



**LUCAS FIDELIS PEREIRA**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*  
ASSOCIADOS À SARNA E À ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

**LAVRAS - MG  
2019**

**LUCAS FIDELIS PEREIRA**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* ASSOCIADOS  
À SARNA E À ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

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

Pereira, Lucas Fidelis.

Análise filogenética e caracterização de isolados do gênero  
*Coletotrichum* patogênicos ao feijoeiro / Lucas Fidelis Pereira. -  
2019.

55 p. : il.

Orientadora: Elaine Aparecida Souza.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Análise multilocus. 2. Antracnose. 3. Filogenia. I. Souza,  
Elaine Aparecida. II. Título.

**LUCAS FIDELIS PEREIRA**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* ASSOCIADOS  
À SARNA E À ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *COLLETOTRICHUM* ISOLATES ASSOCIATED  
WITH SCAB AND BEAN ANTHRACNOSIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 11 de março de 2019.

Dr. Evandro Novaes	UFLA
Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Dra. Quélen de Lima Barcelos	UFMT
Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães	UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, sem Ele este estudo poderia não se tornar realidade.

Aos meus pais, Ivaldo Fernando Andrade Pereira e Maria José Fidelis Pereira, por todo o amor, dedicação e sacrifício, esta vitória é tão minha quando suas.

Aos meus irmãos, Frederico e Fernando, mesmo longe, sempre comigo. À Marina por todo o amor, companheirismo e ajuda nestes últimos anos.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, em especial, Rafael, Larissa, Carlos Henrique, que ajudaram para que esta caminhada tivesse sido mais prazerosa.

À professora e orientadora Dra. Elaine Aparecida de Souza, pela confiança, ensinamentos e incentivo. A todos os professores do Programa de Genética e melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

A todos do Laboratório de Resistência de Plantas, pela agradável convivência, amizade, companheirismo e ajuda, sem vocês não seria possível realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

Entre as doenças que atacam o feijoeiro destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Nos últimos anos, linhagens de *Colletotrichum* spp, fase anamórfica e teleomórfica, têm sido isoladas de lesões de antracnose e, também, de sarna, uma doença emergente do feijoeiro. Essas linhagens de *Colletotrichum* têm sido investigadas por meio de caracterização morfológica e patogênica. No entanto, ainda, não há consenso sobre a filogenia dessas espécies envolvidas no patossistema *Colletotrichum*-antracnose-sarna-feijoeiro. Portanto o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro, por meio de análise filogenética multilocus, além da caracterização morfológica. Trinta e duas linhagens do gênero *Colletotrichum* isoladas de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro foram utilizadas na análise multilocus para os genes de actina,  $\beta$ -tubulina e GAPDH juntamente com 28 acessos do GenBank do gênero *Colletotrichum*. Dados morfológicos das linhagens também foram utilizados para a identificação das espécies envolvidas. A análise filogenética multilocus mostrou a associação das linhagens, em quatro clados distintos, sendo que seis linhagens foram agrupadas no clado de *C. lindemuthianum*, uma linhagem com *C. plurivorum*, sete linhagens foram associadas à *C. sojæ* e duas linhagens foram associada com *C. karstii*. Pelos resultados obtidos na filogenia multilocus e análise morfológica, foi possível constatar que as linhagens do presente trabalho associadas ao clado de *C. lindemuthianum* são, de fato, a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*. Assim, as linhagens avaliadas e associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro pertencem a um o complexo composto pelas espécies *C. lindemuthianum*, *C. sojæ* e *C. karstii*

Palavras-chave: Análise multilocus. Fitopatogenos. Filogenia.

## ABSTRACT

Anthracnose is one of the diseases that attack the common bean, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. In recent years, *Colletotrichum* spp lines, in the anamorphic and teleomorphic phases, have been isolated from anthracnose and scab lesions, the second an emerging disease on the common bean. These *Colletotrichum* lines have been investigated through morphological and pathogenic characterization. However, there is still no consensus on the phylogeny of these species involved in the *Colletotrichum*-anthracnose-scab-common bean pathosystem. Therefore, the objective of this work was to identify species associated with anthracnose and scab on the common bean through multilocus phylogenetic analysis and morphological characterization. We used 32 lines of the *Colletotrichum* genus isolated from anthracnose and scab lesions on common beans in the multilocus analysis for genes actin,  $\beta$ -tubulin, and GAPDH along with 28 GenBank accesses from the *Colletotrichum* genus. We also used morphological data from the lines to identify the species involved. The multilocus phylogenetic analysis indicated the association of the lines in four distinct clades, with six lines grouped in the *C. lindemuthianum* clade, one line in *C. plurivorum*, seven lines associated with *C. sojae*, and two lines associated with *C. karstii*. The results from the multilocus phylogeny and morphological analyses showed that the lines associated with the *C. lindemuthianum* clade are the teleomorphic phase of *C. lindemuthianum*. Therefore, the lineages evaluated and associated with anthracnose and scab from the common bean belong to a complex composed by the species *C. lindemuthianum*, *C. sojae*, and *C. karstii*.

**Keywords:** Multilocus analysis. Phytopathogens. Phylogeny.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore filogenética multilocus dos genes actina e  $\beta$ -tubulina concatenados..... 34
- Figura 2 - Imagens do caule, vagem e grãos do feijoeiro com sintomas da antracnose/sarna e fotos da placa e de ascos, ascósporos e conídios de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*. ..... 37
- Figura 3 - Imagens da folha, caule e vagem do feijoeiro com sintomas da sarna e fotos da placa e ascósporos de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*. ..... 38
- Figura 4 - Imagens de lesões de antracnose na folha, caule, vagem e grão do feijoeiro e placa e conídios de linhagens de *C. lindemuthianum*. ..... 39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens do gênero <i>Colleotrichum</i> patogênicos ao feijoeiro, utilizadas na análise filogenética multilocus com as informações prévias sobre o hospedeiro, espécie, doença, em que foi isolada a linhagem, tipo de colônia e reação das linhagens aos primers de <i>C. lindemuthianum</i> , <i>Glomerella</i> e <i>C. truncatum</i> . ....	23
Tabela 2 - Primers utilizados para a análise multilocus. ....	25
Tabela 3 - Linhagens do GenBank, utilizadas na análise filogenética multilocus e seus hospedeiros, país de origem, número do aceso e dos genes ACT, TUB2 e GAPDH. ....	28
Tabela 4 - Estimativas do diâmetro colonial (DC) em mm, comprimento, largura em $\mu\text{m}$ , formato e tipo dos esporos e porcentagem de formação de CAT's. ....	35

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1	Antracnose do feijoeiro .....	12
2.2	Sarna do feijoeiro.....	13
2.3	Gênero <i>Colletotrichum</i> .....	14
2.4	<i>Colletotrichum</i> fase sexual.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1	Obtenção dos isolados do gênero <i>Colletotrichum</i> .....	23
3.2	Extração do DNA total.....	24
3.3	Análise filogenética multilocus .....	25
3.3.1	Reações de PCR .....	25
3.3.2	Sequenciamento .....	26
3.3.3	Filogenia de linhagens do gênero <i>Colletotrichum</i> .....	26
3.4	Avaliação das características morfológicas.....	30
3.4.1	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM).....	30
3.4.2	Caracterização das dimensões, forma e tipo de esporos.....	30
3.4.3	Caracterização do tipo de colônia formada .....	31
4	RESULTADOS .....	32
4.1	Análise filogenética multilocus .....	32
4.2	Análise dos caracteres morfológicos.....	35
5	DISCUSSÃO .....	40
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO A - Árvore filogenética de isolados de <i>C. lindemuthianum</i> , <i>C. plurivorum</i> e <i>glomerella</i> para a região gênica ITS .....	52
	ANEXO B - ÁRVORE FILOGUENÉTICA DO GENE DE B-TUBULINA .....	53
	ANEXO C - ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GENE ACTINA .....	54
	ANEXO D - Árvore filogenética do gene GAPDH.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum é uma cultura de importância econômica e social no Brasil e em outros países no mundo. A ocorrência de doenças é um dos fatores que causa prejuízos à cultura. Entre as doenças que atacam o feijoeiro, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Nos últimos anos, linhagens de *Colletotrichum* spp, fase anamórfica e também a fase teleomórfica, têm sido isoladas de lesões de antracnose e, ainda, da sarna do feijoeiro (BARCELOS et al., 2014; DIAS, 2017; MOTA et al., 2016). Essas linhagens de *Colletotrichum* têm sido investigadas por meio de caracterização, morfológica e patogênica (BARCELOS et al., 2014; DIAS, 2017; MARTINS, 2019; MOTA et al., 2016). A sarna é uma doença emergente inicialmente atribuída ao fungo *Colletotrichum truncatum* (COSTA et al., 2001). No entanto ainda não há consenso sobre o agente etiológico. As informações obtidas nesses trabalhos evidenciam que diferentes espécies de *Colletotrichum* co-habitam lesões de antracnose e sarna.

O feijoeiro no Brasil pode ser cultivado, em três épocas, semeadura em fevereiro-março, abril-julho e outubro-novembro, em diferentes regiões, com condições climáticas divergentes. Além disso, diferentes cultivares são utilizadas, nas regiões de cultivo, sendo que, normalmente, os produtores utilizam os grãos colhidos como semente para o próximo plantio. Esse fato contribui para que patógenos, tais como os que causam a antracnose e sarna, sejam disseminados por meio de sementes contaminadas. Em muitas regiões, o cultivo do feijoeiro ocorre em sucessão à soja ou ao milho. Portanto toda essa diversidade, nos sistemas e condições, a que a cultura do feijoeiro é submetida, torna esse patossistema feijão/antracnose/sarna singular. Todo esse cenário pode explicar a variabilidade das linhagens de *Colletotrichum* spp. que tem sido relatada na literatura (BARCELOS et al., 2014; KIMATI; GALLI, 1970; RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2005; SHEAR; WOOD, 1913).

A filogenia no gênero *Colletotrichum* é um desafio, e vários complexos já foram identificados e estudos refinados, por meio de filogenia molecular multilocus, têm sido realizados por vários autores, como: Cannon et al. (2012), Damm et al. (2014, 2019), Phoulivong et al. (2010), Weir, Damm e Johnston (2012), Yang et al. (2009) e, no caso particular de *C. lindemuthianum*, Liu et al. (2013).

O controle da antracnose, por meio de cultivares resistentes, é dificultado pela ampla variabilidade genética e patogênica das populações de *C. lindemuthianum*. Acerca dessa ampla variabilidade, nos últimos anos, foram obtidas linhagens da fase telomórfica do fungo

*C. lindemuthianum*, a partir de lesões de antracnose. Essas linhagens têm sido investigadas, por meio de caracterização morfológica, molecular e patogênica, os resultados indicam que essas linhagens não são a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* (BARCELOS et al., 2014). Somados a esse fato, Mota et al. (2016) realizaram testes de patogenicidade com isolados de *Colletotrichum* oriundos de lesões de antracnose do feijoeiro. Tais estudos revelaram que, após a inoculação de alguns desses isolados, ocorreu o aparecimento de sintomas, nas vagens, típicos da sarna do feijoeiro. Além disso, Dias (2017), trabalhando com linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*, obtidas de lesão da sarna do feijoeiro, observou que, quando reinoculados no feijoeiro, provocavam lesões típicas da antracnose, indicando que há um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum* co-habitando e sendo patogênico ao feijoeiro comum.

Baseado em relatos acima, torna-se necessária a identificação das espécies envolvidas no patossistema sarna-*Colletotrichum*-antracnose. Porém a determinação de espécies dentro do gênero *Colletotrichum* não tem sido uma tarefa fácil, visto que há uma enorme variabilidade, do ponto de vista da caracterização patogênica, morfológica e genética quanto ao gênero. Além disso, o emprego de diferentes abordagens, para a identificação das espécies, durante o estudo do gênero, tem dificultado a comparação dos dados ao longo das décadas. Atualmente a determinação das espécies do gênero *Colletotrichum* é realizada, por meio de análises filogenéticas multilocus, associada à avaliação de características morfológicas (WEIR; DAMM; JOHNSTON, 2012). A maioria dos estudos com espécies patogênicas tem revelado a presença de mais de uma espécie causando a doença no hospedeiro, ou seja, a presença de um complexo de espécies patogênicas. Nestes trabalhos, tem sido utilizada a análise filogenética molecular multilocus com genes como ITS, actina (ACT),  $\beta$ -tubulina (TUB2), glutamina sintetase (GS) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), entre outros.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é identificar as diferentes espécies de *Colletotrichum* oriundas de lesões de sarna e antracnose do feijoeiro por meio da análise multilocus e caracterização morfológica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Antracnose do feijoeiro

A antracnose do feijoeiro é umas das principais doenças que afetam a cultura. A doença é encontrada, em diversos países da África, Ásia, Europa e América, ocasionando grandes perdas econômicas. No Brasil, a antracnose está presente, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARNEIRO et al., 2014). Comumente encontrada nas três safras, em que o feijoeiro é cultivado, a doença é mais intensa e presente na safra das águas, pois o patógeno encontra condições favoráveis, para o desenvolvimento da doença, ocasionando sintomas na planta e manchas nos grãos, depreciando a sua qualidade, deixando-os indesejáveis para o consumo (MIKLAS et al., 2006; PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006).

O agente etiológico da antracnose é *Colletotrichum lindemuthianum*, fungo filamentososo com comportamento hemibiotrófico, ou seja, no início do desenvolvimento da doença, o fungo somente absorve nutrientes do hospedeiro, sem causar a morte celular, porém, nas fases finais, apresenta comportamento necrotrófico (PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001). O patógeno penetra na planta pela cutícula e epiderme com o auxílio de apressórios formados nas extremidades de tubos germinativos (BAILEY; JEGER, 1992). O fungo apresenta ampla variabilidade genética, o que dificulta o seu controle, principalmente, por meio de cultivares resistentes. Essa alta variabilidade tem sido atribuída a mutações naturais e ampliada por processos, tais como ciclo sexual, parassexual, anastomose entre hifas, elementos transponíveis e anastomose entre conídios (ISHIKAWA et al., 2012). Os sintomas da doença ocorrem, em várias partes da planta, incluindo folhas, caules, vagens e sementes. Ao longo do desenvolvimento da planta, pequenas machas de cor vermelho-alaranjado são observadas na face abaxial das folhas. Com o tempo, essas lesões tornam-se mais escuras e atacam o caule da planta, ocasionando-lhe manchas e cancos. Os sintomas nas vagens são caracterizados por lesões arredondadas, apresentando depressões de tamanho variável, delimitado por um anel negro. As lesões podem coalescer e cobrir boa parte da vagem e, em condições favoráveis, podem formar massas de esporos de cor rosa no centro das lesões. As sementes contaminadas apresentam descoloração do tegumento até lesões escuras com depressões, tornando o produto final indesejado (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

A temperatura ótima, para o desenvolvimento da doença, varia de 13 a 27 °C, associado à elevada umidade relativa do ar (KIMATI et al., 1997). Essas condições são

observadas com maior frequência, na safra das águas, em que o alto índice pluviométrico confere a essa safra maior incidência da doença (PINTO; POZZA; TALAMINI, 2001). A dispersão da doença pode ocorrer de diferentes formas, por meio da disseminação de sementes infectadas, uso de utensílios agrícolas que tiveram contato com o patógeno, ou mesmo por meio de insetos (BARBOSA; GONZAGA, 2012; VIEIRA; VIEIRA; RAMOS, 1993). Além disso, o fungo pode permanecer na lavoura de uma safra para outra, por meio de micélio dormente no tegumento da semente ou em restos culturais (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006; SARTORATO; RAVA, 1994).

Os prejuízos causados pela doença podem chegar a 100% em casos em que a infecção tem origem em sementes infectadas e em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. O controle da doença pode ser realizado, por meio de práticas culturais diversas, como a rotação de cultura, eliminação de restos culturais e utilização de fungicidas. Porém o uso contínuo de defensivos é nocivo, para o solo e para a saúde humana, além de aumentar os custos de produção (SARTORATO; RAVA, 1994). Dessa forma, a melhor estratégia, para o controle da doença, é a utilização de cultivares resistentes, pois é a forma mais eficiente, econômica e menos nociva ao ambiente e ao homem. Entretanto, para que essa metodologia tenha êxito, devem-se conhecer vários aspectos relacionados a doenças, como a variabilidade dentro e entre diferentes populações do patógeno e quais raças predominam em cada região de cultivo do feijoeiro, além de ter que lidar com a grande variabilidade do patógeno e seus diversos mecanismos de ampliação da variabilidade genética, o que dificulta a obtenção de resistência durável (PINTO et al., 2012; SINGH; SCHWARTZ, 2010).

## **2.2 Sarna do feijoeiro**

A sarna do feijoeiro é uma doença fúngica que vem ganhando importância, nos últimos anos, pelo aumento da sua incidência nos campos de produção do feijoeiro. A doença está presente, sobretudo, nos estados de Minas Gerais e Goiás (COSTA et al., 2001). Os estudos pioneiros sobre a doença foram realizados por Costa et al. (2001). Nesse trabalho, os autores, por meio de análise morfológica, patogênica e pela técnica molecular RAPD, atribuíram ao fungo *C. truncatum* a etiologia da doença.

Os sintomas podem começar ainda no estágio de plântulas, em que aparecem manchas pretas com bordas avermelhadas no caule e nas folhas; nas vagens, os sintomas são o aparecimento de pequenas manchas avermelhadas, que se assemelham à sarna. Em condições favoráveis, o patógeno se espalha por toda a planta, podendo levar à queda de todas as vagens

e à sua posterior morte prematura (COSTA et al., 2001). O fungo *C. truncatum*, também, é patogênico, para uma variedade de hospedeiros, como soja, lentilha e feijão fava. Porém, nessas culturas, a doença é denominada antracnose. O controle da sarna ainda não está bem estabelecido. Contudo algumas medidas podem ser tomadas, para o controle da doença, como a utilização de sementes sadias, visto que a doença é transmitida via sementes. O uso de fungicidas, além de nocivo, não tem se mostrado eficiente (COSTA et al., 2001).

Os sintomas da sarna do feijoeiro, nas folhas e no caule, são muito semelhantes aos observados na antracnose do feijoeiro, sendo facilmente distinguíveis apenas nas vagens. Dias (2017) e Mota et al. (2016), utilizando linhagens oriundas de lesão de antracnose, já caracterizadas por Barcelos et al. (2014), realizaram testes de patogenicidade com tais linhagens, reinoculando-as no feijoeiro. Entretanto as linhagens não causaram os sintomas típicos da antracnose e, sim, os sintomas típicos da sarna do feijoeiro. No trabalho de Mota et al. (2016), os isolados que causaram sintomas típicos da sarna na vagem apresentaram conídios fusiformes e cilíndricos, o que também foi observado por Dias (2017). Esses trabalhos evidenciam que há dúvidas sobre agente etiológico da sarna ou se mais de uma espécie está associada a esta doença.

### **2.3 Gênero *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* apresenta muitas espécies patogênicas (AZEVEDO, 1998; MENEZES, 2002). Mais de 900 espécies foram descritas, em todo o mundo, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, causando doenças que impactam economicamente muitas culturas, entre elas, gramíneas, leguminosas, hortaliças e culturas perenes, incluindo frutíferas (BAILEY; JEGER, 1992; FREEEMAN; KATAN; SHABI, 1998; SUTTON et al., 1980).

No início dos estudos sobre o gênero, acreditava-se que havia uma alta especificidade do patógeno com seus hospedeiros e inúmeras espécies do patógeno foram descritas. Foi observado, porém que a alta especificidade e o número de espécies descritas não correspondiam com a realidade e este número foi reduzido a poucas dezenas, por meio de estudos da morfologia dos conídios e características da colônia (SUTTON et al., 1980).

A ampla variabilidade do gênero tem sido observada em características morfológicas, tais como: cor do micélio e tamanho de conídio, aspectos taxonômicos, mecanismos de patogenicidade e especificidade com o hospedeiro (BRYSON; CATEN; HOLLOMON, 1992). Os critérios, para a identificação de diferentes linhagens de fungos, ao nível de gênero, estão bem estabelecidos, no entanto não se tem um consenso sobre os critérios, para a

identificação de espécies dentro do gênero, causando problemas principalmente em grupos como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (WEIR; DAMM; JOHNSTON, 2012).

A identificação de diferentes espécies dentro do gênero *Colletotrichum* foi feita, durante muitos anos, somente por meio de características morfológicas (SUTTON, 1992). Todavia poucos caracteres morfológicos são, de fato, informativos, para a diferenciação entre espécies, além disso, esses caracteres apresentam alta variabilidade e são muito influenciados pelo ambiente, o que dificulta a separação acurada dos indivíduos em diferentes espécies (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; HYDE et al., 2009). Além dos problemas relacionados às características morfológicas e culturais, a errônea ideia de que a espécie do gênero *Colletotrichum* tinha alta especificidade com o hospedeiro levou a um aumento indiscriminado, no número de espécies descritas dentro do gênero *Colletotrichum*. O número de espécies pertencentes ao gênero chegou a 750 em meados do século XX. Porém o trabalho desenvolvido por Von Arx (1957), em que alocaram-se as 750 espécies do gênero, em 23 táxons, foi o passo inicial para uma nova era na filogenia do gênero *Colletotrichum*. O autor se baseou, principalmente, nas características morfológicas e culturais e não na patogenicidade (CANNON et al., 2012).

Visando obter maior precisão na identificação de espécies, técnicas mais eficientes na classificação foram obtidas. Nesse contexto, foram desenvolvidas técnicas moleculares que permitem a análise das sequências de bases de determinada região do DNA. Dessa forma, foi possível trabalhar com parâmetros mais robustos, pois as sequências de DNA sofrem menos influências ambientais que as características morfológicas (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000). Com o desenvolvimento e a popularização das técnicas moleculares, vários trabalhos, utilizando essa metodologia, foram realizados, para a classificação correta de espécie dentro do gênero *Colletotrichum*. Nesse contexto, a análise multilocus vem sendo utilizada com sucesso para a identificação de espécies dentro do gênero *Colletotrichum* (WEIR; DAMM; JOHNSTON, 2012). O uso de técnicas moleculares multilocus associado à caracterização tradicional morfológica é, atualmente, a melhor abordagem para a identificação de espécies dentro do gênero *Colletotrichum* (CAI et al., 2009).

Para essa análise multilocus, vários genes vêm sendo utilizados, tais como: Internal transcribed spacer (ITS), altamente conservado e localizado entre os genes 18SrDNA e 26SrDNA. Essa região é muito conservada dentro da mesma espécie, porém pode variar, em tamanho e na sequência das bases entre espécies, sendo muito útil em estudos filogenéticos (HILLIS; DIXON, 1991; WHITE et al., 1990). O gene da actina (ACT), também, é muito usado, em estudos filogenéticos, pois possui sequência altamente conservada (>90%). Essa



proteína tem função estrutural importante e é responsável por manter a forma e a mobilidade da célula, além de ser um dos principais componentes dos microfilamentos do citoesqueleto (BAGSHAW et al., 1982). O gene da  $\beta$ -tubulina (TUB2) tem importante papel estrutural, sendo o principal componente dos microtúbulos, que associado a outras proteínas permite a segregação dos cromossomos. A TUB2 é um constituinte dos flagelos, estrutura responsável pela mobilidade da célula (FAGUY; DOOLITTLE, 1998). O gene da glutamina sintetase (GS) vem sendo utilizado por sua estrutura conservada. A glutamina sintetase tem função no metabolismo dos fungos, sendo componente importante de uma das principais vias de absorção de amônia, a qual é fonte de nitrogênio inorgânico para os fungos filamentosos (MIFLIN; HABASH, 2002). O gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é outro gene usado nas análises multilocus (BRAGANÇA, 2013; CANNON et al., 2012; WEIR; DAMM; JOHNSTON, 2012). Essa enzima tem função, no metabolismo dos fungos, sendo uma das principais enzimas envolvidas na assimilação de nitrogênio inorgânico (BRUN et al., 1992).

Liu et al. (2013) realizaram estudos filogenéticos dentro do gênero *Colletotrichum*, com 83 linhagens isoladas de 43 hospedeiros diferentes, com base em dados morfológicos, tais como: tamanho de conídio, taxa de esporulação, formação de apressórios e coloração da colônia, juntamente com dados moleculares de cinco genes (ACT, CHS-1, GAPDH, ITS e TUB2). Essa análise alocou as 83 linhagens, em três clados principais: *C. coccodes*, *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum nigrum* e, em mais 21 outras espécies, evidenciando a complexidade da filogenia dentro do gênero *Colletotrichum*. No mesmo trabalho, os autores observaram valores relacionados às dimensões conidiais de  $11.5\text{--}21 \times 3.5\text{--}5 \mu\text{m}$ , que estão de acordo com a descrição original da espécie, feita por Von Arx (1957), cujos valores foram de  $11\text{--}19 \times 4\text{--}6 \mu\text{m}$ . Apesar de os trabalhos de Cannon et al. (2012) alocarem isolados de *C. lindemuthianum* dentro do mesmo clado de *C. orbiculare*, estudos mais recentes, realizados por Liu et al. (2013), classificaram os isolados de *C. lindemuthianum*, em um clado separado das demais espécies do gênero *Colletotrichum*, indicando que esses isolados de *C. lindemuthianum* compõem um grupo monofilético único.

Entretanto não há consenso sobre a real posição filogenética dos isolados de *C. lindemuthianum* e sua fase telomórfica, visto que estudos, utilizando os genes ITS e GS, alocaram linhagens do referido grupo juntamente com acessos de *C. boninense*, pertencente a outro complexo de espécies (DAMM et al., 2012). Damm et al. (2019) também relatam que linhagens de *Ga. lindemuthiana* e *C. plurivorum* são semelhantes, quanto à morfologia dos ascos e sua organização, indicando que tais linhagens podem pertencer à mesma espécie. No

mesmo trabalho citado acima, Damm et al. (2019) realizaram um Blast de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* oriundas do feijoeiro, caracterizadas por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), com sequências do GenBank. Eles observaram 99% de identidade com linhagens de *Ga. glycine* oriundas da soja, aumentando ainda mais as dúvidas sobre a real posição filogenética do grupo em questão.

Weir, Damm e Johnston (2012) realizaram estudos filogenéticos dentro do complexo *C. gloeosporioides*, utilizando a abordagem multilocus com base em oito genes: Actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CH-1), gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPDH), glutamina sintetase (GS), magnésio sueroxido dismutase (SOD2),  $\beta$  tubulina (TUB2) e regiões ITS. Além dos estudos moleculares, foram realizados estudos morfológicos, tais como: tamanho do conídio, formação de apressórios, formação de peritécios e morfologia da colônia. As 158 linhagens, que anteriormente eram classificadas como *C. gloeosporioides*, foram separadas em 22 clados distintos.

Guarnaccia et al. (2017) realizaram estudos filogenéticos multilocus, em 82 isolados de *Colletotrichum* spp oriundos de lesões de antracnose de diversas espécies de citros, coletados em mais de 70 regiões produtoras de citros, no continente europeu. Para a análise multilocus, os autores utilizaram os genes ITS (espaçadores internos transcritos), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), ACT (actina), CAL (calmodulina), CHS1(quitina sintase) HIS3 (histona 3) e TUB2 (beta-tubulina). A partir da análise concatenada desses genes, os isolados foram agrupados em três grandes clados do gênero *Colletotrichum*. Dentre os 82 isolados, 50 foram agrupados no complexo *C. gloeosporioides*, 30 foram agrupados dentro do complexo *Colletotrichum boninense* e dois isolados foram alocados ao complexo *C. acutatum*, evidenciando a grande variabilidade do gênero *Colletotrichum*. Trabalhos semelhantes, utilizando abordagem multilocus dentro do gênero *Colletotrichum*, também, foram realizados por Bragança (2013), Damm et al. (2014), Pardo-De la Hoz et al. (2016), Phoulivong et al. (2010) e Velho et al. (2015).

Atualmente as espécies do gênero *Colletotrichum* estão agrupados, em complexos de espécies, em que se destacam nove grandes clados. O primeiro deles, no complexo Acutatum, neste grande grupo, estão alocadas em torno de 26 espécies relacionadas, como *C. sloanei*, *C. nymphaeae*, *C. limeticola*, *C. acutatum*, entre outras. No complexo Graminicola, então alocados por volta de 13 espécies, como: *C. falcatum*, *C. sublineoa*, *C. cereale*, *C. graminicola*, entre outras. No terceiro grande clado, composto por cinco espécies, destaca-se a espécie *C. spaethianum*, juntamente com *C. liriopes*, *C. tofieldiae* e *C. verruculosum* e *C. lilii*. O quarto complexo é denominado Destructivum, com aproximadamente cinco espécies, entre

elas: *C. higginsianum*, *C. tabacum*, *C. linicola* e *C. destructivum*. No complexo Demantiun estão associados seis espécies: *C. lineola*, *C. fructi*, *C. anthrisci*, *C. circinans*, *C. spinaciae* e *C. dematium*. O sexto complexo é composto por, aproximadamente, 22 espécies relacionadas, denominado de Gloeosporioides, é um dos clados que apresentam maior variabilidade, com a presença das espécies: *C. fructicola*, *C. salsolae*, *C. siamense*, *C. tropicale*, *C. musae*, *C. kahawae*, *C. gloeosporioides*, entre outras. O sétimo clado é denominado Boninense, composto por aproximadamente 16 espécies, em que se destacam *C. constrictum*, *C. brasiliense*, *C. karstii*, *C. colombiense* e *C. boninense*. O complexo Truncatum é um dos mais coesos, composto por apenas três espécies: *C. truncatum*, *C. jasminigenum* e *C. curcumae*. O nono complexo é denominado Orbiculare e composto pelas espécies *C. orbiculare* e *C. lindemuthianum* (CANNON et al., 2012; CROUCH et al., 2014).

Além das espécies alocadas dentro dos nove grandes grupos citados acima, há outras espécies dentro do gênero *Colletotrichum* que formam grupos monofiléticos, também caracterizados como complexos de espécies, assim como o complexo Orchidearum, composto por nove espécies, em que se destacam as espécies *C. plurivium*, *C. sojae* e *C. orchidearum*. Outro clado monofilético, já relatado na literatura, é o complexo Magnum, composto por 10 espécies, dentre elas, *C. cacao*, *C. dracaenophilum*, *C. brevisporum* e *C. magnum*. *Dracaenophilum* é o nome dado a outro complexo de espécies dentro do gênero *Colletotrichum*, composto por seis espécies, destacando-se as espécies *C. yunnanense*, *C. tropicicola* e *C. dracaenophilum* (DAMM et al., 2019).

Ainda há espécies que não fazem parte de tais complexos, porém formam grupos mono e/ou parafiléticos com algumas espécies que integram os grandes clados. Por exemplo, a espécie *C. clivae* forma grupo parafilético com linhagens de *C. lindemuthianum* e monofilético com *C. brevisporum*, assim como as espécies *C. trifollii* que formam grupo parafilético com linhagens de *C. orbiculare* e monofilético com linhagens de *C. lindemuthianum* (DAMM et al., 2013; DIAO et al., 2017; LIU et al., 2013; LOBUGLIO; PFISTER, 2008).

Apesar de o advento das técnicas moleculares terem contribuído à identificação das espécies dentro do gênero *Colletotrichum*, a inconsistência à tipificação dos espécimes usados, para descrever as espécies e as diferentes abordagens no estudo do gênero, são, ainda, um grande problema para a identificação correta em nível de espécie. Para resolver esse problema, as espécies aceitas dentro do gênero devem ter seus epítipos ou neótipos devidamente tipificados, dessa forma, facilitando as comparações e classificação das espécies dentro do gênero (CANNON et al., 2012).

## 2.4 *Colletotrichum* fase sexual

A fase sexuada do patógeno *C. lindemuthianum*, conhecida como *Glomerella lindemuthiana* (syn. *G. lindemuthianum*, *G. cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk f. sp. *phaseolis*), foi inicialmente descrita por Shear e Wood, em 1913, a partir de isolados obtidos de lesões de vagens do feijoeiro (SHEAR; WOOD, 1913).

A colônia é caracterizada pela formação de peritécios com diâmetro variando de 120 a 210  $\mu\text{m}$ , que podem ou não apresentar rostros que, se presentes, medem de 30 a 80  $\mu\text{m}$ , sendo o canal do peritécio formado por paráfises hialinas e filiformes. Inicialmente apresenta parede na cor hialina, tornando-se negra. No interior de cada peritécio, são encontrados, em média, 30 ascos, com dimensões de 60 x 6  $\mu\text{m}$  revestidos por paráfises hialinas e filiformes. Cada asco pode carregar de um a oito ascósporos, podendo apresentar ascósporos alantoides, medindo 6,5 a 20  $\mu\text{m}$ , ou ascósporos elipsoidais com tamanho variando de 4 a 10  $\mu\text{m}$  (BAILEY; JEGER, 1992; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003).

Shear e Wood (1913), nos primeiros estudos sobre a fase sexual das linhagens de *C. lindemuthianum*, também, realizaram a caracterização dos esporos, observando estruturas cilíndricas que apresentavam valores variando de 10–14.5 x 4–5.5  $\mu\text{m}$ . Porém não há um consenso sobre as dimensões das estruturas reprodutivas dessas linhagens oriundas do feijoeiro. Kimati e Galli (1970), trabalhando com o referido grupo, observaram ascósporos de dois tipos, o primeiro grupo de ascósporos apresentava dimensões de 20 x 6.5  $\mu\text{m}$ , enquanto o segundo grupo tinha médias 10 x 4  $\mu\text{m}$ , próximas ao relatado por Shear e Wood (1913). Em estudos mais recentes, Rodriguez-Guerra et al. (2005) realizaram a caracterização dos esporos de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* oriundas do feijoeiro e obtiveram valores intermediários, quando comparados aos dois trabalhos citados acima, observando ascósporos com dimensões que variavam de 15.5–29 x 4.5–7  $\mu\text{m}$ , evidenciando a alta variabilidade morfológica do grupo em questão.

O ciclo sexual é dividido em quatro etapas: iniciação do peritécio, plasmogamia (fusão celular), cariogamia (fusão dos núcleos), seguido por divisão meiótica (WHEELER, 1954). O ciclo sexual tem seu início com a ramificação na proximidade dos septos das hifas de duas células unicelulares. Posteriormente, ocorre o crescimento externo das hifas, dando origem a duas células, chamadas de hifas de copulação interna e hifas de copulação externa. A hifa de copulação interna forma o ascogônio e a hifa de copulação externa, a parede celular do peritécio. Após a realização desses processos, ocorre a fusão do ascogônio com as hifas de copulação, desencadeando o desenvolvimento das hifas ascógenas, os primórdios dos ascos, a

cariogamia, a meiose, a mitose pós-meiótica, o desenvolvimento completo dos ascósporos e, por fim, a formação completa da parede peritecial (MCGAHEN; WHEELER, 1951; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003; WHEELER, 1954).

Características coloniais de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram descritas, primeiramente, por Edgerton (1912), ao observar a produção de peritécios em placas de Petri. As linhagens autoférteis foram separadas, em dois tipos de colônia, denominadas "minus", quando produziam peritécios de forma dispersa na placa e "plus" quando formaram peritécios aglomerados. Em trabalho realizado por Lucas, Chilton e Edgerton (1944), linhagens denominadas "minus" e "plus" foram cruzadas, obtendo-se sete tipos de segregações distintas para as características cor, tamanho de conídios, fertilidade da colônia e distribuição dos peritécios na colônia.

Chilton e Wheeler (1949) propuseram a classificação das linhagens, conforme o tipo de colônia em quatro grupos distintos: 1) Conidial A: linhagens não periteciais que apresentam produção de conídios em massas de esporos. 2) Conidial B: linhagens não periteciais que produzem conídios esparsos. 3) Plus: linhagens periteciais com produção de peritécios em grumos e 4) Minus: linhagens periteciais com produção de peritécios espalhados.

Pinto et al. (2012) observou que isolados de classificação "plus" e "minus" formaram linha de contato com peritécios com isolados conidiais de qualquer tipo, indicando a ocorrência de cruzamento. Porém, quando confrontados entre si, os isolados periteciais, independente do tipo de colônia, não foi constatada a formação da linha de contato, indicando que tais isolados são incompatíveis, corroborando com os estudos realizados por Chilton e Wheeler (1949).

Em um estudo efetivado por Barcelos et al. (2014), 73 linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*, isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro, foram caracterizadas quanto ao tipo de colônia, das quais, 24 foram classificadas como conidial A, 29 como conidial B, 11 como "plus" e nove como "minus". O comportamento sexual das 73 linhagens em cruzamentos foi avaliado por meio de pareamentos em todas as combinações duas a duas. A presença de peritécios férteis, na linha de contato entre as linhagens, somente foi observada entre colônias periteciais e conidiais, indicando, portanto compatibilidade sexual entre essas linhagens.

Os fungos podem ser divididos em dois sistemas de reprodução: homotáticos (autoférteis) e heterotáticos (autoinférteis). Indivíduos classificados como homotáticos possuem a capacidade de se reproduzirem sem a necessidade de um parceiro, dessa forma, a reprodução sexual é realizada sem que ocorra diferenciação genética dos descendentes em

relação ao genitor. Por outro lado, linhagens classificadas como heterotáticas possuem a capacidade de reproduzirem somente com a presença de outro indivíduo (CISAR; TEBEEST, 1999; KRONSTAD; STABEN, 1997).

Camargo Junior et al. (2007) realizaram cruzamentos, em todas as combinações entre oito linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*, isoladas de lesões da antracnose do feijoeiro. Os autores observaram a compatibilidade em 13 dos cruzamentos, sendo verificada a ocorrência de comportamento heterotático e homotático das linhagens.

Há relatos de linhagens da fase sexual de *C. lindemuthianum* que apresentaram comportamento exclusivamente heterotático, ou seja, linhagens autoinférteis (BATISTA et al., 1982; KIMATI; GALLI, 1970) e linhagens homotáticas, ou seja, autoférteis (MENDES-COSTA, 1996; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010). Esses fatos evidenciam ainda mais a complexidade da reprodução sexual dessas linhagens.

Estudos realizados por Macgahen e Wheeler (1951) sobre os genes de acasalamento, em linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*, evidenciaram a existência de dois locos, denominados de A e B, com três alelos cada. Wheeler (1954), com base em estudos prévios, propôs que as formas heterotáticas poderiam ter se originado a partir de linhagens homotáticas. Tal fenômeno teria ocorrido por meio de mutações em genes relacionados com a reprodução sexual. A existência do ciclo sexual completo, em algumas espécies, facilita o estudo da genética desses organismos, como no caso do gênero *Colletotrichum*.

Estudos filogenéticos, utilizando isolados da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* oriundos do feijoeiro, são escassos na literatura, porém destacam-se os estudos realizados por Barcelos et al. (2014). Nesse trabalho, os autores estudaram as linhagens de *Colletotrichum* isoladas de lesões da antracnose do feijoeiro, juntamente com outras linhagens do gênero *Colletotrichum*. Por meio da análise molecular, utilizando os genes HGM box, ITS1 e ITS4, os autores observaram que as linhagens não foram agrupadas junto com as linhagens de *C. lindemuthianum*. As linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram divididas em dois grupos; o primeiro foi relacionado com linhagens de *C. gloeosporioides* e outro grupo com o patógeno de *cucurbitácea*, *G. magna*. As linhagens associadas à *G. magna* do trabalho de Barcelos et al. (2014) foram comparadas, por meio da ferramenta BLAST do NCBI, com sequências de outras espécies do gênero *Colletotrichum* do GenBank. Foram observados 99% de coincidência com linhagens de *Ga. Glycines*, atualmente alocadas no complexo *Orchidearum*, porém outros locus devem ser analisados para que se tenha a real posição filogenéticas dessas linhagens (DAMM et al., 2019).

Entretanto estudos realizados por Weir, Damm e Johnston (2012), com várias espécies dentro do gênero *Colletotrichum*, não demonstraram resultados iguais aos encontrados por Barcelos et al. (2014), visto que as espécies de *C. lindemuthianum* e sua variante telomórfica, *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, não foram relacionadas intimamente com linhagens de *C. gloeosporioides*, evidenciando a complexidade dos estudos das variantes telomórficas do gênero.

Mota et al. (2016) trabalharam com isolados da fase sexual e assexual de *C. lindemuthianum*, ambas oriundas da antracnose do feijoeiro e com isolados oriundos da sarna do feijoeiro. Por meio da análise molecular, utilizando marcadores IRAP, os isolados de *C. lindemuthianum* foram classificados, em um grupos separados, mais próximos aos isolados oriundos de sarna, enquanto os isolados da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram alocados em dez clados distintos e relativamente distantes da sua fase anamórfica. Portanto há a necessidade de estudos filogenéticos sobre as fases sexuais das espécies do gênero *Colletotrichum*. A escassez de estudos relacionados às fases sexuais do gênero podem ser relacionadas à falta de patogenicidade ou baixa intensidade dos sintomas causados por essas linhagens, levando à falsa ideia de que as variantes telomórficas eram menos importantes e, por isso, menos estudadas, para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença (CANNON et al., 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, no Laboratório de Genética Molecular no departamento de Biologia e no Laboratório de Microscopia Ultra Estrutural no Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras.

#### 3.1 Obtenção dos isolados do gênero *Colletotrichum*

Foram utilizadas 31 linhagens monospóricas (TABELA 1) de espécies do gênero *Colletotrichum* para a realização da análise filogenética multilocus. Das 31 linhagens, 19 são oriundas de lesões da antracnose do feijoeiro e seis linhagens são oriundas de lesões de sarna do feijoeiro. Além dessas, ainda foram selecionadas seis linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum*, oriundas de lesão da antracnose do feijoeiro. Todas as linhagens foram obtidas na micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, coletadas nas cidades de Lavras, Lambari ou Ribeirão Vermelho, ao Sul do estado de Minas Gerais.

Tabela 1 - Linhagens do gênero *Colletotrichum* patogênicos ao feijoeiro, utilizadas na análise filogenética multilocus com as informações prévias sobre o hospedeiro, espécie, doença, em que foi isolada a linhagem, tipo de colônia e reação das linhagens aos primers de *C. lindemuthianum*, *Glomerella* e *C. truncatum*.

(Continua)

Linhagem	Espécie	Genes usados por linhagem			Doença causada	Primer	Tipo de Colônia
		ACT	TUB	GAPDH			
1-UFLAG05-1	<i>C. sojae</i>	X		X	A	SI	Conidial
2-UFLAG07-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X	X	A	SI	Conidial
3-UFLAG15-5	<i>C. plurivorum</i>	X	X	X	A	SI	Peritecial
4-UFLAG20-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X	X	A	SI	Conidial
5-UFLAG21-3	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X	X	A	*	Conidial
6-UFLAG23-1	<i>C. sojae</i>	X	X		A	*	Conidial
7-UFLAG30-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X			A	SI	Conidial
8-UFLAG30-2	<i>C. lindemuthianum</i>	X			A	SI	Conidial
9-UFLAG36-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X		A	SI	Conidial
10-UFLAG43-2	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X		A	*	Peritecial
11-UFLAG49-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X			A	*	Peritecial
12-UFLAG84-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X	X	A	SI	Peritecial
13-UFLAG93-1	<i>C. lindemuthianum</i>		X		A	*	Peritecial
14-UFLAG99-1	<i>C. petchii</i>	X		X	A	*	Conidial
15-UFLAG101-1	<i>C. lindemuthianum</i>	X	X		A	*	Conidial



Tabela 1 - Linhagens do gênero *Colleototrichum* patogênicos ao feijoeiro, utilizadas na análise filogenética multilocus com as informações prévias sobre o hospedeiro, espécie, doença, em que foi isolada a linhagem, tipo de colônia e reação das linhagens aos primers de *C. lindemuthianum*, *Glomerella* e *C. truncatum*.

(Conclusão)

Linhagem	Espécie	Genes usados por linhagem			Doença causada	Primer	Tipo de Colônia
		ACT	TUB	GAPDH			
16-UFLAG112	<i>C. sojae</i>	X			A	*	Peritecial
17-UFLAG117	<i>C. sojae</i>	X	X		A	*	Conidial
18-UFLALV44	<i>C. sojae</i>	X			A	**	Conidial
19-UFLALV227	<i>C. sojae</i>	X		X	A	**	Conidial
20-UFLALV232	<i>C. sojae</i>	X	X		A	**	Conidial
21-UFLALV235	<i>C. sojae</i>	X	X	X	A	**	Conidial
22-UFLALV238	<i>C. sojae</i>	X	X	X	A	**	Conidial
23-UFLALV1614	<i>C. lindemuthianum</i>	X			A	**	Conidial
24-UFLA9A	<i>C. karstii</i>	X	X	X	S	***	Peritecial
25-UFLA13-2A	<i>C. karstii</i>		X		S	*	Peritecial
26-UFLA19-1B	<i>C. lindemuthianum</i>			X	S	**	Conidial
27-UFLA19-4B	<i>C. lindemuthianum</i>			X	S	**	Conidial
28-UFLA19-2C	<i>C. lindemuthianum</i>			X	S	**	Conidial
29- UFLA38-2A	<i>C. karstii</i>		X	X	A	***	Peritecial
30- UFLA38-3A	<i>C. karstii</i>	X	X		A	***	Peritecial
31- UFLA51-2A	<i>C. karstii</i>	X	X	X	S	*/***	Peritecial

Legenda: A= Antacnose. S= Sarna. \*Linhagens que amplificaram para primer de *Glomerella* spp. \*\*Linhagens que amplificaram para primer de *C. lindemuthianum*. \*\*\*Linhagens que amplificaram para o primer de *C. truncatum*. SI= sem informação. Fonte: Do autor adaptado de Dias (2017); Mota (2013); Pinto et al. (2012).

### 3.2 Extração do DNA total

Para a obtenção dos micélios de cada linhagem, discos de micélio foram transferidos para erlenmeyers, contendo 200 mL de meio de cultura líquido M3, que, por sua vez, foram armazenados em shaker a 23°C no escuro, com agitação constante de 110 rpm. Após sete dias, foram realizadas a coleta e a desidratação dos micélios, utilizando uma bomba a vácuo e, posteriormente, armazenados a 5°C.

O DNA total de cada linhagem foi extraído, utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (#A1120 Promega), seguindo as instruções do fabricante. Logo depois, o DNA foi quantificado e qualificado por meio de um nanodrop.

### 3.3 Análise filogenética multilocus

A análise filogenética multilocus foi realizada nas 31 linhagens do gênero *colletotrichum*, utilizando os genes: actina (ACT) com, aproximadamente, 300 pares de bases,  $\beta$ -tubulina (TUB2) com 400 pares de base e gliseraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) com 290 pares de base (TABELA 2).

Tabela 2 - Primers utilizados para a análise multilocus.

Gene	Primers	Sequências (5' - 3')	Referência
ACT	ACTF(Foward)	ATGTGCAAGGCCGGT TTCGC	Carbone et al., 1999
	ACTR(Reverse)	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone et al., 1999
TUB2	T1(Foward)	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell et al., 1997
	T2(Reverse)	TAGTGACCC TTGGCCCAGT TG	O'Donnell et al., 1997
GAPDH	GDF (Foward)	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Templeton et al., 1992
	GDR (Reverse)	GGGTGGAGTTCGTACTIONGAGCATGT	Templeton et al., 1992

Fonte: Do autor (2019).

#### 3.3.1 Reações de PCR

Para as reações de PCR, foram utilizados os primers iniciadores dos genes actina,  $\beta$ -tubulin, e gliseraldeído 3-fosfato desidrogenase, e as amplificações foram realizados por meio de termocicladores. A amplificação das sequências do gene actina foi realizada, inicialmente, com a desnaturação da fita de DNA a 95°C por cinco minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando a extensão a 72°C por sete minutos. Para o gene  $\beta$ -tubulina, a amplificação foi realizada, inicialmente, com a desnaturação da fita de DNA a 94°C por cinco minutos, posteriormente, foram promovidos 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com extensão a 72°C por sete minutos. As amplificações das sequências do gene GAPDH foram iniciadas com a desnaturação do DNA a 94°C por cinco minutos. Logo depois, foram promovidos 35 ciclos de 94°C por um minuto, 65°C por um minuto e 72°C por um minuto, a amplificação foi finalizada a 72°C por sete minutos.

Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (0,45 M Tris-borato, 0,01 M EDTA). Em seguida, o gel foi tratado com brometo de etídio e os produtos das amplificações foram visualizados em luz ultravioleta (Fotodyne Ultraviolet Trans-illuminator). As imagens foram fotografadas em um sistema digital de

fotodocumentação (L-PIX, Loccus Biotecnologia). As amostras que apresentaram bandas fortes sem arrasto e na posição correta foram selecionadas para realizar o sequenciamento.

### 3.3.2 Sequenciamento

Os produtos das ampliações selecionadas, no gel de agarose, correspondentes aos genes ACT, TUB2 e GAPDH foram submetidos à purificação, utilizando o kit ExoSAP-IT *Express* PCR Cleanup Reagents. Após o processo de purificação, as amostras foram enviadas para a empresa Myleus Biotecnologia, em que foi realizado o sequenciamento das amostras em ambas as fitas do DNA pelo método de Sanger.

### 3.3.3 Filogenia de linhagens do gênero *Colletotrichum*

A análise filogenética foi realizada em 31 linhagens do Laboratório de Resistência de Planas a Doenças, juntamente com os 28 acessos do gênero *Colletotrichum* depositados no GenBank (TABELA 3). Os eletroferogramas gerados no sequenciamento foram visualizados no software Seq Scanner 2 (AppliedBiosystems). As sequências obtidas foram exportadas para ser obtida uma fita única consenso para cada amostra, utilizando o software SeqAssem, por meio da ferramenta Assemble e, posteriormente, comparadas ao banco de dados do NCBI. As sequências múltiplas de cada locus foram alinhadas, separadamente, por meio da ferramenta Muscle, utilizando o método Neighbor Joining. Os alinhamentos foram corrigidos, manualmente, quando necessário e, depois, as sequências dos genes foram concatenadas e a análise filogenética foi realizada pelo software MEGA7.0.26.

Para a construção das árvores filogenéticas individuais e conjunta, foram realizados testes, utilizando o software MEGA nos dados individuais e concatenados para identificar qual o modelo que melhor se adequa aos dados. Para os dados referentes ao gene de actina, o modelo mais adequado foi o Tamura 2-parameter + I, assim como os dados referentes ao gene GAPDH. Os dados referentes ao gene de  $\beta$ - tubulina se adequaram ao modelo de Kimura 2-parameter + G. Para os dados concatenados de todos os locus, o modelo mais adequado foi Hasegawa kishio yai + G

O método selecionado, para a análise filogenética, foi o de Maximum Likelihood (ML). O teste de filogenia foi realizado, por meio do Bootstrap com 1000 repetições, com uso parcial dos “gaps” e dados perdidos com 95% de confiança. Tais configurações foram

aplicadas tanto para os dados individuais de cada locus, como para os dados dos locus concatenados.

Após a reconstrução filogenética das árvores, individuais e conjuntas, foi realizado o reconhecimento das espécies filogenética, utilizando o critério de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas de Concordância Genealógica (GCPSR) (DETTMAN; JACOBSON; TAYLOR, 2003). Esse critério preconiza que um clado só é considerado uma linhagem independente, quando satisfizer, pelo menos, um dos critérios: (1) concordância genealógica, que consiste na presença do clado em questão na maioria das árvores dos locos individuais; (2) não discordância genealógica, que é satisfeito, quando um clado é fortemente apoiado por, pelo menos, uma das árvores de locos individuais e não é contradito por nenhuma outra árvore de locos individuais com o mesmo nível de apoio.

Tabela 3 - Linhagens do GenBank, utilizadas na análise filogenética multilocus e seus hospedeiros, país de origem, número do acesso e dos genes ACT, TUB2 e GAPDH.

(Continua)

Espécie	Nº de acesso	Hospedeiro	País	Número no GenBank		
				TUB2	ACT	GAPDH
<i>C. boninense</i>	CBS123755*	<i>Crinum asiaticum</i>	Japan	JQ005588	JQ005501	JQ005240
	CBS128526	<i>Dacrycarpus sp</i>	N. Z.	JQ005242	JQ005510	JQ005596
<i>C. bidentis</i>	COAD1020*	<i>Bidens subalternans</i>	Brasil	KF178602	KF178578	KF178506
<i>C. cliviae</i>	CSSK4 *	<i>Clivia minata</i>	China	GQ849440	GQ856777	GQ856756
<i>C.lindemuthianum 1</i>	CBS144.31 *	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alemanha	JQ005863	JQ005842	JX546712
<i>C.lindemuthianum 2</i>	CBS 571.97	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brasil	JX546864	JX546626	JX546722
<i>C. orbiculare</i>	CBS570.97 *	<i>Cucumis sativus</i>	Europa	KF178587	KF178563	KF178490
	OWC32	<i>Citrullus lanatus</i>	Índia	KP899058	KP899012	KP898943
<i>C. plurivorum</i>	CBS125474*	<i>Coffea sp</i>	Vietnã	MG600985	MG600925	MG600781
	UTFC261	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Irã	MG600989	MG600929	MG600785
<i>C. trifolii</i>	CBS 158.83*	<i>Trifolium</i>	EUA	KF178599	KF178575	KF178502
	DK5	<i>Malva verticillata</i>	China	KX447574.	KX447581	KX447583
<i>C. sojae</i>	ATCC6225*	<i>Glycine max</i>	USA	MG601016	MG600954	MG600810
	LFN0009	<i>Glycine max</i>	Brasil	KT696288	KT696281	KT696295
<i>C. orchidearum</i>	CBS135131*	<i>Dendrobium nobile</i>	Holanda	MG601005	MG600944	MG600800
	UTFC 266	<i>Epipremnum aureum</i>	Iran	MG601008	MG600947	MG600803
<i>C. cliviicola</i>	CBS 125375*	<i>Clivia miniata</i>	China	MG601000	MG600939	MG600795
<i>C. karstii</i>	CBS861.72	<i>Bombax aquaticum</i>	Brasil	JQ005618	JQ005532	JQ005271
	CBS CBS106.91	<i>Carica papaya,</i>	Brasil	JQ005654	JQ005568	JQ005307
<i>C. phyllanthi</i>	MACS 271*	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	JQ005655	JQ005569	JQ005308

Tabela 3 - Linhagens do GenBank, utilizadas na análise filogenética multilocus e seus hospedeiros, país de origem, número do aceso e dos genes ACT, TUB2 e GAPDH.

(Conclusão)

Espécie	Nº de acesso	Hospedeiro	País	Número no GenBank		
				TUB2	ACT	GAPDH
<i>C. petchii</i>	CBS378.94*	<i>Dracaena marginata</i> ,	Italy	JQ005657	JQ005571	JQ005310
	CBS379.94*	<i>Dracaena marginata</i> ,	Italy	JQ005658	JQ005572	JQ005311
<i>C.novae-zelandiae</i>	ICMP12944*	<i>Capsicum annuum</i> ,	N.Z	JQ005662	JQ005576	JQ005315
	CBS130240	<i>Citrus</i>	N.Z	JQ005663	JQ005577	JQ005316
<i>C. malvarum</i>	CBS 521.97*	<i>Lavatera trimestris</i>	UK	KF178601	KF178577	KF178504
	CBS 123.24	<i>Malvaceae</i>	-	KF178600	KF178576	KF178503
<i>C. annellatum</i>	CH1*	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colombia	JQ005656	JQ005570	JQ005309
<i>C.gloeosporioides</i>	CBS95397*	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	GQ849434	GQ856782	GQ856762

Fonte: Do autor (2019).

Legenda: \* = representam o tipo que a espécie foi descrita. N.Z = Nova Zelândia

### 3.4 Avaliação das características morfológicas

As linhagens do gênero *Colletotrichum* foram caracterizadas pelo índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial. Foi realizada a caracterização da forma e dimensão dos esporos e a caracterização quanto ao tipo de colônia formado por cada isolado.

#### 3.4.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Para a avaliação do IVCM, foi conduzido um experimento, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. A parcela foi constituída por uma placa de Petri de 80 mm de diâmetro. Discos de micélio de seis mm de diâmetro foram depositados ao centro de placas de Petri contendo meio BDA e incubados, no escuro, a 22 °C.

O IVCM foi avaliado, por meio da leitura das médias, em milímetros, entre os diâmetros ortogonais das colônias, em intervalos de 24 horas, durante oito dias para cada linhagem. As médias foram estimadas de acordo com a expressão adaptada de Oliveira (1991):

$IVCM = \Sigma(D - D_a) / N$ , em que:

D = Diâmetro médio atual da colônia.

D<sub>a</sub> = Diâmetro médio da colônia na avaliação anterior.

N = Número de dias após o início do experimento.

O diâmetro colonial final foi determinado, por meio da leitura dos diâmetros ortogonais das colônias, no oitavo dia de incubação.

#### 3.4.2 Caracterização das dimensões, forma e tipo de esporos

Para a estimação da largura e comprimento dos esporos, foi conduzido um experimento em DIC, com 30 repetições por isolado, em que cada repetição era constituída por um esporo. Para a obtenção dos esporos, os isolados da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram repicados, em placa de petri, contendo meio BDA. Após 15 dias de incubação, os isolados que apresentaram esporos foram selecionados, a fim de serem

transferidos para uma lâmina e visualizados em Microscópio de luz com diferencial de contraste de interferência (DIC).

Para a obtenção dos esporos, os isolados de *C. lindemuthianum* foram repicados, para vagens do feijoeiro comum, parcialmente imersas em ágar-ágar, em tubos de ensaio, previamente esterilizados. Aqueles isolados que apresentaram formação de esporos foram selecionados, para a confecção de lâminas e sua visualização em Microscópio de luz com diferencial de contraste de interferência (DIC).

A confecção das lâminas, para as avaliações morfológicas, foi realizada utilizando lactofenol e lâminas e lamínulas previamente desinfestadas. Para os isolados que apresentaram formação de ascósporos, os peritécios selecionados foram depositados sobre a lâmina contendo lactofenol e, posteriormente, esmagados com o auxílio da lamínula. Os isolados que apresentaram massas de conídios tiveram suas colônias raspadas com o auxílio de uma alça e, posteriormente, depositados sobre a lâmina com lactofenol.

As imagens foram obtidas, utilizando o microscópio Zeiss Observer Z.1 nas objetivas de 20x, 63x e 100x com diferencial de contraste de interferência (DIC), com o auxílio do software Zen Black. A largura e comprimento dos esporos foram mensuradas, por meio do software Zeiss Blue, e a forma dos esporos foi determinada de acordo com os trabalhos de Cannon et al. (2012), Liu et al. (2013) e Weir, Damm e Johnston (2012).

### **3.4.3 Caracterização do tipo de colônia formada**

Para a caracterização do tipo da colônia, foi realizado um experimento em DIC, com duas repetições para cada isolado, em que cada repetição foi constituída de uma placa de petri. As avaliações foram realizadas em colônias com 15 dias em meio BDA. As colônias da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram classificadas como Conidial A, Conidial B, plus ou minus, seguindo a metodologia descrita por Chilton e Wheeler (1949). As colônias dos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum* foram descritas de acordo com os trabalhos de Cannon et al. (2012), Liu et al. (2013) e Weir, Damm e Johnston (2012).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise filogenética multilocus

A análise filogenética multilocus, baseada nos genes de actina,  $\beta$ -tubulina e GAPDH, foi realizada para 31 linhagens oriundas na micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doença, além de 28 linhagens do gênero *Colletotrichum* obtidas no GenBank do NCBI. Inicialmente, foi realizada a reconstrução filogenética para os genes de forma individual e, posteriormente, foi realizada a reconstrução filogenética com os dados dos três genes concatenados, utilizando as análises de Maximum Likelihood (ML).

Todas as 31 linhagens foram submetidas a PCR e ao sequenciamento dos seus produtos para os três genes utilizados no presente trabalho. O gene que apresentou o maior número de fragmentos com alta qualidade foi o gene de actina, com 25 linhagens. O gene da  $\beta$ -tubulina também apresentou uma quantidade considerável, totalizando 19 linhagens com fragmentos de alta qualidade. O gene da GAPDH apresentou um menor número de fragmentos de qualidade, com 16 linhagens as quais não se mostraram informativas para a reconstrução filogenética. Dessa forma, a árvore conjunta foi composta pelos locos actina e  $\beta$ -tubulina, englobando 16 linhagens do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, enquanto fosse usado.

A reconstrução filogenética do gene de  $\beta$ -tubulina utilizou 19 linhagens oriundas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, que foram alocadas, majoritariamente, em quatro grupos. O primeiro grupo foi composto pelas linhagens UFLAG7-1, UFLAG20-1, UFLAG21-3, UFLAG36-1, UFLAG43-2, UFLAG84-1, UFLAG93-1 e UFLAG101-1, associadas a acessos de *C. lindemuthianum* do Genbank. O segundo grupo associou as linhagens UFLA9A, UFLA38-2A e UFLA38-3A, com acessos do Genbank das espécies *Colletotrichum karstii*. O terceiro grupo foi composto pelas linhagens UFLA LV232, UFLA LV235, UFLA LV238, UFLAG23-1 UFLAG117, UFLA51-2A e UFLA13-2A associadas à espécie de *C. sojiae*. A linhagem UFLAG15-5 foi a única linhagem alocada separadamente das demais linhagens do presente trabalho, associada às espécies de *C. plurivorum*, *C. cliviae* e *C. clivicola* (ANEXO B).

A reconstrução filogenética, por meio do gene de actina, utilizou 25 linhagens e apresentou associações semelhantes às aquelas indicadas pelo gene de  $\beta$ -tubulina. As linhagens UFLAG7-1, UFLAG20-1, UFLAG21-3, UFLAG30-1, UFLAG30-2, UFLAG36-1, UFLAG43-2, UFLAG49-1, UFLAG84-1, UFLAG101-1 e UFLA LV1614 foram associadas

às linhagens de *C. lindemuthianum*. As linhagens UFLAG8-1, UFLAG5-1, UFLAG112, UFLAG117, UFLA51-2A, UFLAG23-1, UFLA LV44, UFLA LV227, UFLA LV232, UFLA LV235 e UFLA LV238 foram alocadas juntamente à espécie *C. sojæ*. Duas linhagens (UFLA9A e UFLA38-3A) do presente trabalho foram alocadas juntamente com acessos do Genbank das espécies *C. karstii*. A linhagem UFLAG99-1 foi a única associada a acessos do GenBank da espécie *Colletotrichum petchii*, assim como a linhagem UFLAG15-5 foi a única a ser associada com acessos de *C. plurivorum* do GenBank (ANEXO C).

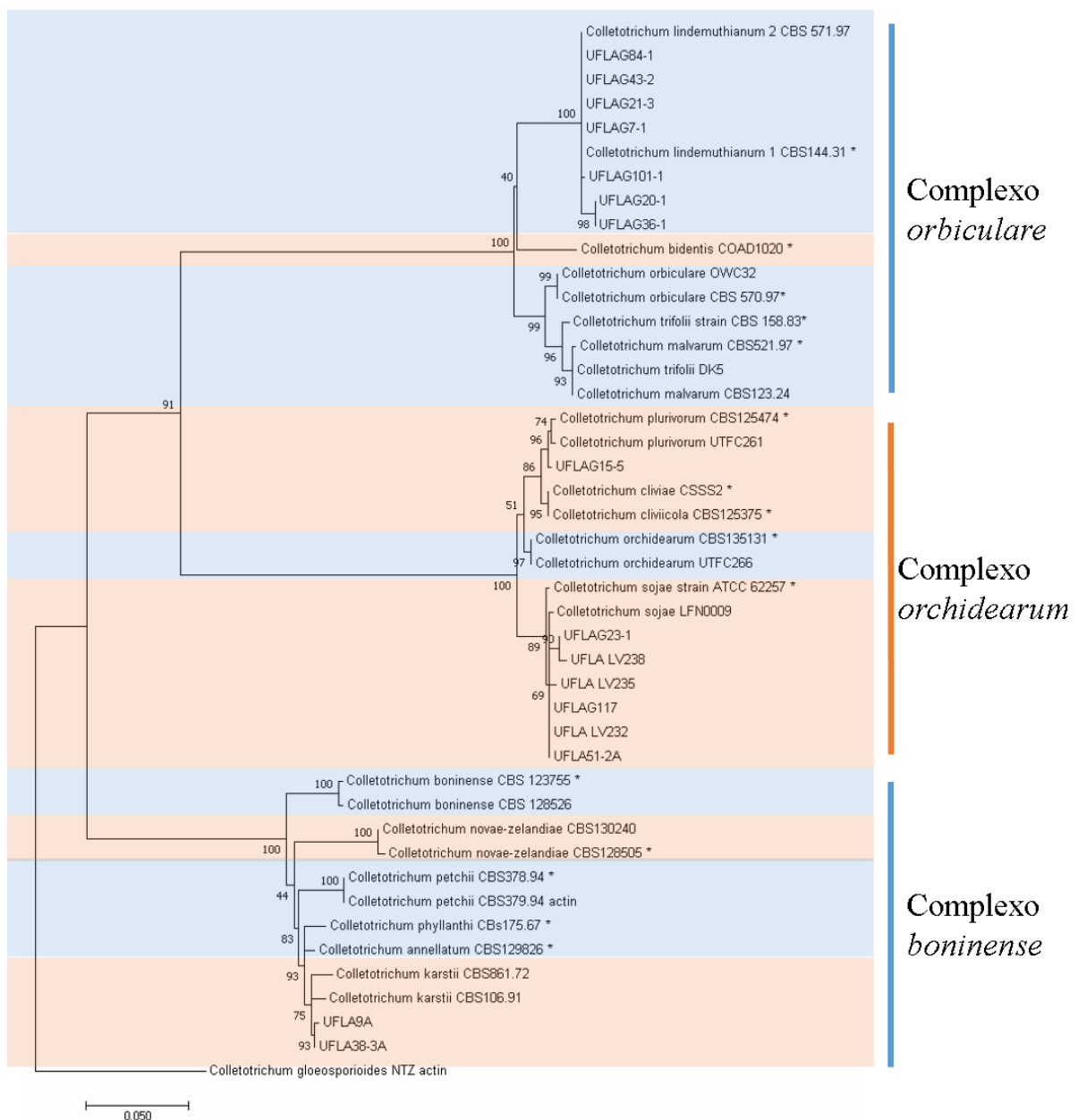
Os resultados obtidos com a reconstrução filogenética dos dados do gene GAPDH utilizou 16 linhagens oriundas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e apresentou algumas diferenças quando comparados aos resultados baseados nos genes actina e  $\beta$ -tubulina. O primeiro grupo associou as linhagens UFLAG20-1, UFLAG7-1, UFLAG84-1, UFLAG21-3, UFLA19-2C, UFLA19-1B e UFLA19-4B com acessos de *C. lindemuthianum* do GenBank. O segundo grupo foi formado pelas linhagens UFLAG23-1, UFLAG5-1, UFLA LV227, UFLA LV235, UFLA LV238 e UFLA51-2A associadas a acessos do Gembank das espécies *C. cliviae*, *C. plurivorum*, *C. orchidearum*, *C. cliviicola* e *C. sojæ*. O terceiro grupo foi formado pela linhagem UFLAG99-1 com acessos do GenBank da espécie *Colletotrichum petchii*. O quarto grupo foi formado pelas linhagens UFLA9A e UFLA38-2A e acessos da espécie *C. phyllanthi* (ANEXO D).

A reconstrução filogenética, utilizando os locos de actina e de  $\beta$ -tubulina concatenados, foi bem semelhante às árvores obtidas para cada gene individualmente, porém, envolvendo dezesseis linhagens do presente trabalho. As linhagens UFLAG84-1, UFLAG43-2, UFLAG21-3, UFLAG7-1, UFLAG101-1, UFLAG20-1 e UFLAG36-1 foram alocadas juntamente com acessos de *C. lindemuthianum* do Genbank e estão associadas ao complexo de espécies Orbiculare (DAMM et al., 2013). A linhagem UFLAG15-5 foi a única associada aos acessos de *C. plurivorom*. As linhagens UFLAG23-1, UFLA LV238, UFLA LV235, UFLAG117, UFLALV232 e UFLA51-2A foram agrupadas juntamente com acessos de *C. sojæ*. *C. plurivorum* e *C. sojæ* e pertencem ao complexo de espécies Orchidearum (DAMMN et al., 2019). Por fim, as linhagens UFLA9A e UFLA38-3A foram associadas a acessos de *C. karstii* (FIGURA 1) e pertencem ao complexo de espécies Boninense (DAMM et al., 2012).

Após a reconstrução filogenética, foi observado que as árvores atenderam, para os três cladogramas, o critério de concordância genealógica do Reconhecimento de Espécies Filogenéticas de Concordância Genealógica (GCPSR). Ou seja, a presença dos três cladogramas, nas duas árvores individuais, indicando que essas linhagens compõem um grupo independente. Tanto para a

árvore obtida para o loco de actina quanto para o loco de  $\beta$ -tubulina foram observados três cladogramas em que foram associadas as linhagens avaliadas. O primeiro grupo foi formado pelas linhagens UFLA9A e UFLA38-3A e acessos de *C. karstii*. O segundo grupo foi composto pelas linhagens UFLAG7-1, UFLAG20-1, UFLAG21-3, UFLAG36-1, UFLAG43-2, UFLAG84-1 e UFLAG101-1, associadas aos acessos de *C. lindemuthianum* do GenBank. O terceiro grupo associou as linhagens UFLA LV232, UFLA LV235, UFLA LV238, UFLAG23-1, UFLAG117 e UFLA51-2A com acessos de *C. sojae*.

Figura 1 - Árvore filogenética multilocus dos genes actina e  $\beta$ -tubulina concatenados.



Fonte: Do autor (2019).

## 4.2 Análise dos caracteres morfológicos

O IVCM e o diâmetro colonial foram avaliados para 26 linhagens do gênero *Colletotrichum* (TABELA 4), sendo observada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) para ambas as características. As estimativas de IVCM variaram de 3,08 a 10,07 mm/dia, apresentadas pelas linhagens UFLA LV227 e UFLAG15-5, respectivamente. O diâmetro colonial das 26 linhagens avaliadas variou de 24 a 80,00 mm/dia, semelhante ao que ocorreu com o IVCM,

A avaliação da dimensão dos esporos foi realizada em 26 isolados do gênero *Colletotrichum*. Foram encontradas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), para a largura e os comprimentos dos esporos, os valores então apresentados na Tabela 4. A largura dos esporos variou de 2,98 $\mu$ m (UFLAG21-3) a 8.36 $\mu$ m (UFLAG84-1). O comprimento dos esporos apresentou alta variabilidade, oscilando de 8,57  $\mu$ m (UFLAG30-2) a 29,22 $\mu$ m (UFLAG84-1).

Os esporos foram classificados quanto à sua forma, em dois tipos, 24 como cilíndricos e dois como elipsoidais. Entre os isolados que foram classificados como cilíndricos, há tanto ascósporos como conídios, enquanto as linhagens classificadas como elipsoidal são ascósporos.

Tabela 4 - Estimativas do diâmetro colonial (DC) em mm, comprimento, largura em  $\mu$ m, formato e tipo dos esporos e porcentagem de formação de CAT's.

(Continua)					
Linhagem	DC	Comprimento	Largura	Formato do esporo	*CAT's
UFLAG05-1	80	10.05	2.86	Cilíndrico <sup>1</sup>	15%
UFLAG07-1	80	15.10	4.78	Cilíndrico <sup>2</sup>	0%
UFLAG15-5	80	20.27	6,18	Cilíndrico <sup>2</sup>	19%
UFLAG20-1	79	12.27	4.62	Cilíndrico <sup>1</sup>	6%
UFLAG21-3	80	10.51	2.98	Cilíndrico <sup>1</sup>	3%
UFLAG23-1	80	11.54	3.09	Cilíndrico <sup>1</sup>	7%
UFLAG30-2	80	8.57	3.51	Cilíndrico <sup>1</sup>	4%
UFLAG36-1	75	13.63	5.22	Cilíndrico <sup>1</sup>	32%
UFLAG43-2	79	21.84	7.69	Elipsoidal <sup>2</sup>	0%
UFLAG49-1	78	14.16	4.36	Cilíndrico <sup>1</sup>	3%
UFLAG84-1	79	29.22	8.36	Cilíndrico <sup>2</sup>	0%
UFLAG93-1	80	12.30	5.90	Cilíndrico <sup>2</sup>	10%
UFLAG99-1	80	15.81	4.87	Cilíndrico <sup>1</sup>	27%
UFLAG101-1	79	25.54	7.49	Cilíndrico <sup>2</sup>	0%

Tabela 4 - Estimativas do diâmetro colonial (DC) em mm, comprimento, largura em  $\mu\text{m}$ , formato e tipo dos esporos e porcentagem de formação de CAT's.

(Conclusão)

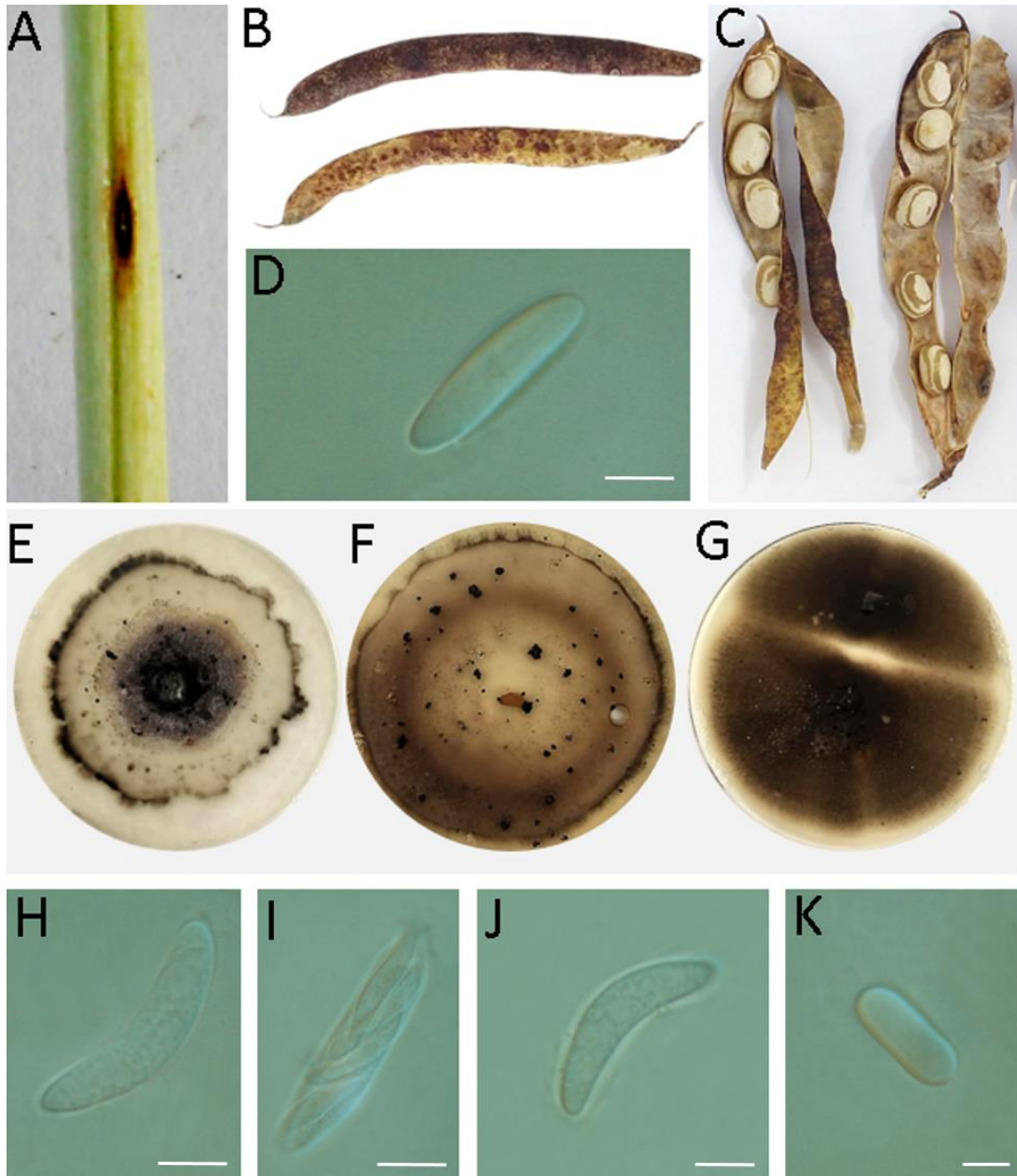
Linagem	DC	Comprimento	Largura	Formato do esporo	*CAT's
UFLAG112	39	23.26	6.78	Elipsoidal <sup>2</sup>	0%
UFLAG117	79	10.35	3.37	Cilíndrico <sup>1</sup>	49%
UFLA LV44	-	14,93	5,16	Cilíndrico <sup>1</sup>	13%
UFLA LV227	24	14,74	5,05	Cilíndrico <sup>1</sup>	12%
UFLA LV232	26	-	-	-	-
UFLA LV235	27	14.05	5.54	Cilíndrico <sup>1</sup>	17%
UFLA LV238	28	13,88	5,54	Cilíndrico <sup>1</sup>	SI
UFLA 9A	79	15.25	6.40	Cilíndrico <sup>2</sup>	6%
UFLA13-2 <sup>a</sup>	79	22.65	6.11	Cilíndrico <sup>2</sup>	0%
UFLA19-2C	40	12.89	4.97	Cilíndrico <sup>1</sup>	2.5%
UFLA38-2A	80	13.76	5.74	Cilíndrico <sup>1</sup>	3.75%
UFLA38-3A	78	13.76	5.74	Cilíndrico <sup>2</sup>	6%
UFLA51-2A	72	19.13	5.69	Cilíndrico <sup>2</sup>	4.25%

Fonte: Do autor adaptado de Dias (2017); Mota (2013); Pinto et al. (2012).

Legenda: <sup>1</sup>Colônias conidial. <sup>2</sup> Colônia peritecial. SI: Sem informação \* Informação da literatura.

A caracterização das colônias foram realizadas em 31 linhagens do gênero *Colleototrichum*. Os isolados da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* foram agrupados, de acordo com a classificação de Chilton e Wheeler (1949), dessa forma, os isolados foram alocados em quatro grupos: cinco como Plus (UFLAG15-5, UFLAG112, UFLAG43-2, UFLAG84-1 e UFLA13-2A); oito como Minus (UFLA9A, UFLA38-2A, UFLA38-3A, UFLA51-2A, UFLAG93, UFLAG49-1, UFLAG99-1 e UFLAG101-1); quatro como Conidial A (UFLAG30-2, UFLAG117, UFLAG7-1 e UFLAG5-1) e sete como Conidial B (UFLAG23-1, UFLAG21-3, UFLAG20-1, UFLAG36-1, UFLA19-1B, UFLA19-2C e UFLA19-4B). Os sete isolados de *C. lindemuthianum* apresentaram colônias bem características e semelhantes entre si, inicialmente cinza e se tornando negra ao passar dos dias.

Figura 2 - Imagens do caule, vagem e grãos do feijoeiro com sintomas da antracnose/sarna e fotos da placa e de ascos, ascósporos e conídios de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*.



Legenda: A: Lesão de sarna no hipocótilo do feijoeiro. B: Vagens com sintomas de sarna do feijoeiro. C: Vagens e grãos com sintomas da sarna do feijoeiro. D: Ascósporo de linhagem da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*. E: Colônia peritecial da linhagem UFLAG112. F: Colônia peritecial da linhagem UFLAG15-5. G: Colônia conidial da linhagem UFLA38-2A. H: Ascósporos da linhagem UFLAG112. I: Asco da linhagem UFLAG15-5. J: Ascósporo da linhagem UFLAG15-5. K: Conídio da linhagem UFLA38-2A. Escala 5µm. Fonte: Do autor adaptado de Martins (2019).

Figura 3 - Imagens da folha, caule e vagem do feijoeiro com sintomas da sarna e fotos da placa e ascósporos de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*.



Legenda: A: Sintomas de sarna na vagem causado pela linhagem UFLAG93-1. B: Sintomas na folha causado pela linhagem UFLAG93-1. C: Formação de peritécio na folha. D: Lesão no caule do feijoeiro causada pela linhagem UFLAG93-1. E: Formação de peritécio no hipocótilo do feijoeiro. F: Colônia peritecial da linhagem UFLA93-1. G, H e I: Ascósporos da linhagem UFLAG93-1. Escala 5µm Fonte: Do autor adaptado de Mota (2013).

Figura 4 - Imagens de lesões de antracnose na folha, caule, vagem e grão do feijoeiro e placa e conídios de linhagens de *C. lindemuthianum*.



Legenda: A: Lesão de antracnose no hipocótilo do feijoeiro. B: Lesão da antracnose na folha do feijoeiro. C: Vagem do feijoeiro com lesão de antracnose. D: Vagem e grãos do feijoeiro com sintomas de antracnose. E: Colônia do isolado UFLALV227. F: Conídio da linhagem UFLALV44. G: Conídio da linhagem UFLALV227. H: Conídio da linhagem UFLALV44. I: Conídio da linhagem UFLALV227. Escala 5 $\mu$ m Fonte: Do autor adaptado de Martins (2019).



## 5 DISCUSSÃO

As linhagens avaliadas no presente trabalho apresentaram ampla variação para todas as características morfológicas. O diâmetro colonial, bem como a dimensão e o formato dos esporos apresentados pelas linhagens alocadas juntamente com acessos de *C. lindemuthianum* do GenBank, foram semelhantes aos valores relatados na literatura para a espécie (LIU et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados para as linhagens associadas à *C. sojae* (DAMM et al., 2019). No entanto as linhagens alocadas juntamente com *C. karstii* apresentam valores superiores àqueles relatados, para a espécie na literatura para o diâmetro colonial, mas semelhantes em relação à dimensão dos esporos (DAMM et al., 2012).

As características morfológicas avaliadas não discriminaram as diferentes espécies identificadas (TABELA X). Essas características são altamente influenciáveis por fatores ambientais, tais como o meio de cultura, condições de incubação, número de vezes que a linhagem foi repicada, tempo e o método em que a linhagem foi armazenada. No gênero *Colletotrichum*, tem sido observado que colônias periteciais podem formar na descendência os dois tipos de colônias, isto é, periteciais e conidiais (BARCELOS et al., 2014). Portanto a análise filogenética não deve ser baseada somente nessas características, sendo essas informações importantes, para serem utilizadas de forma complementar aos dados da análise multilocus, que apresentam maior consistência e repetibilidade.

Linhagens de *Colletotrichum* têm sido isoladas de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro e caracterizadas por meio de análises morfológicas e molecular (BARCELOS et al., 2014). Variabilidade tem sido observada nessas populações e não há consenso sobre as espécies envolvidas. O agente etiológico da antracnose do feijoeiro é o fungo *C. lindemuthianum* que tem sido observado na sua forma anamórfica causando a doença. A sua forma teleomórfica tem sido relatada em algumas oportunidades (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; KIMATI; GALLI, 1970; RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2005; SHEAR; WOOD, 1913; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR; PINTO, 2010). Todavia trabalhos recentes têm considerado a hipótese dessas linhagens não representarem a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* (DAMM et al., 2019). No presente trabalho, foram avaliadas 31 linhagens de *Colletotrichum* do feijoeiro, sendo que 18 foram caracterizadas por Barcelos et al. (2014) e Mota et al. (2016) e oito por Dias (2017) (TABELA 1). Todas as linhagens foram isoladas de colônias periteciais típicas da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*, exceto as linhagens UFLALV44, UFLALV227, UFLALV232, UFLALV235 e UFLALV238.

Nesses trabalhos, o uso de primers específicos da região HMG do mating type, para as espécies *C. lindemuthianum* (HMGcl), *Glomerella cingulata* (HMGglo) e *Colletotrichum truncata* (HMGct), foram utilizados para auxiliar na identificação das espécies, bem como a utilização de sequências de DNA de regiões ITS. As 18 linhagens acima mencionadas, caracterizadas por Barcelos et al. (2014) e Mota et al. (2016), não amplificaram para os primers HMGCL, no entanto a maioria amplificou para os primers HMGglo as quais foram denominadas de *Glomerella* grupo I, exceto as linhagens UFLAG93-1 e UFLAG99-1 que pertencem à *Glomerella* grupo II (BARCELOS et al., 2014). Na análise filogenética com as sequências ITS, realizada no referido trabalho, nenhuma linhagem agrupou com *C. lindemuthianum*, sendo que as linhagens de *Glomerella* grupo I agruparam com *C. magna*, patógeno de curcubitáceas e endofítico em outros hospedeiros. As linhagens UFLAG93-1 e UFLAG99-1 foram agrupadas no complexo de espécies *C. gloeosporioides*. No presente trabalho, as sequências ITS de 11 das 18 linhagens de *Glomerella* grupo I e grupo II e, também, linhagens de *C. lindemuthianum*, utilizadas no trabalho de Liu et al. (2013), todas depositadas no Genbank, foram empregadas para a construção de uma árvore (Apêndice 1). Nenhuma dessas linhagens agrupou com as linhagens de *C. lindemuthianum*. Portanto, baseando-se nas sequências ITS e dos primers HMG, não há consenso na identificação das espécies dessas linhagens e evidencia que esses marcadores não são adequados neste caso.

No presente trabalho, a análise molecular multilocus com os genes de actina e  $\beta$ -tubulina concatenados agrupou dezesseis linhagens patogênicas ao feijoeiro nos clados de *C. lindemuthianum* (7 linhagens), *C. sojae* (6 linhagens), *C. karstii* (2 linhagens) e *C. plurivorum* (1 linhagem). Todas as linhagens agrupadas no clado de *C. lindemuthianum* são oriundas de ascósporos que produziram colônias conidiais, periteciais e apresentaram dimensões de conídios semelhantes aos valores relatados para *C. lindemuthianum* (LIU et al., 2013) e *G. lindemuthiana* (SHEAR; WOOD, 1913).

A árvore filogenética multilocus foi construída, utilizando-se os genes actina e  $\beta$ -tubulina, pois as sequências obtidas do gene de GAPDH não foram informativos para a identificação das espécies.

Os resultados da filogenia molecular, realizada no presente trabalho, evidenciam que as linhagens UFLAG84-1, UFLAG43-2, UFLAG21-3, UFLAG7-1, UFLAG101-1, UFLAG20-1 e UFLAG36-1 são a fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* e pertencem ao complexo Orbiculare. Liu et al. (2013), trabalhando com várias linhagens de *C. lindemuthianum*, não obtiveram sucesso, na indução da fase sexual em laboratório, concluindo que não seria coespecífica de *C. lindemuthianum*. No entanto as linhagens

avaliadas, nesta pesquisa, agruparam com as linhagens avaliadas por esses autores. De acordo com Damm et al. (2019), *G. lindemuthiana* (SHEAR; WOOD, 1913) e *G. cingulata* fsp. *phaseoli* (KIMATI; GALLI, 1970), poderiam não ser a fase sexual de *C. lindemuthianum* e, portanto a ocorrência da morfologia sexual e assexual de diferentes espécies de *Colletotrichum* co-habitarem o mesmo hospedeiro levariam a essa conexão errônea. Entretanto os dados obtidos, no presente estudo, evidenciam a existência da fase sexual de *C. lindemuthianum* do feijoeiro.

Damm et al. (2013) realizaram a análise filogenética multilocus dentro do complexo *orbiculare* e separaram linhagens de *C. lindemuthianum* em dois grupos, *C. lindemuthianum* 1 e *C. lindemuthianum* 2. No presente trabalho, foram utilizadas, na análise filogenética, as linhagens de ambos os grupos caracterizados por Damm et al. (2013), porém não foi observada a formação desses grupos. As linhagens de *C. lindemuthianum* foram agrupadas em um único clado.

Seis linhagens do presente trabalho foram agrupadas no clado de *Colletotrichum sojae* (UFLA LV232, UFLA LV235, UFLA LV238, UFLAG23-1, UFLAG117 e UFLA51-2A) e pertencem ao complexo *Orchidearum*. Essas linhagens, quando testadas para os primers específicos de HGMglo e HGMcl, formaram dois grupos. As linhagens UFLA51-2A e UFLAG23-1 amplificaram para o primers HMGglo, enquanto as linhagens UFLALV235 e UFLALV238 amplificaram para o primer de *C. lindemuthianum*. As linhagens UFLAG23-1, UFLALV235 e UFLALV238 alocadas nesse clado são oriundas de colônias conidiais, ao passo que a linhagem UFLA51-2A é oriunda de colônias periteciais. Essa linhagem tem formado a fase sexual *in vitro* e em *in vivo* sem indução, sendo observada a formação de peritécios em folhas e pecíolos do feijoeiro (MARTINS, 2019).

As linhagens de *Colletotrichum sojae* Damm et al. (2019) apresentam conídios cilíndricos e, também, foram denominadas de *Glomerella glycines* Lehman & F.A. Wolf e *Colletotrichum truncatum* Schwein. Andrus & W.D. Moore e, normalmente, apresentam conídios fusiformes e levemente curvados (DAMM et al., 2019). No presente trabalho, todas as linhagens apresentaram conídios cilíndricos, porém o formato do conídio não é necessariamente uma característica determinante na identificação de uma espécie do gênero *Colletotrichum*. Em *C. sublineolum*, patógeno causador da antracnose do sorgo, há dimorfismo de conídios, sendo encontrados tanto conídios ovais como falcados (SOUZA-PACCOLAS et al., 2015). A sarna do feijoeiro inicialmente foi associada ao *C. truncatum*, que apresenta conídio falcado, no entanto nenhuma das linhagens, na análise filogenética, agrupou com esta espécie. Todas as linhagens avaliadas que foram isoladas de lesões de sarna do

feijoeiro apresentaram conídios cilíndricos. Desta forma, seria interessante avaliar a possibilidade de dimorfismo de conídios nessas linhagens. Souza-Paccola et al. (2015) verificaram que as colônias de conídios ovais de *C. sublineolum* cresceram mais rápido e, também, infectaram folhas de sorgo.

Vários mecanismos estão envolvidos na ampliação da variabilidade genética em fungos e são responsáveis pela recombinação sexual, por meio da meiose e da recombinação assexual via anastomoses de hifas, tubos de anastomoses entre conídios e a ocorrência do ciclo parassexual (ISHIKAWA et al., 2011). Esses mecanismos poderiam explicar o polimorfismo cromossômico que tem sido detectado em fungos, inclusive, nas fases sexuais e assexuais de *C. lindemuthianum*. (GONÇALVES, 2016; O'SULLIVAN et al., 1998), gerando ampla plasticidade nos genomas de fungos, quando comparados com outros organismos eucariotos (CROLL; ZALA; MCDONALD, 2013; MOLLER; STUKENBROCK, 2017). Como pode ser observado, no patossistema *Colletotrichum/Phaseolus vulgaris*, ampla variabilidade tem sido relatada nas populações do(s) patógeno(s), causando a antracnose e a sarna do feijoeiro. As linhagens avaliadas e agrupadas, nos diferentes clados, apresentam o ciclo sexual e, além disso, formam CATs. Portanto espera-se que várias espécies tenham sido identificadas e associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro. Ferramentas moleculares que possam considerar essa dinâmica dos genomas dos fungos, levando a uma evolução rápida, deveriam ser desenvolvidas.

A cultura feijoeiro, no Brasil, é realizada em diferentes épocas, regiões e sistemas de cultivo. Além disso, a semeadura do feijoeiro em sucessão de áreas cultivadas com soja e/ou milho, aliada ao plantio direto que é utilizado em todas essas culturas, favorece a presença de estruturas de resistência de patógenos, tal como peritécios, de uma cultura para outra. A produção de grandes quantidades de peritécios de linhagens da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum* do feijoeiro ocorre em folhas senescentes, desprendidas das plantas e com alta umidade no estágio R9 do feijoeiro (MARTINS, 2019). Portanto, nos campos de feijoeiro, isso pode ocorrer e tem sido negligenciado pela formação dessas estruturas, ao final do ciclo da cultura, nos restos culturais que são incorporados ao solo por meio do plantio direto. Peritécios de *Colletotrichum* spp. que causam a antracnose da soja, também, têm sido observados nas áreas de cultivo dessa cultura (informação verbal)<sup>1</sup>. Todo esse cenário, envolvendo diferentes condições ambientais, contribuem para desencadear os diferentes mecanismos de ampliação da variabilidade genética das espécies associadas à antracnose e à

---

<sup>1</sup> Informação verbal obtida sobre a observação de peritécios de *Colletotrichum* spp. em restos culturais da cultura da soja.

sarna do feijoeiro. Dessa forma, pode ser constatado que há um complexo de diferentes espécies e, de acordo com os resultados do presente trabalho, as espécies *C. lindemuthianum*, *C. sojæ* e *C. karstii* estão associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro.

## 6 CONCLUSÃO

- a) As características morfológicas avaliadas não foram informativas para a análise filogenética;
- b) As linhagens avaliadas foram identificadas nas espécies de *C. lindemuthianum*, *C. sojæ*, *C. karstii* associadas à antracnose e à sarna do feijoeiro;
- c) As linhagens sexuais agrupadas no clado de *C. lindemuthianum* representam a fase teleomórfica dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismo**. Goiânia: Ed. UFG, 1998. 490 p.
- BAGSHAW, C. R. et al. Muscle contraction. In: BRAMMAR, W. J.; EDIDIN, M. (Ed.). **Outline studies in biology**. New York: Chapman and Hall, 1982. p. 30-38.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p.
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report**, Oxford, v. 54, p. 110–111, 2011.
- BATISTA, U. G.; CHAVES, G. M. Patogenicidade de culturas monoascospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 285-293, jun. 1982.
- BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BRUN, A. et al. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, p. 938-944, July 1992.
- BRYSON, R. J.; CATEN, C. E.; HOLLOMON, D. W. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p. 27–46.
- BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. 374 p. Thesis (PhD) - University of Birmingham, Birmingham, 1990.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CAMARGO JÚNIOR, O. A. et al. Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. phaseoli recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 607-615, set. 2007.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum*: current status status and future directions. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 73, p. 181–213, 2012.

- CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. ***Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2000. cap. 5, p. 1-20.
- CARNEIRO, J. E. et al. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2014. 384 p.
- CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VI. Linkage. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 36, n. 3, p. 270–273, Mar. 1949.
- CISAR, C. R.; TEBEEST, T. O. Mating system of the filamentous ascomycete *Glomerella cingulata*. **Current Genetics**, New York, v. 35, n. 2, p. 127–133, Mar. 1999.
- COSTA, J. L. S. et al. **Quem causa a sarna**. Pelotas: Cultivar, 2001. 8 p.
- CROLL, D.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A. Breakage-fusion-bridge cycles and large insertions contribute to the rapid evolution of accessory chromosomes in a fungal pathogen. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e1003567, 2013.
- CROUCH, J. A. et al. Systematic analysis of falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. **Mycologia**, Lancaster, v. 101, n. 5, p. 717-732, Sept./Oct. 2009.
- \_\_\_\_\_. The genomics of *Colletotrichum*. In: DEAN, R.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. (Ed.). **Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: monocot pathogens**. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 69-102.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 73, n. 1, p. 1–36, Sept. 2012.
- \_\_\_\_\_. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 79, p. 49–84, Sept. 2014.
- \_\_\_\_\_. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 92, p. 1-46, Mar. 2019.
- \_\_\_\_\_. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important plant pathogens and mycoherbicides. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 61, n. 1, p. 29–59, July 2013.
- DETTMAN, J. R.; JACOBSON, D. J.; TAYLOR, J. W. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote neurospora. **Evolution**, Lancaster, v. 57, n. 12, p. 2703–2720, Dec. 2003.
- DIAO, Y. Z. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia**, Leiden, v. 38, p. 20-37, June 2017.
- DIAS, M. A. **Caracterização de linhagens *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. isoladas de lesões de sarna e antracnose do feijoeiro comum**. 2017. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.



- EDGERTON, C. W. Plus and minus strains in an ascomycete. **Science**, London, v. 35, p. 151, 1912.
- FAGUY, D. M.; DOOLITTLE, W. F. Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division. **Current Biology**, London, v. 8, n. 10, p. 338–341, May 1998.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, June 1998.
- GONÇALVES, P. R. C. **Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isolados de lesões de antracnose no feijoeiro**. 2016. 96 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- GUARNACCIA, V. et al. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia**, Leiden, v. 39, p. 32-50, Dec. 2017.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, Baltimore, v. 66, n. 4, p. 411-453, Dec. 1991.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 147-182, 2009.
- ISHIKAWA, F. H. et al. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 461-464, July 2011.
- \_\_\_\_\_. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31175, 2012.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 774 p.
- KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. v. Scherenk. f sp. Phaseoli n.f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, v. 27, p. 411-437, 1970.
- KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 245–76, 1997.
- LIAW, S. H.; EISENBERG, D. Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 3, p. 675-681, Jan. 1994.
- LIU, F. et al. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. **Mycologia**, Lancaster, v. 105, n. 4, p. 844–860, July/Aug. 2013.
- LOBUGLIO, K. F.; PFISTER, D. H. A *Glomerella* species phylogenetically related to *Colletotrichum acutatum* on Norway maple in Massachusetts. **Mycologia**, Lancaster, v. 100, n. 5, p. 710–715, Sept./Oct. 2008.

- LUCAS, G. B.; CHILTON, S. J. P.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella*. I. Studies on the behaviour of certain strains. **American Journal of Botany**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 233–239, Apr. 1944.
- MARTINS, A. C. F. **Caracterização da produção *in vitro* e *in vivo* de estruturas sexuais de linhagens de *Glomerella* spp. do feijoeiro**. 2019. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- MCGAHEN, J. W.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**, Philadelphia, v. 38, n. 8, p. 610–617, Oct. 1951.
- MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* I. Sexual compatibility. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 350, p. 19-42, 1996.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 523-524, 2002. Suplemento.
- MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 979–987, Apr. 2002.
- MIKLAS, P. N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, Jan. 2006.
- MOLLER, M.; STUKENBROCK, E. M. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 15, n. 12, p. 756-771, Dec. 2017.
- MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p. 1-22, abr. 2016.
- MOTA, S. F. **Variabilidade de *Colletotrichum* spp. no feijoeiro comum**. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- O’SULLIVAN, D. et al. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, New York, v. 33, n. 4, p. 291-298, Apr. 1998.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.
- PARDO-DE LA HOZ, C. J. et al. Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 227–237, Feb. 2016.

- PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIN, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 359-414.
- PERFECT, S. E.; GREEN, J. R.; O'CONNELL, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 8, p. 813–819, Oct. 2001.
- PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 33–43, Oct. 2010.
- PINTO, A. C. S.; POZZA, E. A.; TALAMINI, V.; et al. Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 3, p. 392–398, out./dez. 2001.
- PINTO, J. M. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 490–497, May 2012.
- ROCA, M. M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 367-373, jul./ago. 2003.
- RODRIGUEZ-GUERRA, R. et al. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 4, p. 793-803, July/Aug. 2005.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 300 p.
- SHEAR, C. L.; WOOD, A. K. **Studies of fungal parasites belonging to the genus *Glomerella***. Washington: U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Library, 1913. 110 p.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, Nov. 2010.
- SOUSA, E. S. et al. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 78–84, fev. 2017.
- SOUZA, E. A.; CAMARGO JÚNIOR, O. A.; PINTO, J. M. A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, set. 2010.
- SOUZA-PACCOLAS, E. A. et al. Novel insights into the early stages of infection by oval conidia of *Colletotrichum sublineolum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 2, p. 351-355, 2015.
- SUTTON, B. C. et al. **The Coelomycetes**. Londres: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p. 1–26.

VELHO, A. C. et al. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 229-244, Apr. 2015.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. O. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa: Epamig, 1993. 131 p.

VON ARX, J. A. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 413–468, 1957.

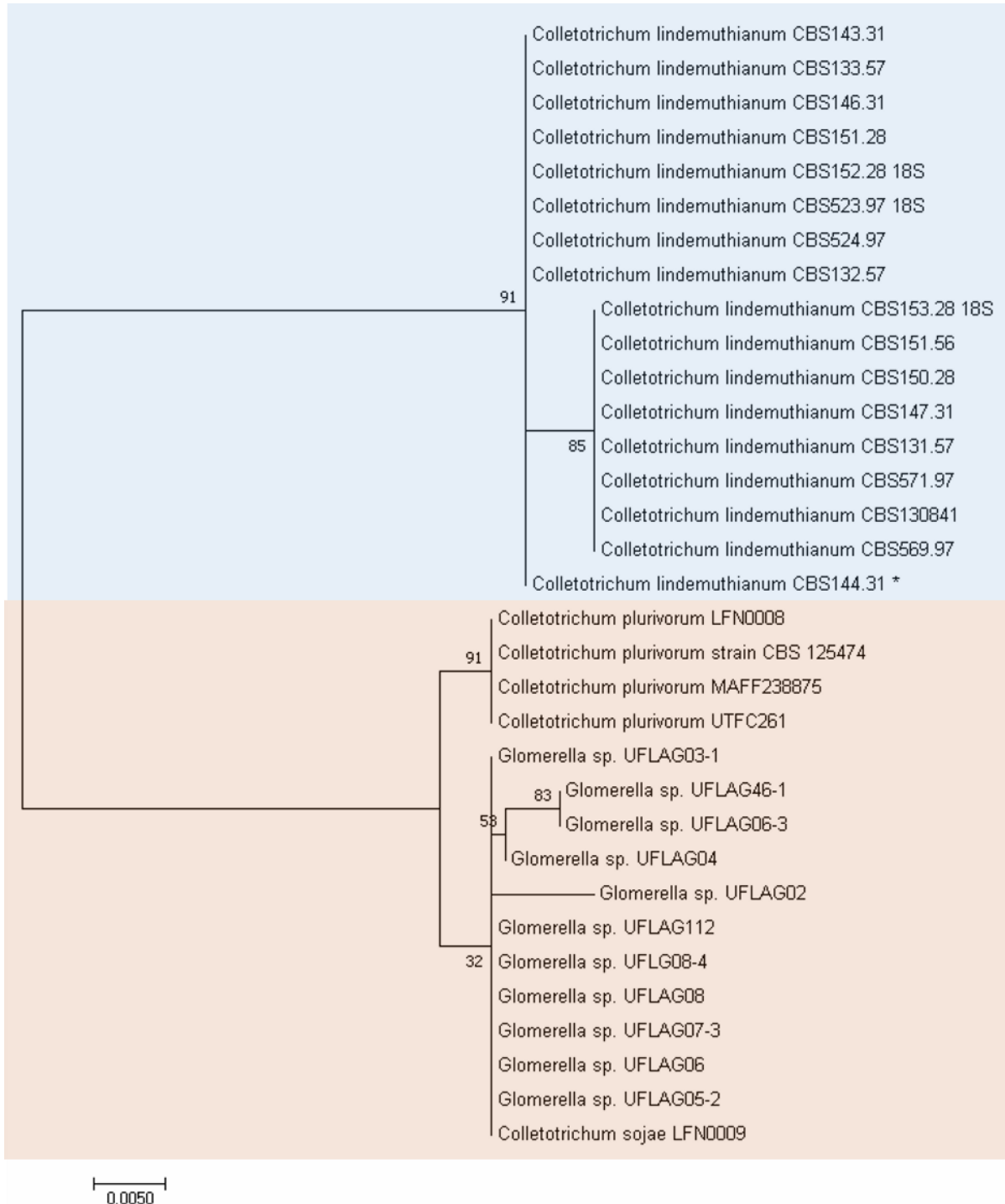
WEIR, B.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 73, n. 1, p. 115–180, Sept. 2012.

WHEELER, H. E. Genetics and evolution of heterotalismo in *Glomerella*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, p. 342-345, 1954.

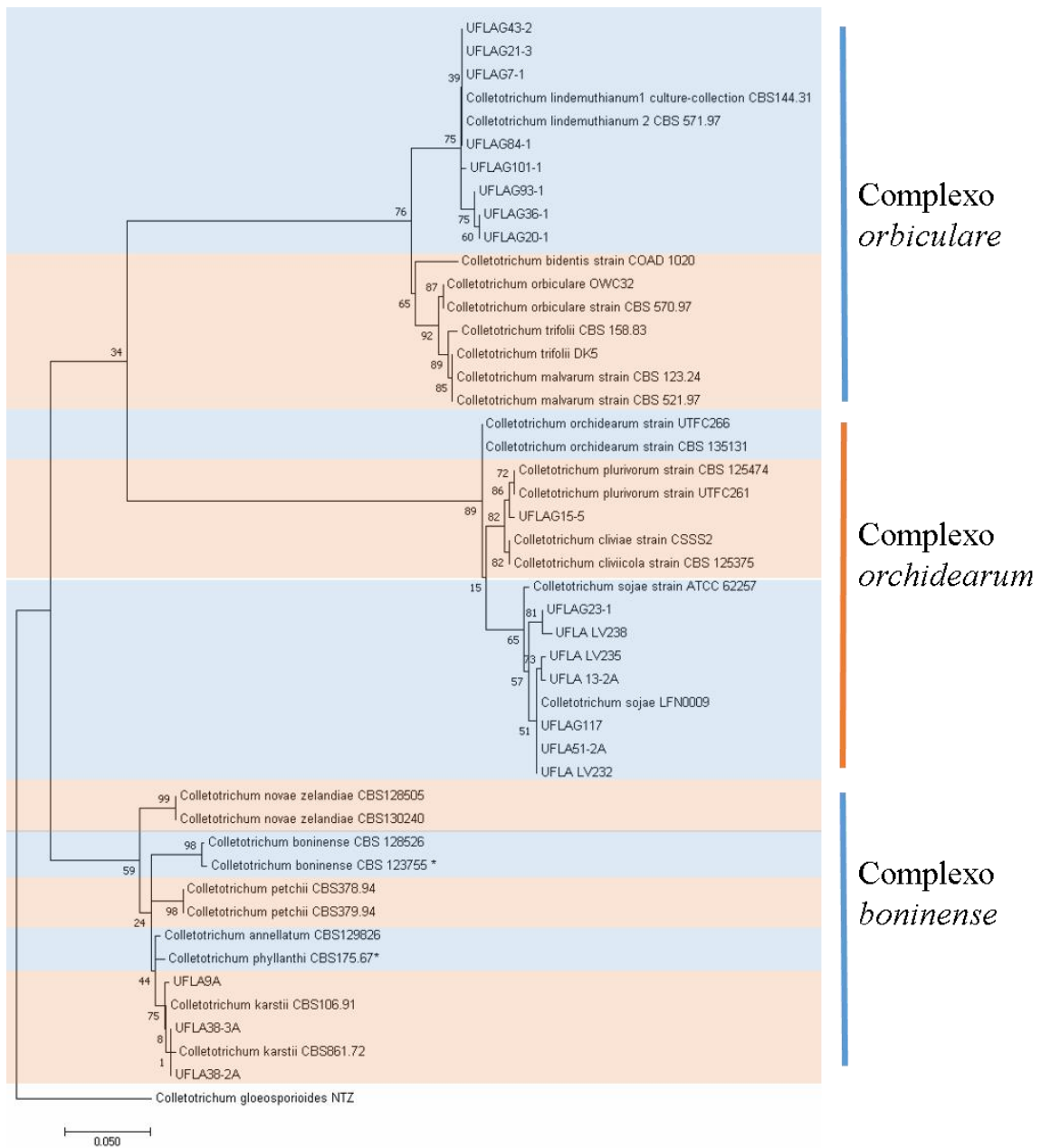
WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 123–146, 2009.

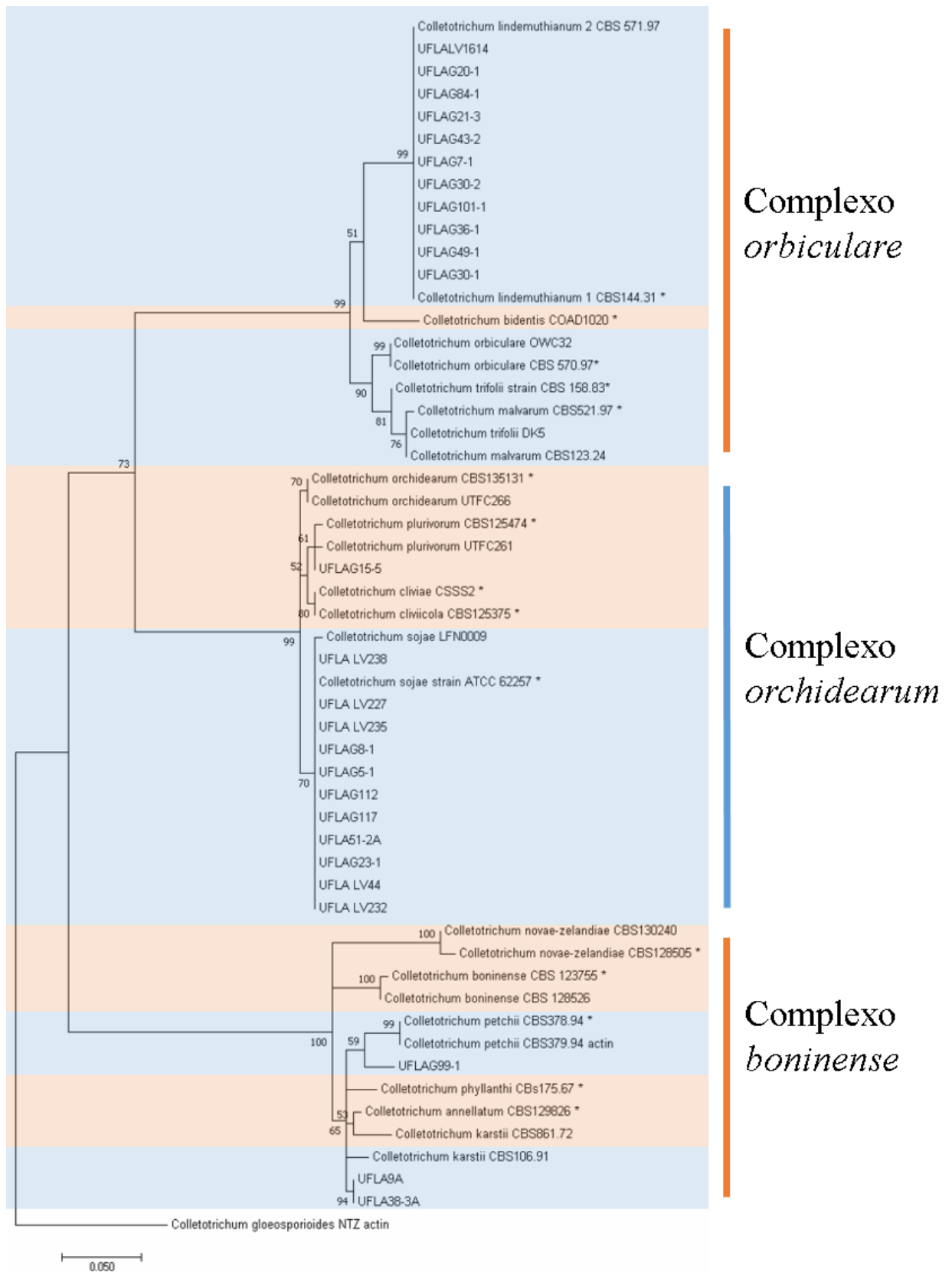
ANEXO A - Árvore filogenética de isolados de *C. lindemuthianum*, *C. plurivorum* e *glomerella* para a região gênica ITS



## ANEXO B - ÁRVORE FILOGUENÉTICA DO GENE DE B-TUBULINA



## ANEXO C - Árvore filogenética do gene Actina



## ANEXO D - Árvore filogenética do gene GAPDH

