Tabela 1. Os produtos foram aplicados nos estádios V₄ (três trifólios expandidos), R₁ (início do florescimento) e R₃ (Formação do legume), com volume de calda de 200 L.ha⁻¹ e pressão de 40 psi.

Para a produção dos esporos de *C. truncatum* foram utilizados tubos de ensaio com 10 mL de volume. Nestes tubos foram acondicionadas vagens de soja parcialmente submersas em meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA). Os tubos foram, então, vedados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave. O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após o crescimento do fungo foram retirados das placas discos e de micélio com 0,5 cm de diâmetro. Estes discos foram depositados no meio contido no tubo. Após 15±2 dias, o fungo cresceu e esporulou nas vagens. Foram, então, pipetados nos tubos 2 mL de água destilada estéril, que foram levados para um agitador para facilitar o desprendimento dos esporos. A suspensão obtida foi calibrada para 1 x 10⁶ conídios por mililitro e foi adicionado ágar (0,2%) para maior aderência dos esporos nas vagens. A suspensão foi pulverizada nas plantas no estágio R₄ (legume formado) com pulverizador manual pressurizado com pressão de 40 psi, até o ponto de escorrimento.

Fosfitos no manejo da antracnose em vagens de soja e no controle da transmissão de *C. truncatum* de vagens a sementes

Após o aparecimento dos sintomas nas vagens foram realizadas cinco avaliações, em intervalos de cinco dias, da severidade da antracnose, com base em escala diagramática de Hosfall & Barrat (1945). Com os dados da severidade foram plotadas as curvas de progresso da severidade em cada tratamento e calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPS), segundo metodologia de Shaner & Finney (1977). A partir da AACPS foi calculado o controle proporcionado pelos tratamentos, conforme metodologia de Abbott (1925).

Para avaliação da transmissão do patógeno e vagens, as sementes foram colhidas ao fim do ensaio. Em seguida, foi realizado com essas sementes o teste de sanidade, conforme recomendação das RAS (Brasil, 2009) e do Manual de Análises Sanitárias (Brasil, 2009). Para tanto, as sementes foram incubadas em placas de acrílico de 15 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro e meio de cultura ágar água com adição do herbicida 2,4-D (5000 ppm). Foram distribuídas 40 sementes por placa, as quais foram incubadas em BOD com 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. O ensaio foi montado em delineamento de blocos casualizados com oito repetições de 40 sementes cada. Foram, então, determinados a incidência do patógeno nas sementes colhidas e o controle proporcionado por cada um dos tratamentos (Abbott, 1925).

Fosfitos na ativação dos mecanismos bioquímicos de vagens de soja

Os fosfitos que promoveram controle da antracnose nas vagens de soja foram submetidos a experimento bioquímico. As plantas foram inoculadas e tratadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram realizadas coletas de vagens às 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a inoculação. O material vegetal foi coletado, envolvido com papel alumínio e armazenado em freezer, a -80 °C, até o início das análises.

Para o preparo dos extratos, 3,0 g material vegetal de cada amostra foram macerados separadamente em nitrogênio líquido e 0,5 g do pó macerado foram depositados em microtubos de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Para as amostras de lignina foram separados e acondicionados em vidros de penicilina 30 mg do pó macerado. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 g, a 4 °C, por 15 minutos e os sobrenadantes separados e utilizados para as análises enzimáticas.

A quantificação da proteína total foi realizada segundo Bradford (1976), ajustada para microquantidades. Placas de 96 poços receberam 10 μL da amostra, 20 μL do tampão de extração e 170 μL do reagente de Bradford. Foi feita a leitura das microplacas a 595 nm. A curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina (BSA) entre 0 e 100 μg , e os resultados foram correspondentes à média de três replicatas.

A atividade da peroxidase (POX) foi avaliada conforme metodologia de Urbanek et al. (1991), pela oxidação do guaiacol em microplacas com 96 cavidades. A mistura de reação foi composta por 30 μL da amostra, 20 μL de guaiacol 50 mM, 20 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 125 mM e 130 μL do tampão de extração. A absorvância foi mensurada a 480 nm e o coeficiente de extinção molar de $1,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da POX (Chance & Maehley, 1955).

A catalase (CAT) foi avaliada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, por 3 minutos, a 25 °C, em microplacas com 96 cavidades. Foram adicionados 10 μL do extrato enzimático, 60 μL de água, 100 μL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0 e 20 μL de H_2O_2 250 mM. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o cálculo da atividade desta enzima (Havir & McHale, 1987).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme Giannopolitis & Ries (1977), em microplacas com 96 cavidades. A reação foi composta por 10 μL do extrato enzimático 31 μL de água, 2 μL de riboflavina 0,2 mM, 2 μL de EDTA 10 μM , metionina 70 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8 e 15 μL de NBT 1 mM. As placas foram incubadas, por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30W. Em seguida, a leitura foi realizada a 560 nm e a unidade da enzima correspondeu à sua capacidade de inibir em 50% a fotorredução do NBT.

Com os dados da atividade das enzimas CAT, POX e SOD foi calculada a área abaixo da curva de progresso de atividade da CAT (AACPA_{Cat}), da POX (AACPA_{Pox}) e da SOD (AACPA_{Sod}), com base em metodologia de Shanner & Finey (1977).

A lignina foi determinada pela dissolução de 30 mg do material vegetal em ácido tioglicólico e HCl, conforme metodologia de Doster e Bostock (1988). A leitura foi realizada a 280 nm e o valor expresso em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de matéria seca. A avaliação do teor de fenóis solúveis totais foi realizada conforme metodologia de Spanos & Wrolstad (1990). A leitura foi realizada a 725 nm e a quantidade expressa em $\mu\text{L mg}^{-1}$ de matéria seca.

Análises estatísticas

Para avaliação dos pressupostos da análise de variância os resíduos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, em caso de significância, os dados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Para aceitar ou rejeitar H_0 , os dados foram submetidos ao teste F e, em caso de significância, foi realizado teste de médias para diferenciar os tratamentos. No ensaio de controle da doença e da transmissão foi utilizado o teste de Scott-Knott. Nos ensaios com as enzimas, fenóis e lignina foi utilizado o teste de Tukey.

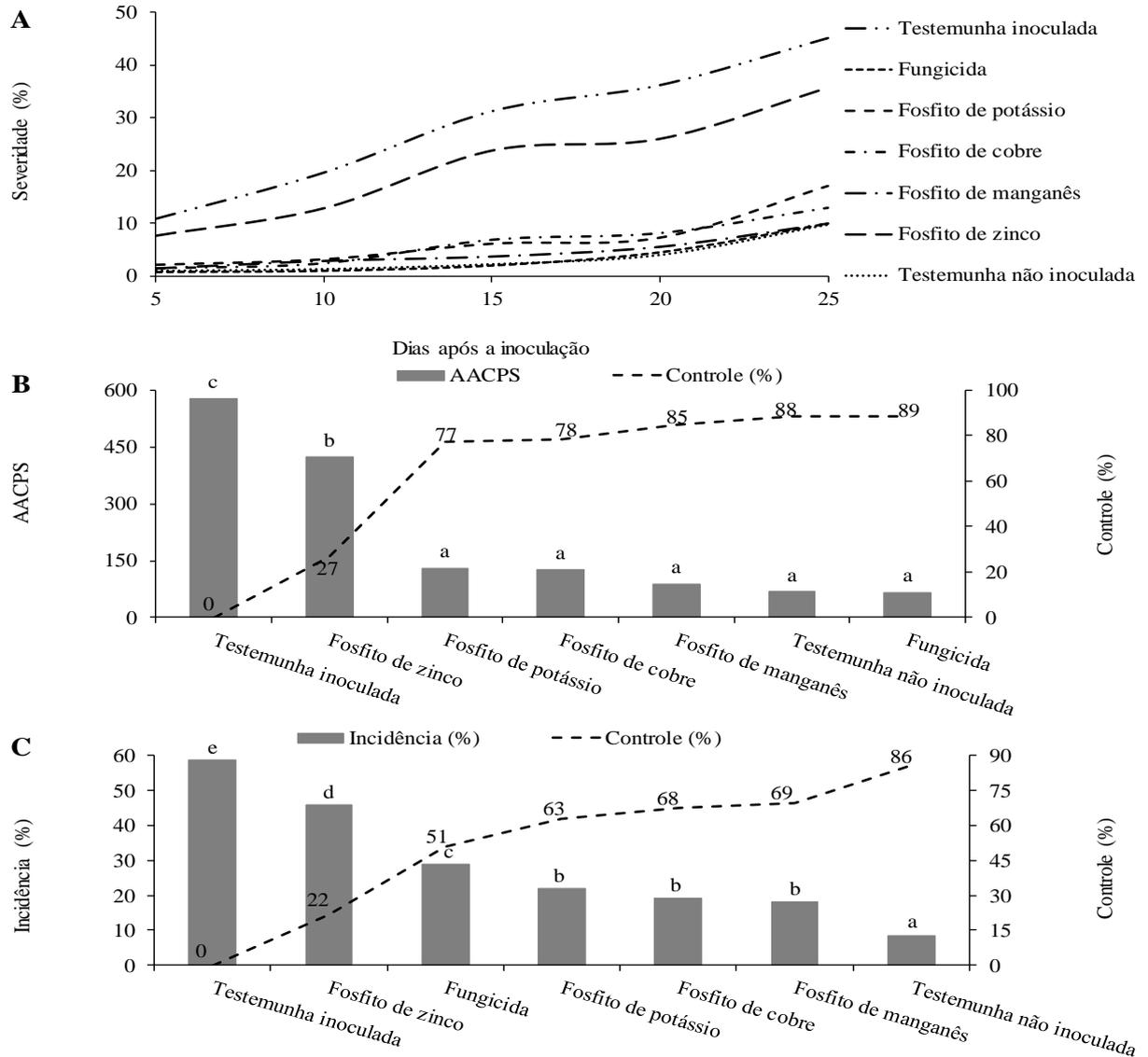
Resultados

Todos os tratamentos mantiveram a severidade em níveis mais baixos que a testemunha, ao longo das avaliações. A severidade esteve próxima de 10% na testemunha, 8% no fosfito de zinco e 2% para aos demais tratamentos, aos cinco dias após a inoculação (DAI). Aos 25 DAI, a severidade na testemunha foi próxima de 45%, 37% no fosfito de zinco e 10% nos demais tratamentos (Figura 1A).

Para a AACPS, todos os tratamentos diferiram da testemunha. O fosfito de zinco teve efeito intermediário com controle de 27%. Os demais tratamentos foram superiores ao fosfito de zinco e à testemunha, não diferiram entre si e proporcionaram controle de 77% a 89% (Figura 1B).

Em relação à incidência de *C. truncatum* nas sementes colhidas, todos os tratamentos diferiram da testemunha. O fosfito de zinco e o fungicida foram inferiores aos demais tratamentos e proporcionaram controle de 22% e 51%, respectivamente. Os fosfitos de cobre, manganês e potássio foram inferiores ao da testemunha não inoculada e promoveram controle de 63% a 69%. Na testemunha não inoculada houve redução de 86% na transmissão, portanto, 14% da transmissão do fungo foi natural (Figura 1C).

Figura 1 - Efeito dos tratamentos no progresso da severidade nas vagens (A), na AACPS da antracnose e controle dos tratamentos (B) e na transmissão de *C. truncatum* de vagens para sementes de soja (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Scott-Knott.



Observou-se que todos os fosfitos promoveram aumento na atividade da CAT às 192 horas após a inoculação (HAI), sendo o pico de atividade desta enzima atingido neste período (Figura 2A). Para a POX às 72 horas e 96 HAI os tratamentos promoveram maior atividade em relação à testemunha, porém, a enzima atingiu seu pico de atividade às 192 HAI (Figura 2B). Já em relação à SOD, os tratamentos promoveram maior atividade da enzima citada às 192 HAI. Porém, a SOD atingiu seu pico de atividade às 48 HAI (Figura 2C).

Em relação à AACPCat, os fosfitos de manganês e cobre diferiram da testemunha de forma significativa. Já o fosfito de potássio não diferiu da testemunha (Figura 3 A). Para a

AACPAPox, apenas o fosfito de cobre diferiu da testemunha; os demais tiveram o mesmo efeito da testemunha (Figura 3B). Na AACPASod não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Figura 3C).

Para o teor de fenóis solúveis totais não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha. Já para o teor de lignina solúvel os fosfitos de manganês e potássio diferiram da testemunha. Já o fosfito de cobre não diferiu da testemunha (Figura 4).

Figura 2 - Efeito dos tratamentos no progresso da atividade da catalase (CAT) (A), peroxidase (POX) (B) e superóxido dismutase (SOD) (C).

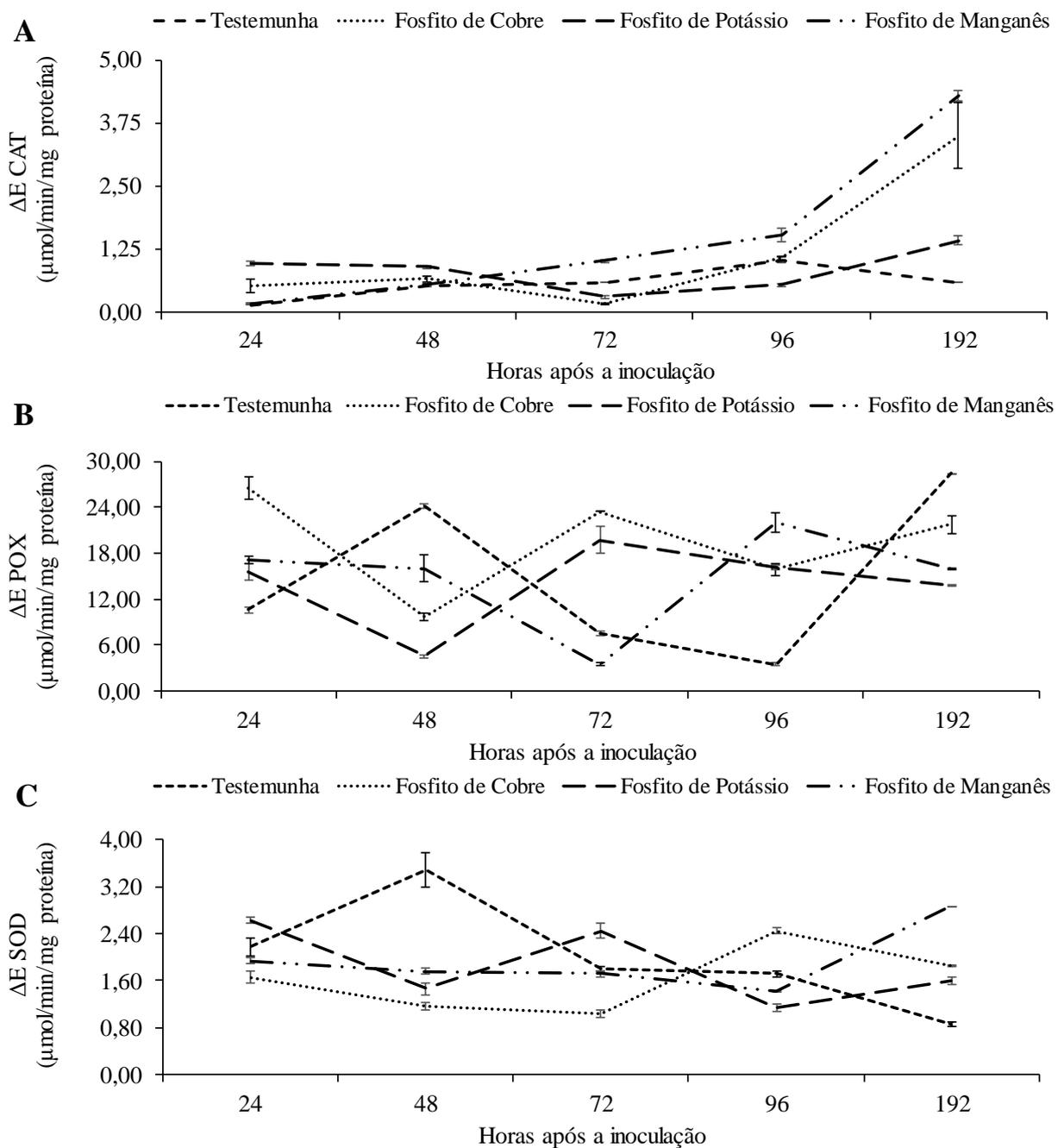


Figura 3 - Efeito dos tratamentos na AACPACat (A), AACPAPox (B) e AACPASod (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

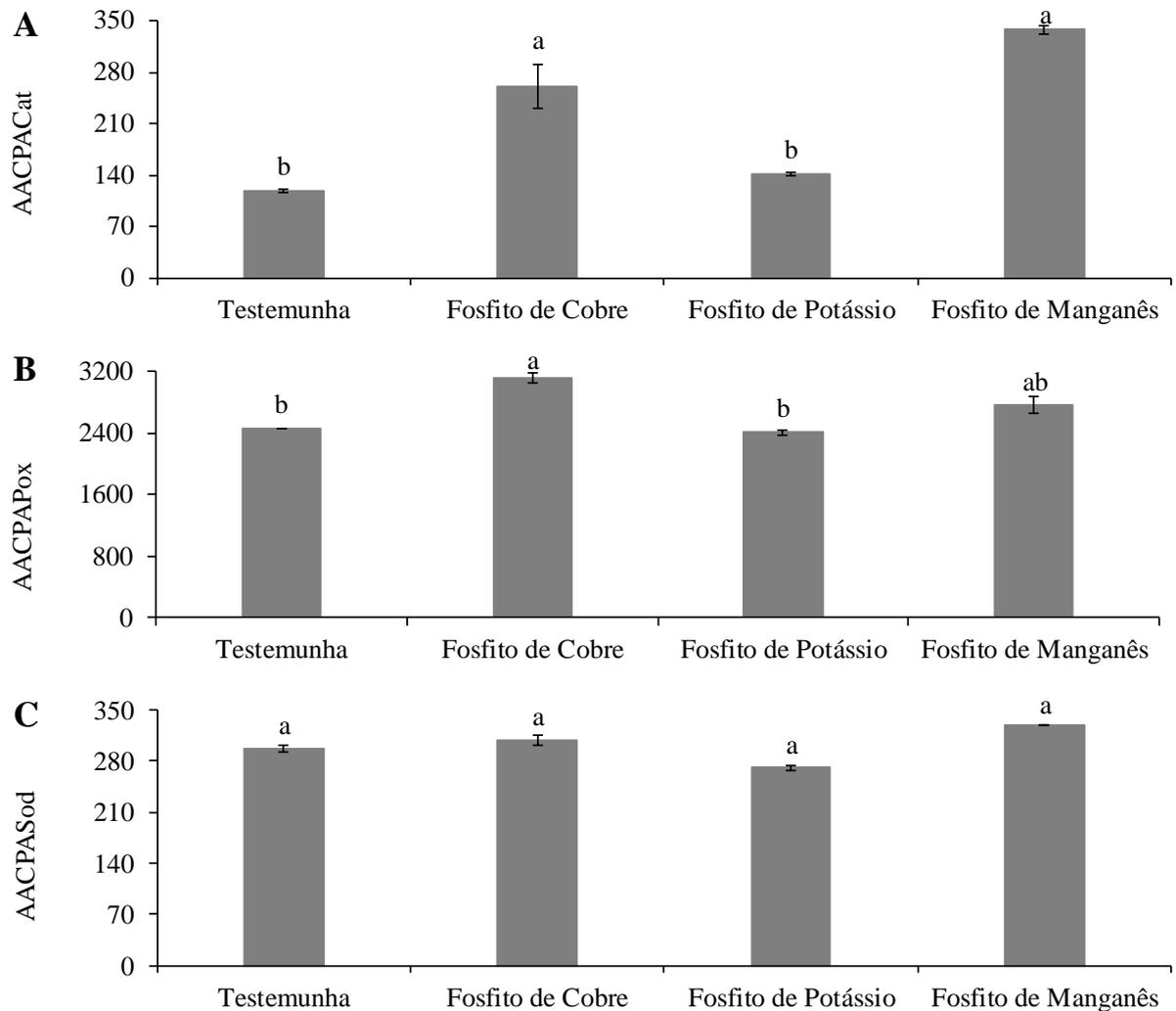
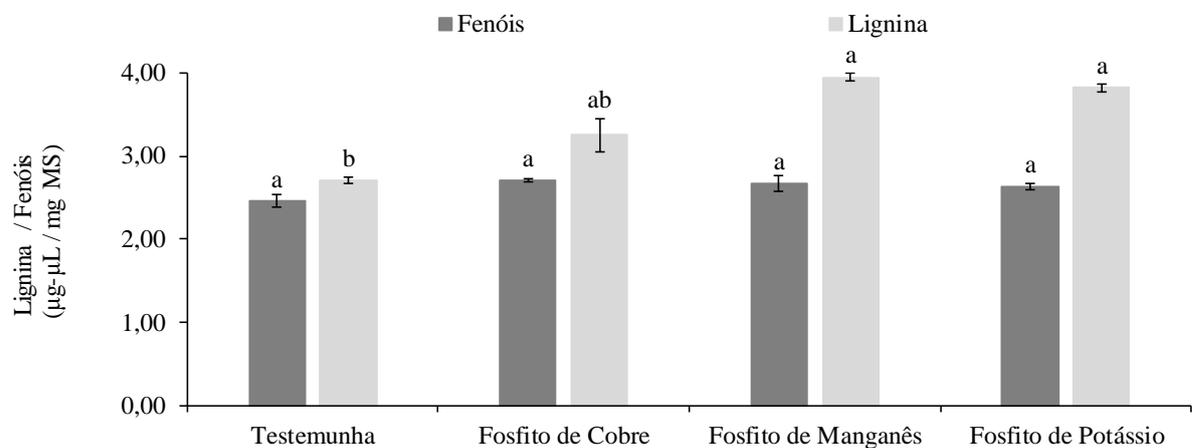


Figura 4 - Efeito dos tratamentos no teor de lignina e fenóis solúveis totais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.



Discussão

A antracnose vem se tornando uma doença de grande importância para a sojicultura brasileira. Poucos são os trabalhos conduzidos com o objetivo de avaliar formas de controle eficazes para a doença citada. Pesqueira et al. (2016) avaliaram o efeito de misturas de fungicidas para o controle da antracnose na parte aérea de soja. Houve controle simultâneo da severidade e da transmissão do fungo para sementes quando se misturou carbendazim com epoxiconazol + piraclostrobina ou ciproconazol+picoxistrobina. Ao utilizar dois fungicidas para o controle da doença, o custo aumenta e o controle químico pode trazer contaminação ao ambiente. Além disso, o patógeno pode adquirir resistência ao ingrediente ativo (Begum et al., 2010). De acordo com Torres-Calzada et al. (2015), isolados de *C. truncatum* obtidos em diferentes hospedeiros se apresentaram altamente resistentes aos fungicidas thiabendazol, azoxistrobina e susceptíveis a mancozebe e ciprodinil + fludioxonil.

Segundo Dalio et al. (2012), os fosfitos podem atuar no patossistema por indução de resistência e nutrição do hospedeiro e também por toxidez direta ao patógeno. Este triplo modo de ação reduz o risco de o patógeno adquirir resistência. Estes produtos também apresentam as vantagens de se translocar via xilema e floema, e terem custo reduzido, comparados aos fungicidas químicos disponíveis no mercado (Groves et al., 2014; Buffara et al., 2013). Neste estudo as formulações de fosfitos de cobre, manganês e potássio se mostraram eficazes no controle da antracnose e na redução da transmissão do patógeno de vagens a sementes. O fosfito de potássio promoveu aumento no teor de lignina. O fosfito de cobre proporcionou aumento na atividade da CAT e da POX. Já o fosfito de manganês aumentou a atividade da catalase e o teor de lignina. Portanto, estes produtos são alternativas viáveis e sustentáveis para o controle da antracnose.

A eficácia dos fosfitos no controle de doenças foliares da soja e outras culturas foi comprovada em alguns trabalhos. Em soja, Silva et al. (2011) observaram controle do míldio da soja proporcional ao aumento nas doses de uma formulação comercial de fosfito de potássio. Segundo Neves & Blum (2014), a aplicação de fosfito de potássio após a aplicação de pyraclostrobin + epoxiconazol, tiofanato metílico + flutriafol e tebuconazol promoveu maior controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachrhizi*) da soja, em comparação com a aplicação dos fungicidas isolados. Gadaga et al. (2017) verificaram que a aplicação de fosfitos de potássio e manganês em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) proporcionou controle da antracnose e aumentos na atividade das enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO).

Em relação ao uso de fosfitos no controle da transmissão de patógenos Lobato et al. (2011) estudaram o efeito da aplicação de fosfito de potássio via foliar na qualidade pós-

colheita de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*). Segundo os autores, a aplicação do fosfito de potássio reduziu a incidência de *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* e *Erwinia carotovora* nos tubérculos colhidos em, aproximadamente, 50%, em relação à testemunha. O fosfito promoveu, ainda, incrementos na produção e na atividade da quitinase (CHI), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POX) nos tubérculos tratados e inoculados. Houve também aumento na síntese de fitoalexinas nas plantas tratadas com o fosfito, em comparação com a testemunha. Olivieri et al. (2012) aplicaram fosfito de potássio em tubérculos no plantio e na folhagem de plantas de batata e observaram indução de respostas de defesa nos tubérculos colhidos. Houve aumento na atividade de proteínas inidoras de poligalacturonases (PGIPs) e maior acúmulo de pectina nos tubérculos tratados e inoculados com *F. solani*. Já Reuveni et al. (2003) observaram que a aplicação de fosfito de potássio na parte aérea a partir da floração da macieira promoveu controle da podridão marrom dos frutos colhidos.

O íon fosfito pode induzir a transcrição de genes relacionados às rotas dos ácidos salicílico e jasmônico/etileno; à indução de proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas; à indução de espécies ativas de oxigênio e à fortificação das barreiras naturais dos tecidos que ficam latentes. No momento da entrada do patógeno ocorre uma resposta rápida chamada “priming”, que também pode levar à produção rápida de espécies ativas de oxigênio, reação de hipersensibilidade, acúmulo de compostos fenólicos, lignina e etileno (Dalio et al., 2012). Segundo Monteiro et al. (2016), houve aumento na expressão dos genes POX, CAT, GLU e PAL após a aplicação de fosfito de manganês. Todos estes genes codificam proteínas que participam da resposta de defesa das plantas. Já Araújo et al. (2015) verificaram que uma formulação de fosfito de potássio promoveu indução de compostos produzidos por enzimas da rota dos fenilpropanóides. A produção de diversos compostos do metabolismo secundário induziu a resistência de plantas de manga (*Mangifera indica*) contra *Ceratocystis fimbriata*. Os compostos sintetizados foram alcalóides, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzoícos e favonóides.

Os nutrientes presentes nos fosfitos podem funcionar como cofatores das enzimas citadas e de outros processos que levam à formação das substâncias envolvidas na defesa. O manganês atua na biossíntese de lignina por meio da ativação de enzimas componentes da rota dos fenilpropanóides, em que está incluída a catalase (Dordas et al., 2008). Neste estudo houve aumento na atividade desta enzima quando se aplicou o fosfito de manganês, portanto, é provável que o suprimento de manganês a tenha ativado e, com isso, incrementado o teor de lignina. Rengel et al. (1993) observaram que o aumento na concentração de manganês no solo induziu maior teor de lignina em plantas de trigo (*Triticum aestivum*). Estes autores

correlacionaram o aumento no teor de lignina com a resistência das plantas ao fungo *Geumannomyces graminis*. De acordo com Zhao et al. (2012), o acréscimo no suprimento de manganês promoveu aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.

O potássio também aumentou o teor de lignina, porém, sem ativar as enzimas avaliadas. É provável que se tenha ativado outra enzima da rota metabólica citada que tenha incrementado a síntese deste polímero. Conforme Mofidnakhai et al. (2016), a aplicação de uma formulação de fosfito de potássio aumentou a atividade da catalase (CAT) e da peroxidase (POX) em folhas de pepino (*Cucumis sativus*) inoculadas com *Pythium ultimum*.

Já o cobre atuou induzindo maior atividade da catalase e da peroxidase. Em alguns trabalhos foi demonstrado o efeito da aplicação de cobre na indução do sistema antioxidante em plantas. Segundo Wang et al. (2004), o suprimento de cobre em plantas de mostarda (*Brassica juncea*) induziu aumentos na atividade da peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) nas raízes. Já Yurekli & Porgali (2006) verificaram aumento da atividade da catalase (CAT) e peroxidase (POX) em folhas, caules e raízes de feijoeiro, com aumento no suprimento de cobre às plantas. Wang et al. (2010) observaram aumentos na atividade da catalase (CAT) e peroxidase (POX) com o aumento do cobre em tomate cultivado em solução nutritiva.

Conclusões

Os fosfitos de cobre, manganês e potássio promoveram controle da severidade da antracnose nas vagens de soja e da transmissão de *C. truncatum* de vagens a sementes.

O fosfito de manganês aumentou o teor de lignina e a atividade da CAT. O fosfito de potássio aumentou o teor de lignina. Já o fosfito de cobre aumentou a atividade da CAT e da POX.

Referências bibliográficas

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, 18: 265-266.

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Exportações do complexo da soja no Brasil.** Disponível em http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/13092017-121650-exp_201708.pdf. Acesso em 23/09/2017 às 10:00.

Araújo, L.; Bispo, W. M. S.; Rios, V. S.; Fernandes, S. A.; Rodrigues, F. A.. 2015. Induction of phenylpropanoid pathway by acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, 99: 447-459.

Begum, M. M.; Sariah, M.; Puteh, A. B.; Zainal Aabidin, M. A.; Rahman, M. A.; Siddiqui, Y.. 2010. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. **Biological Control**. 53: 18 – 23.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS. 399 p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 200p.

Buffara, C. R. S.; Angelotti, F.; Tessmann, D. J.; Souza, C. D.; Vida, J. B. . 2013. Atividade de fosfito de potássio na pré e pós-infecção de *Phakospora euwitii* em folhas de videira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3333-3340.

Chance, B.; Maehley, A. C.. 1955. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2: 764-775.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Décimo primeiro levantamento da safra 2016/2017 de grãos / Agosto de 2017**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_10_11_27_12_boletim_graos_agosto_2017.pdf. Acesso em 10/09/2017 às 14:00.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Décimo segundo levantamento da safra 2007/2008 de grãos / Setembro de 2008**. Disponível em http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/12_levantamento_set2008.pdf. Acesso em 15/09/2017 às 11:00.

Dalio, R. J. D., Ribeiro Júnior, P. M.; Resende, M. L. V.; Silva, A. C.; Blumer, S.; Pereira, V. F.; Osswald, W.; Pascholati, S. F.. 2012. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas.. In: Wilmar C. Luz. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 20: 206-242.

Dordas, C. 2008. Role of nutrientes in controlling plant diseases in sustainable agriculture: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 28 (1): 33-46.

Doster, M. A. & Bostock, R. M.. 1988. Quantification of lignin formation in almond bark in response to woundin and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, 78: 473-477.

Gadaga, S. J. C.; Abreu, M. S.; Resende, M. L.V.; Ribeiro Junior, P. M.. Phosphites for controle of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017.

Galli, J. A.; Panizzi, R. C.; Vieira R. D.. 2007. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74: 163-165.

Gianopolitis, C. N. & Ries, S. K.. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59 (2): 309-314.

Groves, E.; Howard, K.; Hardy, G.; Burgess, T. Role os salycilic acid in phosphite-induced protection agains oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi* – *Lupinus augustifolius* model system. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 559-569, 2014.

Havir, E. A. & McHale, N. A.. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in toacco leaves. **Plant Physiology**, 84 (2): 450-455.

Horfall, J. C. & BARRATT R. W.. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, 35: 665.

Lobato, M. C.; Machinandiarena, M. F.; Tmabascio, C.; Dosio, G. A. A.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B.; Oliveieri, F. P.. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, 130: 155-163.

Mofidnakhai, M.; Abdossi, V.; Dehestani, A.; Pirdashti, H.; Babaeizad, V.. 2016. Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity and alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with *Pythium ultimum*. **Archive of Plant Pathology and Plant Protection**, 49: 1-15.

Monteiro, A. C. A.; Resende, M. L. V.; Valente, T. C. T.; Ribeiro Júnior, P. M.; Pereira, V. F.; Costa, J. R.; Silva, J. A. G.. 2016. Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**. 164: 1043-1053.

Neves, J. S. & Blum, L. E. B.. 2014. Influência de fungicidas e fosfito de potássio no controle da ferrugem asiática e na produtividade da soja. **Caatinga**, 27 (1): 75-82.

Olivieri, F. P.; Feldman, M. L.; Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Caldiz, D. O.; Daleu, G. R.; Andreu, A. B.. 2012. Phoshite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and córtex that echange resistance to pathogens. **Crop Protection**, 32: 1-6.

Pesqueira, A. S.; Bacchi, L. M. A.; Gavassoni, W. L.. 2016. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Ciência Agrônômica**, 47 (1): 203-202.

Rengel, Z.; Graham, R. D.; Pedler, J. F.. 1993. Manganese nutrition and accumulation of phenolics and lignina as related to differential resistance of wheat genotypes to the take-all fungus. **Plant and Soil**, 151: 255-263.

Reuveni, M.; Sheglov, D.; Cohen, Y.. 2003. Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**. 87: 933-936.

Shaner, G. & Finney, R. F.. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression. Of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, 67: 1051-1056.

Silva, A. C.; Souza, P. E.; Machado, J. C.; Silva, B. M.; Pinto, J. E. B. P.. 2012. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Topical Plant Pathology**, 37: 305-313.

Silva, O. C.; Santos, H. A. A.; Dalla Pria, M.; May-De Mio, L. L. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, 30: 598-604.

Spanos, G. A. & Wrolstad, R. E.. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 38 (7): 1565-1571.

Torres-Calzada, C.; Tapia-Tussell, R.; Higuera-Ciapara, I.; Martin-Mex, R.; Nexticapan-Garcez, A.; Perez-Brito, D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. **Plant Disease**, 99: 159-1595.

Urbanek, H.; Kuzniak-Gebrowska, E.; Herka, H.. 1991. Elicitation of defence responses in bean common leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, 13 (1): 43-50.

Wang, L.; Yang, L.; Yang, F.; Li, X.; Song, Y.; Wang, X.; Hu, X.. 2010. Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. **Journal of Plant Physiology**, 167: 1298-1306.

Wang, S. Yang, Z.; Yang, H.; Lu, B.; Li, S.; Lu, Y.. 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea*. **Botanical Bulletin – Academia Sinica Taipei**, 45: 203-212.

Yurekli, F. & Porgali, Z. B.. 2006. The effect of excessive exposure to copper in bean plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, 48 (2): 7-13.

Zhao, H.; Wu, L.; Chai, T.; Zhang, Y.; Tan, J.; Ma, S.. 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Journal of Plant Physiology**, 169: 1243-1252.

ANEXO I

Tabela 1 - Isolados utilizados no teste de especificidade dos *primers* para detecção de *Colletotrichum truncatum*. (Continua)

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem geográfica	Amplificação
-	LAPS133	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rio Verde, GO	Sim
-	LAPS242	<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Glycine max</i>	Uberlândia, MG	Não
-	LAPS255	<i>Cercospora</i>	<i>Glycine max</i>	Campo Verde, MT	Não
-	LAPS460	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Glycine max</i>	Rondonópolis, MT	Sim
-	LAPS467	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Glycine max</i>	São Paulo, SP	Não
-	LAPS473	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Glycine max</i>	Patos de Minas, MG	Sim
-	LAPS559	<i>Diaphorte</i> sp.	<i>Glycine max</i>	São Paulo, SP	Não
-	LAPS560	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lavras, MG	Não
-	MJ2013	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Glycine max</i>	Lavras, MG	Não
MJMACRO	LAPS07	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Glycine max</i>	Maracaju, MT	Não
193	-	<i>Didymella</i> sp.	<i>Coffea arabica</i>	Machado, MG	Não
359	-	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Coffea arabica</i>	Machado, MG	Não
361	-	<i>Ascochyta</i> sp.	<i>Baccharis</i> sp.	Lavras, MG	Não
716	-	<i>Phoma tarda</i>	<i>Coffea arabica</i>	Campanha, MG	Não
860	-	<i>F. parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Brasil	Não
940	-	<i>Phoma exigua</i>	<i>Coffea arabica</i>	Coramadel, MG	Não
973	-	<i>Didymella</i> sp.	<i>Coffea arabica</i>	Luís Eduardo Magalhães, BA	Não
976	-	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Coffea arabica</i>	Cocos, MG	Não
987	CBS506.91	<i>Phoma costarricensis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Nicarágua, NCA	Não
1079	-	<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Zea mays</i>	Sete Lagoas, MG	Não
1226	-	<i>Penicillium terrigenum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Montividiu, GO	Não
1771	-	<i>Fusarium parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Campo N. do Parecis, MT	Não
1780	TEST01	<i>Fusarium parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Uberlândia, MG	Não
1828	MES50	<i>Fusarium parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Nova Ponte, MG	Não
1837	MES01	<i>Fusarium parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Brasília, DF	Não
1839	MES60	<i>Fusarium parananese</i>	<i>Glycine max</i>	Patrocínio, MG	Não
2231	NRRL22743	<i>Fusarium brasiliense</i>	<i>Glycine max</i>	Brasília, DF	Não
2324	IAC105	<i>Colletotrichum gossypii</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Campinas, SP	Não
2327	CG3LEM	<i>Colletotrichum gossypii</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Luís Eduardo Magalhães, BA	Não
2374	CNPA58	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporiodes</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Primavera do Leste, MT	Não
2379	CNPA63	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporiodes</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Mineiros, GO	Não
2384	CNPA71	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporiodes</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Itaquira, MT	Não
2388	IAC13350	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporiodes</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba, SP	Não
2389	IAC12405	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporiodes</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ituverava, SP	Não
2391	IAC5393	<i>Colletotrichum gossypii</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Campinas, SP	Não

Tabela 1 - Isolados utilizados no teste de especificidade dos *primers* para detecção de *Colletotrichum truncatum*. (Conclusão)

CML	Outro código	Espécie	Hospedeiro	Origem geográfica	Amplificação
2447	Ked01	<i>Fusarium tucumaniae</i>	<i>Glycine max</i>	Guarapuava, PR	Não
2448	Ked02	<i>Fusarium tucumaniae</i>	<i>Glycine max</i>	Guarapuava, PR	Não
2449	Ked03	<i>Fusarium tucumaniae</i>	<i>Glycine max</i>	Guarapuava, PR	Não
2450	Ked04	<i>Fusarium tucumaniae</i>	<i>Glycine max</i>	Guarapuava, PR	Não
2708	-	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Solo (Gossypium hirsutum)</i>	Montividiu, GO	Não
2734	-	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Semente (Glycine max)</i>	Ibiá, MG	Não
2737	-	<i>Aspergillus chevalieri</i>	<i>Semente (phaseolus vulgaris)</i>	Lavras, MG	Não
2884	CCJ73	<i>Colletotrichum siamense sensu lato</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Campo Grande, PB	Não
2882	CCJ32	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Anacardium occidentale</i>	Camocim, PE	Não
2888	CCJ105	<i>Colletotrichum tropicale</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Fortaleza, CE	Não
2893	CCJ204	<i>Colletotrichum asianum</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	São Luís, MA	Não
2922	MT46	<i>Colletotrichum siamense sensu lato</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Chokwé, MZ	Não
2931	MT68	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Pacajus, CE	Não
2934	MT71	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Beberice, CE	Não
2937	MT74	<i>Colletotrichum siamense sensu lato</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Fortaleza, CE	Não
3310	LabioMMi249	<i>Penicillium citrunum</i>	-	Teresina, PI	Não
3313	LabioMMi309	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	<i>Piper aducum</i>	São Carlos, SP	Não
3314	LabioMMi06	<i>Alternaria alternata</i>	-	Brasil	Não
3315	LabioMMi285	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Piper aducum</i>	São Carlos, SP	Não
3316	LabioMMi3311	<i>Colletotrichum gigasporum</i>	<i>Piper aducum</i>	Brasil	Não
3323	EM02	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Esmeraldina, PI	Não
3324	EC02	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Teresina, PI	Sim
3325	EM07	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Teresina, PI	Sim
3326	JM02	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Esmeraldina, PI	Sim
3327	CT01	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Esmeraldina, PI	Sim
3328	CT02	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Jaboticabal, SP	Sim
3329	JM01	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Esmeraldina, PI	Sim
3333	CAA70/1	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Annona crassiflora</i>	Umuzeiro, MG	Não
-	CAA81	<i>Colletotrichum karstii</i>	<i>Annona crassiflora</i>	Umuzeiro, MG	Não
3352	CAA107/1	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	<i>Annona</i> sp.	Acari, MG	Não
-	CAA115/1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Annona reticulata</i>	Acari, MG	Não
-	CAA137	<i>Colletotrichum fructicola</i>	<i>Annona crassiflora</i>	Acari, MG	Não
-	CAA198	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Annona crassiflora</i>	Lavras, MG	Não
3356	CAA202	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i>	Lavras, MG	Não

Abreviações das coleções de culturas: CML – Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais; LaBioMMi – Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo; LAPS – Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.