



**MARGOT OKAGAWA FALLEIROS**

**USO DE MISTURA DE RAÇAS DE *C.  
lindemuthianum* NA AVALIAÇÃO DA  
ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG  
2016**

**MARGOT OKAGAWA FALLEIROS**

**USO DE MISTURA DE RAÇAS DE *C. lindemuthianum* NA AVALIAÇÃO  
DA ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

Dissertação 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 mestre.

Orientadora  
Prof(a). Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS - MG  
2016**

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

Falleiros, Margot Okagawa.

Uso de mistura de raças de *C. lindemuthianum* na avaliação da  
antracnose no feijoeiro / Margot Okagawa Falleiros. – Lavras :  
UFLA, 2016.

65 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. Raças 65 73 e 81. 2. Inoculação artificial. 3. Mistura de  
raças. 4. *Phaseolus vulgaris*. 5. Melhoramento visando resistência. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MARGOT OKAGAWA FALLEIROS**

**USO DE MISTURA DE RAÇAS DE *C. lindemuthianum* NA AVALIAÇÃO  
DA ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

Dissertação 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 mestre.

APROVADA em 15 de setembro de 2016.  
Dr. João Bosco dos Santos UFLA  
Dra. Maria Cristina Mendes Costa UNILAVRAS

Orientadora  
Prof(a). Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS - MG  
2016**

*Aos meus pais, Alceu e Margareth, por serem meus exemplos de vida.  
Aos meus irmãos, Alceu, Alessandro e Márjori, pelo apoio, amor e carinho.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça da vida.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora e orientadora Dra. Elaine Aparecida de Souza, pela confiança, orientação e ensinamentos durante toda condução do trabalho.

Aos membros da banca, professor João Bosco e professora Maria Cristina, por contribuírem de forma decisiva para a melhoria deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, por todas as colaborações na realização deste trabalho, amizade e convivência.

Ao Paulinho, por ter me recebido de coração aberto, me ensinando e auxiliando desde a graduação.

Aos laboratoristas Miller e Lamartine, pela ajuda e disponibilidade sempre que necessário.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Lilian, Rafaela, Zélia, Ironдина e Raimundo, pela disposição e auxílio oferecidos.

Ao amigos do Gen, pela amizade, ajuda e companheirismo.

Às meninas XX, por todas as noites de risadas e momentos vividos, eles serão inesquecíveis.

Às companheiras de república, Carol, Roxane e Isabela, pela amizade, convivência e carinho

Ao Jonas, pelo companheirismo, amor, carinho e paciência.

À minha avó Tomiko, por toda sua sabedoria.

Aos meus pais, Alceu e Margareth, por serem meus exemplos, meu porto seguro e por acreditarem no meu sonho.

Aos meus irmãos, Alceu, Alessandro e Márjori, que sonharam comigo e caminharam ao meu lado torcendo para que nada desse errado.

Aos meus familiares e amigos, por estarem sempre presentes na minha vida apesar das minhas ausências.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho fosse alcançado.

## RESUMO

A grande variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* tem dificultado a obtenção de cultivares com resistência durável à antracnose no feijoeiro. As avaliações por meio da inoculação artificial de diferentes raças podem ser inviáveis num programa de melhoramento uma vez que, muitas raças fisiológica já foram encontradas. Uma alternativa é a utilização da mistura de isolados de diferentes raças. Contudo, são escassas as informações sobre a eficiência deste método na seleção de plantas resistentes de feijoeiro e sobre a virulência da mistura de isolados do patógeno. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a severidade da antracnose no feijoeiro a partir da inoculação das raças 65, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* individualmente e também em misturas, e comparar a virulência dos isolados/misturas. Para isso, foram realizados dois experimentos, ambos em delineamento inteiramente casualizado com parcela subdividida, em que os isolados foram inoculados individualmente e em mistura das três raças (M1), sendo obtidas também misturas de 1ª (M2 e M3) e 2ª (M4, M5, M6 e M7) gerações, nas cultivares Pérola e Majestoso. A área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e as notas da severidade da antracnose aos 10 dias após a inoculação foram avaliadas. Os isolados/misturas foram caracterizados quanto a compatibilidade micelial, taxa de esporulação e porcentagem de germinação e tubos de anastomose entre conídios (CATs). A partir dos resultados obtidos, foi evidenciado que a mistura de raças de *C. lindemuthianum* foi eficiente na avaliação da severidade da antracnose e que a maioria das misturas de raças de *C. lindemuthianum* foram mais virulentas que as raças individualmente.

Palavras-Chave: Raças 65, 73 e 81. Inoculação artificial. Mistura de raças. *Phaseolus vulgaris*. Melhoramento visando resistência.



## ABSTRACT

Wide pathogenic variability of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* has made it difficult to obtain cultivars with durable resistance to anthracnose in common bean. Assessments by artificial inoculation of different races can be unviable in common bean breeding program since many physiological races have been found. An alternative is using mixture of isolates from different races. However, there are scarce information about the efficiency of this method in the selection of resistant common bean plants and the virulence of pathogen isolates mixture. Thus, the aim of this study was to assess the severity of anthracnose in common bean through inoculation of races 65, 73 and 81 of *C. lindemuthianum* individually and in mixture, and compare the virulence of isolates/mixture. Two experiments were conducted, both in completely randomized design with Split plot. Isolates were inoculated individually as well in a mixture of the three races (M1) and also obtaining mixtures of the 1<sup>st</sup> (M2 and M3) and 2<sup>nd</sup> (M4, M5, M6 and M7) generations, in the cultivars Pérola and Majestoso. Area under the disease progress curve (AUDPC) and scores of the severity at 10 days after inoculation were evaluated. The isolates/mixtures were characterized as to mycelial compatibility, sporulation rate and percentage of germination and conidial anastomosis tubes (CATs). From the results obtained, it was evidence that the mixture of races of *C. lindemuthianum* was efficient in evaluating the severity of anthracnose and most mixtures of races of *C. lindemuthianum* were more virulent than the races individually.

Keywords: Races 65, 73 and 81. Artificial inoculation. Mixture of races. *Phaseolus vulgaris*. Breeding for resistance.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	A cultura do feijão no Brasil .....	15
2.2	Antracnose no feijoeiro .....	15
2.3	Variabilidade patogênica de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	18
2.4	Uso de mistura de raças de fungos na inoculação artificial no hospedeiro .....	21
2.5	Caracterização fisiológica, citológica e patogênica de <i>C. lindemuthianum</i> .....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1	Material genético.....	27
3.2	Inoculação de isolados das raças 65, 73 e 81 individualmente e em misturas de <i>C. lindemuthianum</i> no feijoeiro.....	28
3.2.1	Preparo do inóculo.....	28
3.2.2	Inoculação no feijoeiro .....	28
3.2.3	Condução dos experimentos .....	29
3.3	Teste de patogenicidade.....	30
3.3.1	Área abaixo da curva do progresso da doença.....	31
3.4	Reisolamento .....	32
3.5	Compatibilidade micelial e sexual .....	32
3.6	Capacidade de esporulação.....	33
3.7	Porcentagem de germinação e anastomose entre conídios.....	33
3.8	Análises estatísticas.....	34
4	RESULTADOS .....	37
4.1	Avaliação da área abaixo da curva.....	37
4.2	Compatibilidade micelial e sexual .....	46
4.3	Taxa de esporulação .....	46
4.4	Germinação e anastomose entre conídios .....	47
5	DISCUSSÃO .....	51
6	CONCLUSÕES .....	57
	REFERÊNCIAS.....	59



## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos principais componentes da dieta alimentar da população brasileira. Seus grãos são excelentes fontes de proteínas, calorias e minerais. No entanto, a ocorrência de doenças pode causar expressivos danos à cultura e conseqüentemente, redução na produtividade e qualidade dos grãos. Entre essas doenças, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das de maior importância do feijoeiro, podendo ocasionar perdas de até 100% (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

O controle da antracnose por meio da utilização de cultivares resistentes vem se destacando por apresentar grande potencial em minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. Contudo, a grande variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum* tem dificultado o controle da doença por meio de cultivares com resistência durável (PINTO et al., 2012). Em todo o mundo, já foram encontradas mais de 100 raças fisiológicas, sendo que no Brasil, as raças 65, 73, 81 e 89 tem sido as mais frequentes (PEREIRA et al., 2010; PINTO et al., 2012; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Além disso, no Brasil tem sido detectada variabilidade patogênica dentro das raças 65 e 81 (COSTA et al., 2015; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011; ISHIKAWA et al., 2013). As diferenças entre e dentro das raças também são observadas para características morfológicas, fisiológicas e culturais (ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2008; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Devido a esta alta variabilidade, o monitoramento constante deste patógeno é essencial para auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes à antracnose do feijoeiro.

A resistência à antracnose do feijoeiro é predominantemente vertical, sendo que a interação *C. lindemuthianum*- *P. vulgaris* segue o modelo gene-a-

gene. Na literatura têm sido relatados 20 genes de resistência à antracnose do feijoeiro (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; ZUIDERVEEN et al., 2016). Além disso, têm sido identificados 12 genes duplicados que conferem resistência a seis isolados diferentes da raça 65 (COSTA et al., 2015). Apesar da presença da resistência vertical, os vários genes já identificados evidencia a herança poligênica desse caráter. Portanto, para obtenção de cultivares com resistência duradoura essas devem ser resistentes a maioria das raças de *C. lindemuthianum*.

A avaliação da reação de linhagens e progênies de feijoeiro ao *C. lindemuthianum* tem sido realizada por meio da inoculação artificial de isolados monospóricos das raças mais frequentes (BARCELOS et al., 2013; COSTA et al., 2015). No entanto, quando o número de raças é elevado, torna-se necessária uma grande quantidade de sementes, o que pode inviabilizar a avaliação das progênies num programa de melhoramento. Uma alternativa é o uso de uma mistura de isolados das diferentes raças do patógeno, no entanto, as informações na literatura sobre a eficiência deste método na avaliação da antracnose no feijoeiro são escassas e não há informações sobre a virulência do patógeno quando se utiliza a mistura.

*C. lindemuthianum* apresenta um mecanismo potencial de recombinação assexual que são os tubos de anastomoses entre conídios (CATs), um tipo de hifa especializada que permite a fusão entre conídios e tubos germinativo. Os CATs permitem a troca de material genético entre conídios de diferentes raças, alterando a virulência das mesmas (ISHIKAWA et al., 2012). Porém, não há relatos sobre a ocorrência de recombinação e alteração da virulência com a utilização de mistura de raças de *C. lindemuthianum* no feijoeiro. Portanto, essas informações são importantes para os programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares resistentes à antracnose e também, para o conhecimento da evolução deste patógeno assexual. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a severidade da antracnose no feijoeiro a partir da inoculação das raças 65, 73 e

81 de *C. lindemuthianum* individualmente e também em misturas, e comparar a virulência dos isolados/misturas.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do feijão no Brasil

O feijoeiro comum pertence à família Fabacea, gênero *Phaseolus* L. e espécie *Phaseolus vulgaris* L. É uma espécie autógama que apresenta baixa taxa de fecundação cruzada, sendo inferior a 1,4% (VIEIRA et al., 2005). Os grãos do feijoeiro comum são muito importantes para a maioria dos brasileiros, integrando-se aos componentes básicos da dieta alimentar por ser uma excelente fonte de proteínas, calorias e fibras alimentares, especialmente para a população de baixa renda. É rico em potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco, magnésio e minerais essenciais ao metabolismo humano (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Apesar da sua importância, vários fatores limitam a produção do feijoeiro. Entre eles destacam-se a ocorrência de doenças, diminuindo a produtividade da cultura e a qualidade dos grãos (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). Nesse contexto, a produção dessa leguminosa no país é uma questão relevante tratada pelos melhoristas que visam evitar perdas drásticas, fazendo com que a produção aumente a fim de atender a demanda populacional. Uma das maneiras de se obter tal resultado é por meio do controle e manejo das doenças tal como, a antracnose, por meio da resistência genética.

### 2.2 Antracnose no feijoeiro

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cavara, é uma das doenças de maior importância do feijoeiro, ganhando destaque nas zonas subtropicais e temperadas, especialmente em regiões com temperaturas moderadas, entre 15 e 22 °C, associadas a alta umidade relativa (BIANCHINI; MORINGONI; CARNEIRO, 2005;



CARBONELL et al., 2012). No Brasil, esta doença prevalece nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As perdas ocasionadas por esta doença podem ser da ordem de 100%, principalmente quando sementes contaminadas ou cultivares suscetíveis são utilizadas para o plantio e ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (SINGH; SCHWARTZ, 2010; PAULA JÚNIOR et al., 2015).

Os sintomas da antracnose aparecem em qualquer órgão na parte aérea da planta, a partir do quinto dia de contato com o fungo. No caule e no pecíolo as lesões possuem coloração escura com formato oval e deprimido. Nas folhas as lesões iniciam na face abaxial em torno das nervuras, com pequenas manchas de cor pardo-avermelhada passando para marrom escura a negra. Já nas vagens as lesões são também deprimidas, porém arredondadas com o centro claro, delimitado por um anel levemente protuberante de coloração negra e rodeado por uma borda laranja-avermelhada. O patógeno pode afetar também as sementes causando ligeira descoloração e o aparecimento de cancrios com coloração variando de amarela a marrom escura ou negra. Quando em condições favoráveis de umidade e temperatura, pode-se observar uma massa rosada no centro das lesões decorrente da esporulação (SARTORATO, 1988). A antracnose pode ocorrer em todos os estádios de crescimento da planta, porém as perdas na produção serão mais severas quanto mais precoce for seu aparecimento.

O processo infeccioso inicia-se a partir da germinação dos conídios que, sob condições favoráveis, ocorre cerca de 18 horas após a deposição sobre o hospedeiro. Durante esse processo, o conídio adere ao tecido da planta e germina, emitindo o tubo germinativo que sofre uma complexa diferenciação na sua extremidade livre, formando o apressório. Esse, adere-se à superfície vegetal, sendo essencial para a penetração que ocorre mecanicamente pela cutícula e epiderme do hospedeiro. A penetração ocorre através da formação de

hifas de infecção que se desenvolvem a partir do apressório (O'CONNELL et al., 2000; PERFECT et al., 1999). Nas cultivares suscetíveis para o patossistema *C. lindemuthianum* - *P. vulgaris*, as células penetradas se mantêm, inicialmente, vivas.

Após a penetração, o patógeno apresenta duas fases de infecção: uma inicial, biotrófica e uma secundária, necrotrófica. Durante a fase biotrófica, o patógeno se estabelece no hospedeiro com o aumento de tamanho e crescimento das hifas primárias. As membranas das células infectadas expandem e invaginam-se em torno de vesículas de infecção sem, contudo, desenvolver sintomas perceptíveis a olho nu. Após 24 horas, com a infecção de várias células do hospedeiro, as hifas crescem entre as paredes celulares e o protoplasto, e as células infectadas começam a degenerar, dando origem a fase necrotrófica. Nesta fase, hifas secundárias de diâmetro variável são formadas e se ramificam intra e extracelularmente. As hifas intracelulares começam a retirar os nutrientes das células, matando-as rapidamente. Sem a indução dos mecanismos de defesa por parte da planta, a morte das células vegetais acarreta no aparecimento dos sintomas macroscópicos da doença, a partir do sexto dia após o início da infecção (BIANCHINI; MORINGONI; CARNEIRO, 2005; O'CONNELL et al., 2000). Esse tipo de infecção caracteriza o fungo *C. lindemuthianum* como parasita hemibiotrófico (BAILEY; JEGER, 1992; WHARTON; JULIAN; O'CONNELL, 2001).

O patógeno pode sobreviver como micélio dormente no interior do tegumento das sementes e em restos culturais na forma de esporos, sendo sua disseminação a curta distância por meio de respingos de chuva, ventos, implementos agrícolas, pelo homem, por insetos e vários outros agentes. Além disso, a disseminação pode ser a longa distância com o uso de sementes infectadas, fato que apresenta maior fonte de inóculo do ponto de vista

epidemiológico (BARBOSA; GONZAGA, 2012; PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

Diversos métodos são empregados para tornar eficaz o controle da antracnose, entre eles estão, o uso de sementes livres do patógeno, a rotação de culturas com plantas não hospedeiras, uso de produtos químicos e o uso de cultivares resistentes (SARTORATO; RAVA; RIOS, 1996). Dentre esses métodos, a utilização de cultivares resistentes vem se destacando por apresentar grande potencial em minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. No entanto, a obtenção de cultivares com resistência durável é dificultada pelo fato do agente causal apresentar grande variabilidade patogênica (BIANCHINI; MORINGONI; CARNEIRO, 2005).

O conhecimento dos níveis de variabilidade dentro e entre populações do patógeno, assim como a determinação das raças predominantes em cada região de cultivo do feijoeiro é essencial para auxiliar os melhoristas de plantas a obter sucesso no desenvolvimento de cultivares de feijão com resistência genética à antracnose (PINTO; SOUZA; OLIVEIRA, 2010; RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994).

### **2.3 Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum***

O fungo *C. lindemuthianum* possui ampla diversidade de virulência, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética (PEREIRA et al., 2010). Os primeiros estudos a respeito dessa variabilidade foram realizados por Barrus (1911, 1918), ao observar que cultivares de feijão apresentavam sintomas diferentes quando inoculadas com isolados de *C. lindemuthianum* obtidos de diferentes regiões produtoras e identificar duas raças distintas do patógeno. Essas raças foram denominadas de Alfa e Beta. Posteriormente, várias raças foram descritas, em

vários países, com o uso de nomenclaturas locais baseadas na reação à séries diferenciadoras compostas por grupos de cultivares locais mescladas a algumas cultivares diferenciadoras tradicionais, utilizadas inicialmente para designar raças com reações diferenciadas (ANDRUS; WADE, 1942; YERKES JÚNIOR; ORTIZ, 1956).

Diante da utilização de diferentes conjuntos de cultivares diferenciadoras para a classificação das raças de *C. lindemuthianum*, perdas de informações ocorreram devido às dificuldades na obtenção de paridade entre raças identificadas a partir de metodologias locais, levando à necessidade do estabelecimento de um sistema padronizado. Com o objetivo de padronizar a nomenclatura das raças e facilitar a troca de informações entre pesquisadores de diferentes regiões, foi aprovado, na Primeira Reunião Latino Americana da Antracnose do Feijoeiro, realizada no CIAT (Cali, Colômbia), a adoção de um conjunto de cultivares diferenciadoras e uma nova metodologia para a nomenclatura das raças do patógeno da antracnose. Este método de identificação de raças fisiológicas consiste no uso de um Sistema Binário apresentado por HABGOOD (1970) usando um grupo de 12 cultivares diferenciadoras proposto por Pastor-Corrales (1991), dispostas em uma ordem pré-estabelecida para classificar as raças de *C. lindemuthianum*. Cada uma dessas cultivares possui um valor binário de tal forma que o somatório dos valores binários das cultivares suscetíveis ao isolado inoculado designa a raça. Assim, o nome equivale a um número que representa o espectro de patogenicidade da raça, permitindo determinar se a raça é simples, ou seja, portadora de apenas um fator de virulência ou complexa com dois ou mais fatores de virulência. Este sistema permite identificar um total de  $2^n=2^{12}=4096$  raças, em que n é o número de cultivares diferenciadoras, com seus respectivos valores binários (Tabela 1).

Atualmente, mais de 100 raças fisiológicas já foram identificadas em todo o mundo sendo que no Brasil tem sido mais frequentes as raças 65, 73, 81 e

89 (PEREIRA et al., 2010; PINTO et al., 2012; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Além da variabilidade entre raças, estudos também têm observado a existência de variabilidade dentro das raças 65 e 81 (DAVIDE; SOUZA, 2009; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011; ISHIKAWA et al., 2013). Costa et al. (2015), utilizando seis isolados, caracterizados por meio do conjunto internacional de cultivares diferenciadoras como pertencentes a raça 65, e nove cultivares comerciais adaptadas às condições de cultivo do Brasil, identificaram a presença de 12 genes, sendo a resistência condicionada por genes duplicados em que o alelo dominante confere resistência. Estudos demonstram que além da diferença de patogenicidade, as raças também diferem para características morfológicas, fisiológicas e culturais (MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012).

A ampla variabilidade patogênica apresentada pelo *C. lindemuthianum* é fundamentada na teoria gene-a-gene proposta por Flor (1956, 1971), que demonstra a relação entre os alelos que condicionam a virulência do patógeno e os alelos de suscetibilidade no hospedeiro, em que, para cada alelo de resistência no hospedeiro, existe um alelo específico de avirulência no patógeno. Estudos já tem identificado 20 alelos de resistência à antracnose em diferentes cultivares do feijoeiro, conferindo resistência a diversas raças do patógeno (FEREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Tal variabilidade pode ocorrer por diferentes mecanismos, os que criam variabilidade, ou seja, mutações, ou os que ampliam a variabilidade, como a recombinação sexual, parassexualidade, elementos transponíveis, anastomoses entre hifas (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994) e tubos de anastomoses entre conídios – Conidial Anastomosis Tubes (CATs) (ROCA et al., 2003, 2004; ISHIKAWA et al., 2012).

Tabela 1 Cultivares diferenciadoras utilizadas para identificação das raças de *Colletotrichum lindemuthianum* pelo sistema binário.

Cultivares Diferenciadoras	Valor Binário	Número da raça	Origem das Cultivares
1.Michelite	2 <sup>0</sup>	1	Mesoamericana
2.Michigan Dark Red Kidney	2 <sup>1</sup>	2	Andina
3.Perry Marrow	2 <sup>2</sup>	4	Andina
4.Cornell 49.242	2 <sup>3</sup>	8	Mesoamericana
5.Widusa	2 <sup>4</sup>	16	Andina
6.Kaboon	2 <sup>5</sup>	32	Andina
7.México 222	2 <sup>6</sup>	64	Mesoamericana
8.PI 207.262	2 <sup>7</sup>	128	Mesoamericana
9.TO	2 <sup>8</sup>	256	Mesoamericana
10.TU	2 <sup>9</sup>	512	Mesoamericana
11.AB 136	2 <sup>10</sup>	1024	Mesoamericana
12.G2333	2 <sup>11</sup>	2048	Mesoamericana

#### 2.4 Uso de mistura de raças de fungos na inoculação artificial no hospedeiro

O patossistema *C. lindemuthianum* - *P. vulgaris* apresenta resistência controlada por um ou poucos genes, ou seja, resistência vertical (DAVIDE; SOUZA, 2009). Esse tipo de resistência é caracterizado pela especificidade às

raças do patógeno, sendo efetivo contra apenas algumas raças e por tanto, de curta duração (VANDERPLANK, 1963). Devido a pequena durabilidade das cultivares resistentes, uma alternativa para se obter cultivares com resistência duradoura é a seleção de genótipos resistentes a mais de uma raça. Segundo Flor (1971), uma das maneiras mais eficientes para o controle de doenças em plantas é o desenvolvimento de cultivares com mais de um alelo de resistência vertical de genes diferentes.

De um modo geral, a inoculação artificial do patógeno no hospedeiro é realizada a partir de inóculo obtido de culturas monospóricas de um único isolado (BARCELOS et al., 2013; COSTA et al., 2015). Porém, no caso de *C. lindemuthianum* que apresenta uma grande variabilidade patogênica e assim, um elevado número de raças fisiológicas, essa metodologia torna-se onerosa, além de necessitar de uma grande quantidade de sementes. Isso torna a avaliação de progênies no programa de melhoramento para obtenção de cultivares com resistência duradoura inviável.

A inoculação artificial utilizando mistura de isolados tem sido utilizada em alguns trabalhos visando a resistência a doenças para garantir a predominância das raças presentes nas principais áreas produtoras, e pode ser considerada uma alternativa para viabilizar a avaliação de progênies no programa de melhoramento (BOTELHO et al., 2011; KOLMER; LIU, 2002; MACCAFERRI et al., 2008; MIRDITA et al., 2008; SCHNURBUSCH et al., 2004). No entanto, nestes estudos não foram realizadas avaliações referentes a caracterização da virulência desses inóculos.

Informações sobre o uso de mistura de isolados monospóricos são escassas na literatura. Casela, Ferreira e Santos (2001), trabalharam com a mistura de raças de *Colletotrichum sublineolum* em sorgo, com diferentes graus de complexidade quanto à virulência. A mistura foi inoculada em uma cultivar suscetível, por cinco e seis gerações e os isolados da raça com menor grau de

complexidade predominaram em relação aos isolados das raças mais complexas, indicando uma possível ação da seleção estabilizadora contra as raças de maior virulência na população do patógeno. Von der Ohe e Miedaner (2011) analisaram a agressividade competitiva em misturas binárias de diferentes isolados de *Fusarium graminearum* e *F. culmorum* em cultivares de trigo e observam diferenças significativas de agressividade entre isolados e as misturas. Estes autores relataram que a capacidade competitiva de um isolado particular numa mistura é dependente, principalmente, do ambiente, onde nem o tipo, nem a concentração de micotoxinas é vantajosa para a competição.

Chilipa, Lungu e Tembo (2016) avaliaram a severidade da antracnose em diferentes genótipos de feijão inoculados com as raças 54 e 311 individualmente e na mistura de ambas as raças. Estes autores sugerem que, devido aos efeitos sinérgicos da mistura de isolados de *C. lindemuthianum*, sua utilização é adequada para selecionar genótipos resistentes de feijão num programa de melhoramento. Mebrate e Cooke (2001) inocularam mistura de *Stagonospora nodorum*, agente causal da mancha da gluma, em quatro cultivares de trigo e observaram uma maior severidade da doença quando foi inoculada a mistura. Para estes autores, a alta agressividade exibida pela mistura de *S. nodorum* pode ser devido ao fato de que a resistência nas cultivares testadas pode ser controlada pela ação aditiva de vários genes. Neste caso, os diferentes alelos responsáveis pela virulência dos isolados individuais na mistura podem superar os vários alelos para resistência do hospedeiro e, conseqüentemente, causar sintomas da doença mais rapidamente. Assim, a agressividade da mistura de *S. nodorum* quando comparada com a do isolado mais agressivo, denominado Sn4, indica a importância da utilização da mistura de isolados na avaliação da resistência de cultivares de trigo.

De acordo com Singh e Singh (2005), raças quando inoculadas em mistura, em um hospedeiro suscetível, podem combinar geneticamente para



produzir novas raças que contenham a soma das especificidades parentais. O surgimento de recombinantes foi observado em estudos utilizando a inoculação artificial de mistura binária de *Rhynchosporium secalis* em uma cultivar suscetível de cevada (NEWMAN; OWEN, 1985).

## **2.5 Caracterização fisiológica, citológica e patogênica de *C. lindemuthianum***

Características como cor e textura das colônias, índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro da colônia, capacidade de esporulação, porcentagem de germinação e citologia dos conídios são essenciais para o desenvolvimento e disseminação do patógeno, e têm se mostrado um importante marcador morfológico em estudos genéticos (PINTO et al., 2012; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). O *C. lindemuthianum* apresenta micélio septado e ramificado com coloração variando de hialina à negra. O diâmetro da colônia pode variar de 31,50 a 73,00 mm, em uma velocidade de crescimento micelial variando de 1,76 a 4,50 mm/dia. Os conídios apresentam largura e comprimento variando de 4,09 a 6,19  $\mu\text{m}$  e 14,46 a 18,98 $\mu\text{m}$ , respectivamente. Eles podem ou não produzir septos após a germinação e formam uma massa de cor salmão no meio da cultura (PINTO et al., 2012).

Entre os conídios pode ocorrer a formação de tubos de anastomose (ROCA et al., 2003), que são um tipo especial de conexões entre células fúngicas que permitem a troca de metabólitos, organelas e material genético, afetando o comportamento genético e fisiológico do fungo. Com a troca de material genético, os CATs contribuem para a ampliação da variabilidade genética em fungos pela transferência horizontal de genes, podendo conferir vantagens para sobrevivência e adaptação (MEHRABI et al., 2011; ROCA et al., 2004; SOANES; RICHARDS, 2014).

Os tubos de anastomose entre conídios diferem dos tubos germinativos morfológicamente e fisiologicamente. Eles são mais finos e curtos e geralmente não sofrem ramificação. Além disso, os CATs diferem dos tubos germinativos pois crescem apenas a uma curta distância, ou seja, possuem crescimento determinado, e em direção a outro conídio, enquanto que as células vegetativas tendem a se evitar. Por fim, o CATs estão sob controle genético diferente dos tubos germinativos (ROCA et al., 2005).

A formação de CATs em *C. lindemuthianum* é dependente da densidade de conídios (ROCA; READ; WHEALS, 2005) e pode ser favorecida pela deficiência de nutrientes e idade da cultura (ISHIKAWA et al., 2010). Estudos de Ishikawa et al. (2010) observaram que a formação de CATs foi mais frequente após um tempo de incubação maior e quando coletados de colônias mais velhas.

A patogenicidade e a virulência de diferentes isolados do patógeno pode ser avaliada por meio da severidade da doença. Neste contexto, o progresso de uma determinada doença representa a integração dos efeitos do hospedeiro, patógeno e ambiente durante a doença e pode oferecer informações relevantes para analisar, comparar e entender a dinâmica temporal das doenças de plantas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Assim, este método consiste em fazer sucessivas avaliações em intervalos regulares de tempo e com os dados obtidos determinar a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990). A AACPD tem sido utilizada na avaliação da severidade da antracnose do feijoeiro (BOTELHO et al., 2011; PINTO et al., 2001; TALAMINI, 2003).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, em câmara de nebulização e em casa de vegetação, localizados no departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

#### 3.1 Material genético

Isolados da raça 65, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* pertencentes a micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças, foram utilizados (Tabela 2).

Tabela 2 Reação das cultivares diferenciadoras inoculadas com as raças de *C. lindemuthianum* definidos segundo o sistema binário de classificação.

Raças	Diferenciadoras*											
	2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>11</sup>
65	S						S					
73	S			S			S					
81	S				S		S					

\*2<sup>0</sup>- Michelite; 2<sup>1</sup>- Michigan Dark Red Kidney; 2<sup>2</sup>- Perry Marrow; 2<sup>3</sup>- Cornell 49.242; 2<sup>4</sup>- Widusa; 2<sup>5</sup>- Kaboon; 2<sup>6</sup>- México 222; 2<sup>7</sup>- PI 207.262; 2<sup>8</sup>- TO; 2<sup>9</sup>- TU; 2<sup>10</sup>- AB 136.

Adicionalmente foram utilizados inóculos obtidos a partir da mistura das três raças (M1), e de reisolamentos destas misturas inoculadas nas cultivares Pérola e Majestoso (M2, M3, M4, M5, M6 e M7). A descrição de cada mistura é apresentada nos itens 3.2.1 e 3.2.3.

As linhagens de feijoeiro que foram utilizadas pertencem ao banco de sementes do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras.

### **3.2 Inoculação de isolados das raças 65, 73 e 81 individualmente e em misturas de *C. lindemuthianum* no feijoeiro**

#### **3.2.1 Preparo do inóculo**

Um fragmento de cada isolado foi transferido para vagens estéreis parcialmente imersas em meio ágar-água, em tubos de ensaio e incubados de 10 a 15 dias, a 22 °C em BOD, no escuro. A suspensão de conídios foi preparada pela adição de água destilada no tubo de ensaio e raspagem da vagem com o auxílio de uma alça de platina, liberando os conídios. Esta suspensão foi filtrada com o auxílio de uma gaze para remoção dos fragmentos miceliais e ajustada na concentração de  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL pela contagem de conídios em câmara de Neubauer.

A suspensão de conídios da mistura das três raças (M1) foi obtida pela mistura equitativa da suspensão na concentração ajustada de conídios de cada raça, como mencionado anteriormente.

#### **3.2.2 Inoculação no feijoeiro**

Para inoculação, foram utilizadas as cultivares suscetíveis Pérola e Majestoso, previamente testadas quanto ao padrão de reação a cada isolado utilizado. Foi realizada a inoculação de cada isolado e das misturas dos isolados das raças 65, 73 e 81, após a expansão completa das folhas primárias, pulverizando ambas as faces das folhas e os talos até o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram incubadas em câmara de nebulização por 48 horas em câmara úmida com fotoperíodo de 12 horas e temperatura em torno de 20 °C. Após esse período de incubação, foram transferidas para casa de vegetação com temperatura em torno de 24 °C e umidade relativa de 95%.

### 3.2.3 Condução dos experimentos

Inicialmente foi realizado um pré-teste inoculando-se cada raça individualmente e a mistura M1 nas cultivares Pérola e Majestoso como descrito no item 3.2.2. A partir das lesões nas folhas das plantas de cada uma das cultivares foi realizado o reisolamento, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4, para obtenção do isolado da mistura de primeira geração. Estes isolados foram separados de acordo com a cultivar reisolada, sendo o isolado obtido a partir da cultivar Pérola denominado M2 e o obtido da cultivar Majestoso denominado M3.

Posteriormente, foram conduzidos dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado com parcela subdividida, com duas repetições. No primeiro as cultivares Pérola e Majestoso foram inoculadas com cada uma das três raças e cada uma das misturas (M1, M2 e M3). Novamente foi realizado o reisolamento como descrito anteriormente e assim, obtidos os isolados da mistura de segunda geração que foram separados de acordo com a cultivar aos quais foram reisolados. Assim, os isolados obtidos a partir da inoculação da mistura M2 na cultivar Pérola foi denominado M4 e na cultivar Majestoso denominado M5. Do mesmo modo, os isolados obtidos a partir da inoculação da mistura M3 na cultivar Pérola foi denominado M6 e na cultivar Majestoso denominado M7 (Figura 1).

Para o segundo experimento foi realizada a inoculação de cada uma das três raças e cada uma das misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), nas cultivares Pérola e Majestoso. A semeadura de cada cultivar, em todos os experimentos, foi feita em bandejas de poliestireno de 162 células com substrato Tropstrato HA<sup>®</sup>. A parcela foi constituída por 36 plantas.

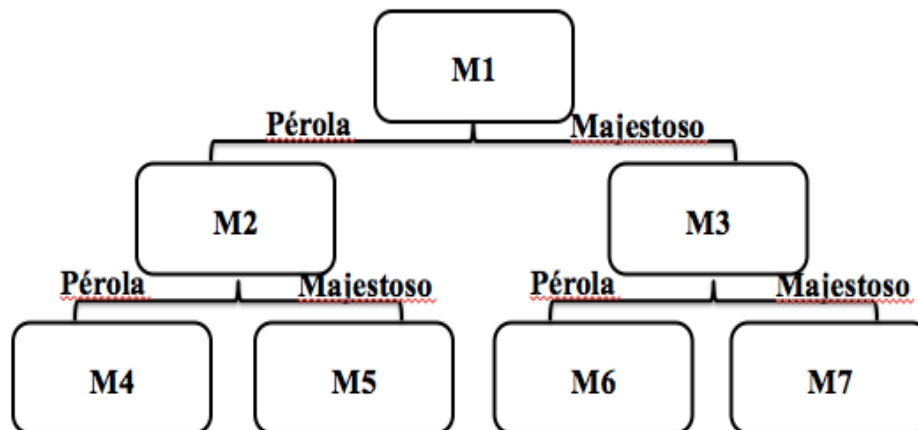


Figura 1 Esquema de denominação das misturas utilizadas nas inoculações.

### 3.3 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado a partir da inoculação artificial dos isolados e misturas. A severidade da antracnose foi avaliada visualmente do 3º ao 10º dia após a inoculação, de acordo com a escala descritiva de notas de 1 a 9 proposta por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987) (Tabela 3).

Tabela 3 Escala descritiva de notas para avaliação da severidade da antracnose no feijoeiro proposta por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987).

Nota	Descrição
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras principais apresentando manchas necróticas, perceptivas somente na face inferior das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
5	Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas.
9	Plantas mortas.

### 3.3.1 Área abaixo da curva do progresso da doença

A partir das notas obtidas nos diferentes dias de avaliação, foi estimada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) por meio da expressão adotada por Shaner e Finney (1977):



$$AACPD = \sum_{k=1}^n \left[ \frac{(Y_{k+1} + Y_k)}{2} x(T_{k+1} - T_k) \right]$$

Em que:

$Y_k$ : severidade da doença na época de avaliação  $k$  ( $k=1, \dots, n$ );

$Y_{k+1}$ : severidade da doença na época de avaliação  $k+1$ ;

$T_k$ : época de avaliação  $k$ , em número de dias após a inoculação (NDAD);

$T_{k+1}$ : época de avaliação  $k + 1$ .

A AACPD nada mais é do que a soma das áreas dos trapézios obtidos em um gráfico cuja abcissa é composta pelas épocas de avaliação.

### 3.4 Reisolamento

O reisolamento foi realizado após 10 dias da inoculação artificial. Foram reisoladas apenas as plantas inoculadas com as misturas, previamente avaliadas. Lesões do caule e das folhas foram coletadas, submersas em álcool por dois minutos depois em hipoclorito também por dois minutos para desinfestação, e lavadas com água destilada. Após esse procedimento, foram transferidas a uma placa de Petri contendo meio M3S. Com o crescimento e esporulação do patógeno oriundo das lesões, foram obtidas culturas monospóricas mantidas em meio de cultura M3S a 22 °C, no escuro.

### 3.5 Compatibilidade micelial e sexual

A compatibilidade micelial e sexual foi realizada para os isoladas das raças 65, 73 e 81. Discos miceliais de cada isolado foram colocados para crescer em uma mesma placa de Petri contendo meio M3S. A suspensão de esporos da mistura obtida como descrito no item 3.2.1 também foi utilizada para a

avaliação, em que uma alíquota dessa mistura foi transferida para placa de Petri contendo meio M3S.

A avaliação foi realizada após 15 dias de incubação em BOD, a 22 °C no escuro. A compatibilidade micelial é determinada quando há formação de linha de contato e mistura uniforme dos micélios. Já a compatibilidade sexual é determinada quando há formação de estruturas reprodutivas, ou seja peritécios.

### **3.6 Capacidade de esporulação**

Para a avaliação da capacidade de esporulação foi conduzido um experimento em DIC com três repetições. Vagens estéreis parcialmente imersas em meio ágar-água em tubos de ensaio foram inoculadas com os isolados das raças 65, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e com as misturas M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 utilizadas na inoculação artificial das plantas. Cada vagem foi incubada a 22 °C por 15 dias no escuro e constituiu em uma parcela. Suspensões de conídios de cada isolado e mistura foram obtidas pela adição de 7 mL de água estéril no tubo de ensaio e raspagem da vagem com o auxílio de uma alça de platina. Esta suspensão foi filtrada em Miracloth estéril para remoção dos fragmentos miceliais e uma alíquota de 10 µL foi retirada. Realizou-se a leitura da concentração de conídios com o auxílio da câmara de Neubauer.

### **3.7 Porcentagem de germinação e anastomose entre conídios**

Na avaliação de porcentagem de germinação e anastomose entre conídios, foi conduzido um experimento em DIC em um esquema de parcela subdividida no tempo com duas repetições. Suspensões de conídios na concentração de  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL foram obtidas como descrito anteriormente a partir das vagens parcialmente imersas em meio ágar-água com 15 dias de incubação. Uma alíquota de 200 µL de cada suspensão de conídio foi

adicionada em câmaras de cultivo de oito células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubada no escuro a 22 °C por 24 e 48 horas. Foram avaliados 100 conídios por repetição por meio de microscopia de epifluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1). As imagens do microscópio de epifluorescência foram capturadas usando o software Axiovision Zeiss e processadas usando o software Image J.

Conídios que apresentam tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que seu diâmetro são considerados germinados. A formação de CATs é quantificada como a porcentagem de conídios envolvidos em fusões (ISHIKAWA et al., 2010).

### 3.8 Análises estatísticas

As estimativas da AACPD em cada experimento e os dados obtidos da severidade da antracnose aos 10 dias após a inoculação foram submetidos à análise de variância com parcela subdividida, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + e_{ij} + c_k + tc_{ik} + e_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ijk}$ : observação referente ao isolado/mistura  $i$ , na repetição  $j$  e cultivar  $k$ ;

$\mu$ : média geral;

$t_i$ : efeito do isolado/mistura  $i$  ( $i=1,2,\dots,10$ );

$e_{ij}$ : erro experimental ao nível de parcela;

$c_k$ : efeito da cultivar  $k$  ( $k=1,2$ )

$tc_{ik}$ : efeito da interação entre o isolado/mistura  $i$  e a cultivar  $k$ ;

$e_{ijk}$ : erro experimental associado à observação  $Y_{ijk}$ .

Os dados obtidos da capacidade de esporulação foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij}: \mu + t_i + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$ : observação referente ao isolado/mistura  $i$ , na repetição  $j$ ;

$\mu$ : média geral;

$t_i$ : efeito do isolado/mistura  $i$  ( $i=1,2,\dots,10$ );

$e_{ij}$ : erro experimental associado à observação  $Y_{ij}$ .

Para porcentagem de germinação e CATs foi realizada a análise de variância com parcela subdividida no tempo.

Para todos os dados foram realizadas comparações entre as médias utilizando o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises de variâncias e teste de média foram realizadas utilizando o Software estatístico R.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da área abaixo da curva

A AACPD nas cultivares Pérola e Majestoso de feijoeiro, obtida entre o 3º e o 10º dias após a inoculação individual dos isolados das raças 65, 73 e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* e misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), foi obtida para os experimentos 1 e 2 (Figura 2). A estimativa da AACPD possibilita quantificar a ação do patógeno e verificar o progresso da doença ao longo do tempo. Assim, quanto maior o valor de AACPD, maior a virulência do patógeno sobre o hospedeiro.

A análise de variância (ANAVA) foi realizada para ambos os experimentos e os resultados são apresentados na Tabela 4. Para o experimento 1, todas as fontes de variação foram significativas, exceto para a interação isolados/misturas x cultivares, indicando que não houve diferença no comportamento dos diferentes isolados/misturas nas diferentes cultivares. Já para o experimento 2, todas as fontes de variação foram significativas, exceto o desdobramento da cultivar Majestoso: Isolados/Misturas. Assim, não houve diferença na AACPD nesta cultivar quando inoculada com os diferentes isolados/misturas. O coeficiente de variação foi de baixa magnitude para ambos os experimentos. Observa-se que os isolados que causam reação de suscetibilidade na cultivar Pérola apresentaram nota acima de três a partir do quinto e sexto dias após a inoculação no experimento 1 e 2, respectivamente (Figura 2A e 2C). Já a cultivar Majestoso apresentou-se resistente a todos os isolados, exceto para o isolado da raça 65 e mistura M1, sendo que neste caso notas acima de três foram obtidas a partir do quinto dia.

As médias da AACPD nas cultivares Pérola e Majestoso (Tabela 5) foram agrupadas em duas classes pelo teste de Scott-Knott, no experimento 1.

Os isolados 65 e M1 foram os mais virulentos em ambas as cultivares. Em média a cultivar Pérola apresentou maiores valores da AACPD quando comparada a Majestoso. Para o experimento 2, os isolados/misturas inoculados na cultivar Pérola formaram três grupos e nesse caso, as misturas M3, M4 e M5 foram as que apresentaram maiores valores de AACPD. Verifica-se que o isolado da raça 65 proporcionou a maior AACPD no experimento 1, no entanto, está no grupo com menor AACPD no experimento 2.

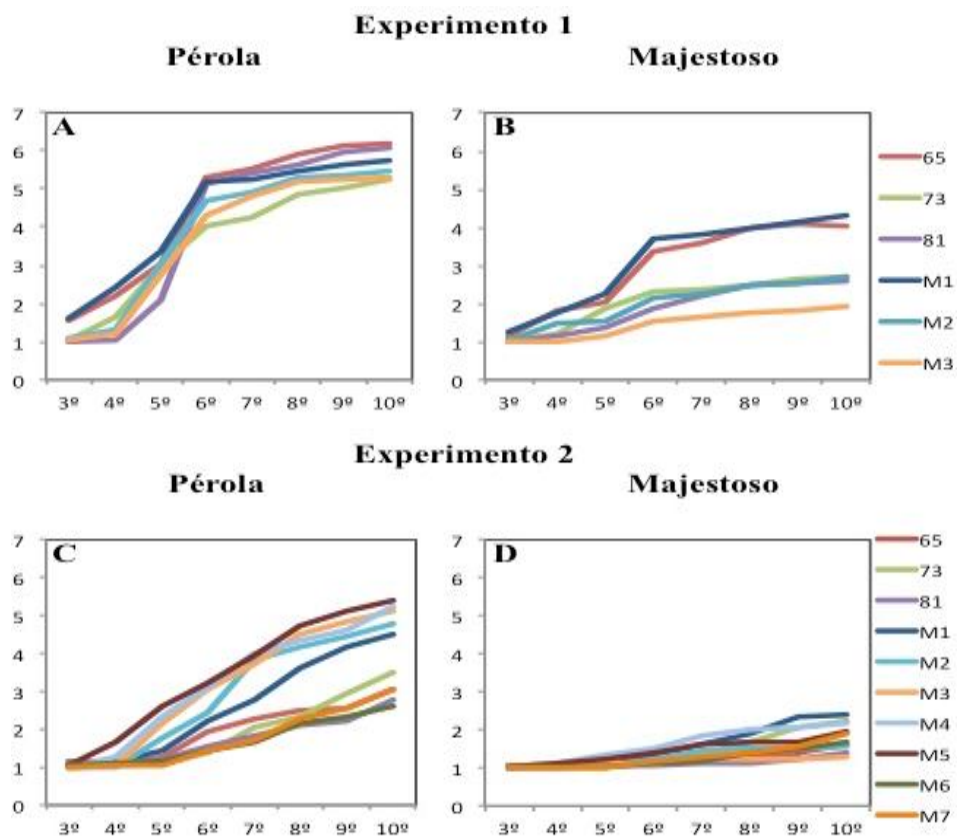


Figura 2 Curva do progresso da severidade da antracnose em plantas do feijoeiro, entre o 3º e o 10º dia após a inoculação individual de raças de *C. lindemuthianum* (65, 73 e 81) e misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) nas cultivares Pérola (A e C) e Majestoso (B e D).

Tabela 4 Análises de variância da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) da severidade da antracnose nas cultivares Pérola e Majestoso inoculadas com diferentes isolados de *C. lindemuthianum* e misturas, nos experimentos 1 e 2.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
<b>Experimento 1</b>				
Isolado/Mistura (I)	5	48,52	15,59	< 0,01
Erro (a)	6	3,11		
Cultivar (C)	1	943,38	50,38	< 0,001
I x C	5	8,93	0,48	0,78
Erro (b)	6	18,73		
Média Geral = 22,4				
CVparcela = 7,87%				
CVsubparcela = 19,29%				
<b>Experimento 2</b>				
Isolado/Mistura (I)	9	34,00	10,96	< 0,001
Erro (a)	10	3,74		
Cultivar (C)	1	596,76	192,41	< 0,001
I x C	9	21,74	7,01	< 0,01
Pérola:Isolado/Mistura	9	52,61	16,96	< 0,01
Majestoso:Isolado/Mistura	9	3,14	1,01	0,46
Erro (b)	10	2,46		
Média Geral = 13,2				
CVparcela = 14,62%				
CVsubparcela = 11,85%				

Na Figura 2, nota-se que até o 4º dia após a inoculação os isolados e misturas apresentam comportamento semelhante e a partir do 4º dia é que eles começam a diferir quanto a severidade da antracnose. Isto pode ser confirmado pelos valores das amplitudes de variação que foram de maior magnitude a partir do 4º dia de avaliação (Tabela 6). No entanto, observa-se notas médias superiores a quatro a partir do 6º dia no experimento 1, e no 2 somente no 10º dia de avaliação.



Tabela 5 Médias da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) da severidade da antracnose para as cultivares Pérola e Majestoso inoculadas com diferentes isolados de *C. lindemuthianum* e misturas, nos experimentos 1 e 2.

Raça/Mistura	Experimento 1		Experimento 2	
	Pérola	Majestoso	Pérola	Majestoso
65	32,0 A	21,6 A	13,8 C	8,5 A
73	25,9 B	14,8 B	13,0 C	9,9 A
81	28,8 B	13,5 B	12,0 C	7,8 A
M1	31,1 A	22,5 A	18,2 B	11,0 A
M2	27,8 B	14,4 B	20,6 B	9,0 A
M3	26,7 B	10,4 B	22,4 A	8,1 A
M4	-	-	22,8 A	11,6 A
M5	-	-	24,5 A	10,2 A
M6	-	-	11,7 C	8,7 A
M7	-	-	12,1 C	8,9 A

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Visando facilitar a comparação do comportamento das raças com as misturas em relação à virulência foram obtidas as Figuras 3 e 4. As raças 65 e 81 e as misturas M1, M2 e M3 apresentaram virulência semelhante na cultivar Pérola, bem como na intensidade do progresso da antracnose no experimento 1 (Figuras 3A, 3B e 3C). A maioria das misturas foram mais virulentas na cultivar Pérola no experimento 2 (Figuras 4A, 4B e 4C). Na cultivar Majestoso a mistura M1 foi mais virulenta do que os isolados das raças 65, 73 e 81, em ambos os experimentos (Figuras 3D, 3E, 3F, 4D, 4E e 4F).

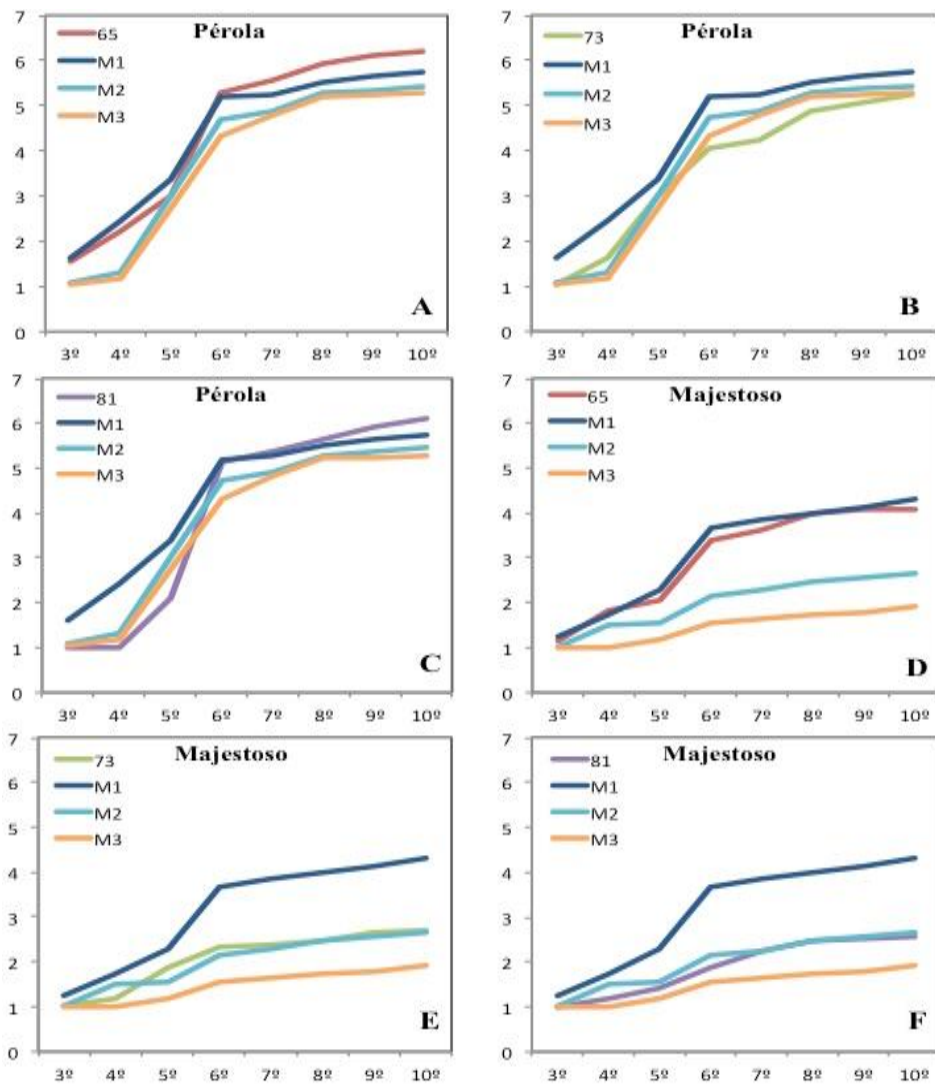


Figura 3 Curva da severidade do progresso da antracnose realizada entre o 3º e o 10º dia após a inoculação nas cultivares Pérola e Majestoso, comparando as misturas (M1, M2 e M3) com os isolados de cada raça de *C. lindemuthianum*.

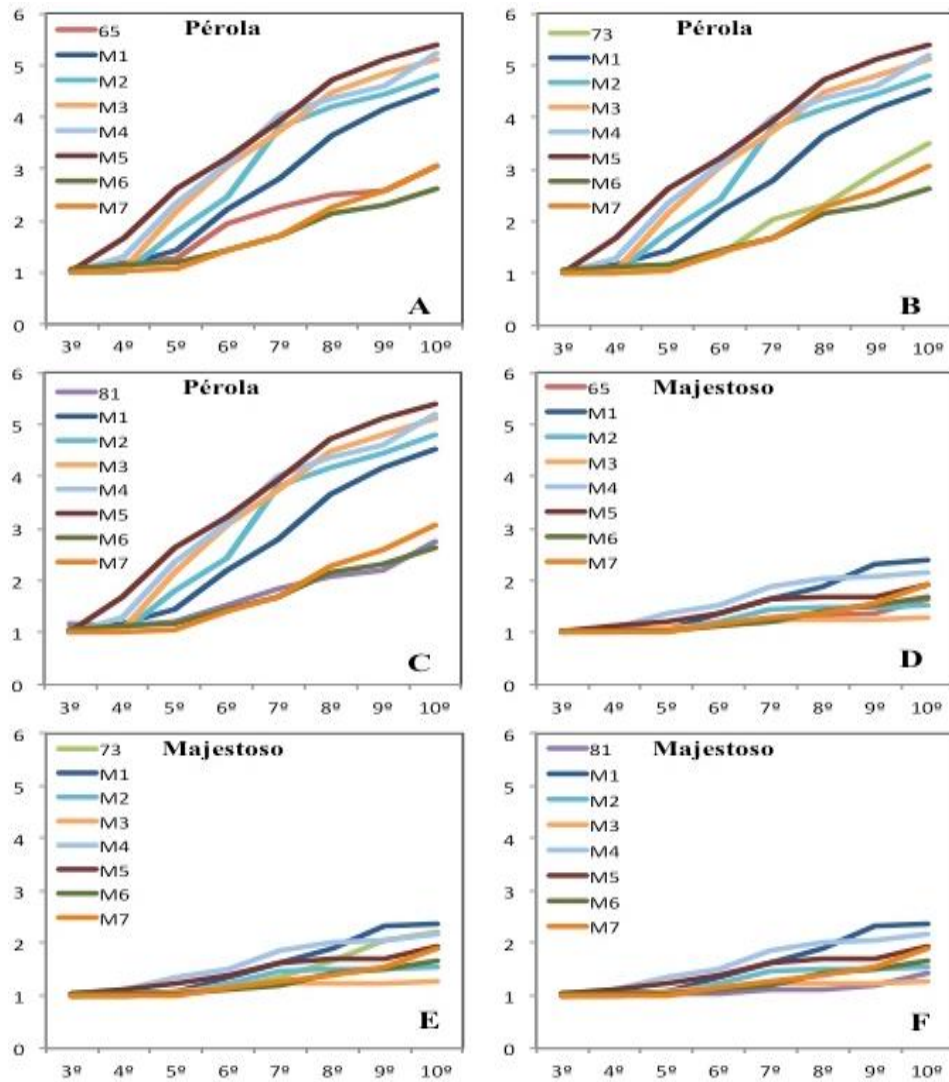


Figura 4 Curva da severidade do progresso da antracnose realizada entre o 3<sup>o</sup> e o 10<sup>o</sup> dia após a inoculação nas cultivares Pérola e Majestoso, comparando as misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) com os isolados de cada raça de *C. lindemuthianum*.

Entre as cultivares, as notas de cada isolado e mistura, bem como a média de todas as inoculações, na cultivar Pérola no 10º dia após a inoculação apresentaram valores superiores que na cultivar Majestoso, para ambos os experimentos. Isso confirma a maior suscetibilidade na cultivar Pérola em relação a cultivar Majestoso.

Para o experimento 2, a cultivar Majestoso foi resistente a todos os isolados e misturas uma vez que as notas obtidas foram menores que 3.

Com as notas obtidas no 10º dia após a inoculação (Figura 7), foi realizada a ANAVA para a severidade da antracnose do experimento 2 (Tabela 7). Todas as fontes de variação foram significativas, inclusive a interação e o desdobramento da cultivar Pérola. O teste de médias para essa cultivar separou as misturas M1, M2, M3, M4 e M5 dos demais inóculos, apresentando notas médias superiores, o que significa que estes inóculos foram mais virulentos (Tabela 8). O desdobramento da cultivar Majestoso: Isolados/Misturas foi não significativo, ou seja, os isolados e as misturas apresentaram o mesmo padrão de baixa virulência nesta cultivar.

Tabela 6 Nota média da severidade da antracnose (1 a 9) e, entre parêntesis, sua variação avaliada do 3º ao 10º dia após a inoculação (NDAI) nas cultivares Pérola e Majestoso.

Cultivar	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
	Experimento 1							
Pérola	1,22 (1,00-1,61)	1,63 (1,02-2,44)	2,87 (2,09-3,38)	4,78 (4,03-5,28)	5,02 (4,23-5,55)	5,40 (4,87-5,91)	5,55 (5,05-6,12)	5,66 (5,23-6,19)
Majestoso	1,07 (1,00-1,25)	1,40 (1,00-1,82)	1,72 (1,17-2,29)	2,50 (1,55-3,69)	2,66 (1,65-3,84)	2,85 (1,76-4,00)	2,96 (1,80-4,13)	3,04 (1,91-4,33)
	Experimento 2							
Pérola	1,03 (1,00-1,16)	1,17 (1,00-1,67)	1,62 (1,07-2,63)	2,17 (1,37-3,21)	2,79 (1,69-4,03)	3,27 (2,08-4,72)	3,58 (2,21-5,12)	4,00 (2,63-5,39)
Majestoso	1,01 (1,00-1,04)	1,04 (1,00-1,12)	1,10 (1,02-1,35)	1,23 (1,04-1,53)	1,40 (1,11-1,87)	1,53 (1,13-2,04)	1,66 (1,21-2,33)	1,82 (1,28-2,39)

Tabela 7 Análise de variância do segundo experimento da severidade da antracnose 10 dias após a inoculação individual dos isolados das raças 65, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* e misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) nas cultivares Pérola e Majestoso.

FV	GL	QM	Fc	Pr > Fc
Isolado/Mistura (I)	9	1,50	7,70	< 0,01
Erro (a)	10	0,20		
Cultivar (C)	1	47,61	409,17	< 0,001
I x C	9	1,22	10,44	< 0,001
Pérola:Isolado/Mistura	9	2,45	15,72	< 0,001
Majestoso:Isolado/Mistura	9	0,27	1,72	0,15
Erro (b)	10	0,11		

Média Geral = 2,9  
 CVparcela = 15,20%  
 CVsubparcela = 11,73%

Tabela 8 Notas médias da severidade da antracnose (1 a 9), 10 dias após a inoculação individual de raças de *C. lindemuthianum* (65, 73 e 81) e misturas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), nas cultivares Pérola e Majestoso.

Isolado/Mistura	Médias	
	Pérola	Majestoso
65	3,1 B	1,6 A
73	3,5 B	2,2 A
81	2,8 B	1,4 A
M1	4,5 A	2,4 A
M2	4,8 A	1,5 A
M3	5,1 A	1,3 A
M4	5,2 A	2,2 A
M5	5,4 A	1,9 A
M6	2,6 B	1,7 A
M7	3,1 B	1,9 A

Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

## 4.2 Compatibilidade micelial e sexual

Inicialmente foi avaliada a compatibilidade micelial entre as diferentes raças para verificar a possibilidade de comunicação entre as hifas dessas raças. Na placa, os isolados cresceram porém, não houve mistura de micélio e formação da linha de contato indicando a incompatibilidade entre eles (Figura 5A). A incompatibilidade sexual foi confirmada pois, não foram observadas estruturas reprodutivas, peritécios, na placa de cultivo com a mistura das suspensões de esporos das três raças (Figura 5B).

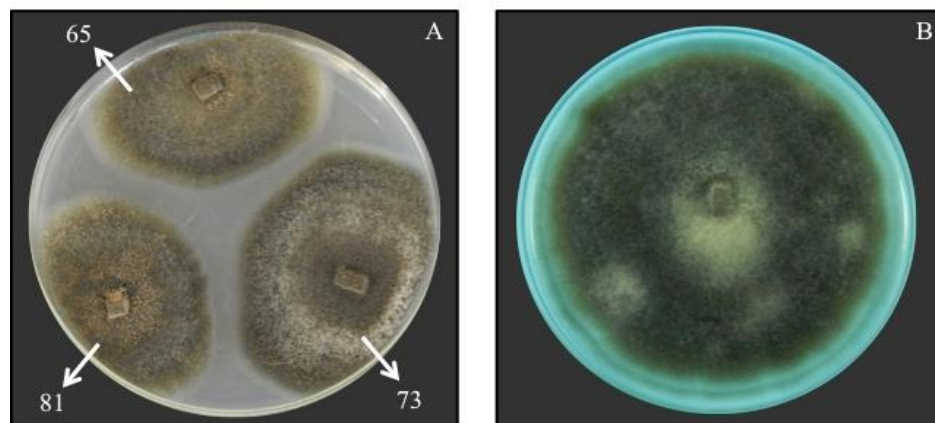


Figura 5 Incompatibilidade micelial (A) e sexual (B) entre os isolados das raças 65, 73 e 81.

## 4.3 Taxa de esporulação

Visando atender os pressupostos da análise de variância, os dados de esporulação foram transformados em raiz quadrada. A fonte de variação isolados/misturas foi significativa ( $P < 0,001$ ) sendo que as médias da taxa de esporulação dos isolados e misturas foram separadas em dois grupos, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 9). Os isolados das raças

65, 73, 81 e as misturas M3 e M4 não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram maior taxa de esporulação em relação as demais misturas.

#### **4.4 Germinação e anastomose entre conídios**

Na ANAVA realizada para porcentagem de germinação de esporos, a interação isolados/misturas x tempo foi significativa ao nível de 5% de probabilidade, indicando que a porcentagem de germinação dos diferentes isolados/misturas não foi coincidente nos tempos avaliados. As médias da porcentagem de conídios germinados separaram os isolados/misturas em dois e três grupos, pelo teste de Scott-Knott, nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. No tempo de 24 horas, os isolados que apresentaram maior porcentagem de germinação foram os da raça 65 e 73 e a mistura M3 enquanto que no tempo de 48 horas foi a M6 (Tabela 9).

Para porcentagem de anastomose entre conídios a interação isolados/misturas x tempo não foi significativa. Todos os isolados/misturas apresentaram CATs (Figura 6) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, foram classificadas em três grupos distintos, sendo que o isolado da raça 65 e a mistura M3 apresentaram as maiores porcentagens de CATs (Tabela 9).



Tabela 9 Estimativas de médias da taxa de esporulação ( $\times 10^6$  esporos/mL), e porcentagem de germinação e anastomose entre conídios as 24 e 48 horas de isolados e misturas de *C. lindemuthianum*.

Isolado/Mistura	Esporulação $\times 10^6$	% de Germinação		% de CATs	
		24h	48h	24h	48h
65	3,64 A	22,0 A	33,0 B	11,0 A	19,0 A
73	3,64 A	13,5 A	26,0 B	5,0 C	11,0 C
81	2,97 A	5,5 B	12,5 C	1,0 C	12,0 C
M1	0,79 B	3,5 B	14,0 C	1,0 C	9,0 C
M2	0,13 B	6,0 B	17,0 C	1,0 C	3,0 C
M3	2,96 A	17,0 A	30,0 B	13,0 A	21,0 A
M4	1,99 A	3,5 B	11,0 C	1,0 C	9,0 C
M5	0,31 B	5,0 B	17,0 C	0 C	6,0 C
M6	1,73 B	8,5 B	40,0 A	7,0 B	16,0 B
M7	0,98 B	2,5 B	11,0 C	1,0 C	5,0 C

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

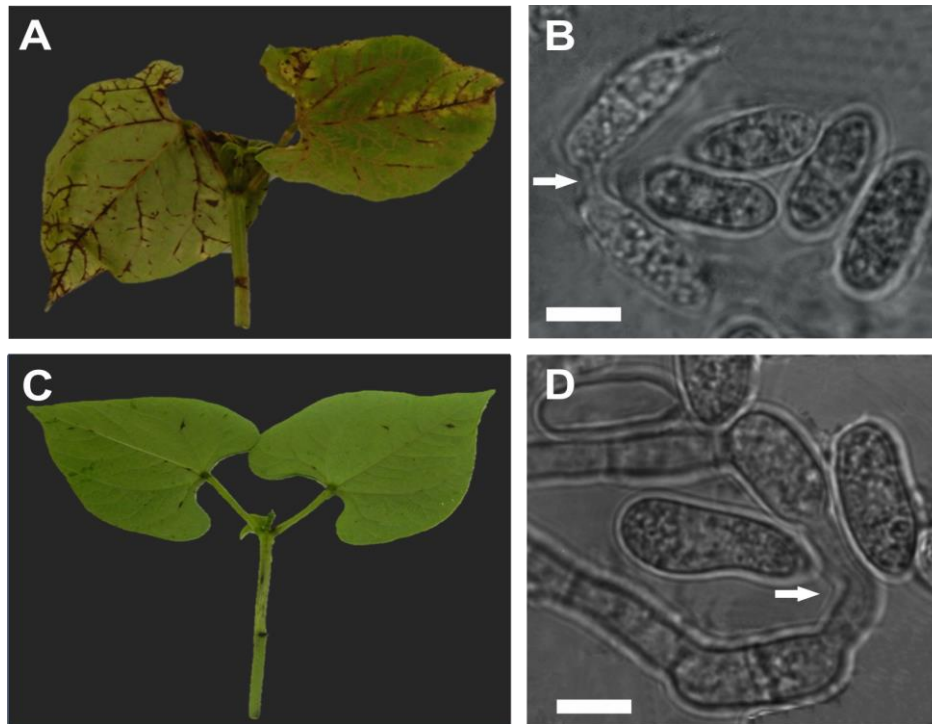


Figura 6 Sintomas da antracnose aos 10 dias após a inoculação na cultivar Pérola (A) e Majestoso (C). Formação de CATs (B e D), fusão dos tubos (seta).



Figura 7 Plantas das cultivares Pérola e Majestoso aos 10 dias após a inoculação dos isolados de *C. lindemuthianum* e misturas.



## 5 DISCUSSÃO

O patossistema *C. lindemuthianum* - *P. vulgaris* apresenta resistência predominantemente vertical porém com vários genes já identificados conferindo resistência à diferentes raças do patógeno (COSTA et al., 2015; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; ZUIDERVEEN et al., 2016). Assim, as cultivares resistentes possuem uma pequena durabilidade e uma alternativa para se obter cultivares com resistência duradoura é a seleção de genótipos resistentes a mais de uma raça. A inoculação artificial de mistura de isolados de diferentes raças é uma alternativa, no entanto, são escassas as informações sobre a virulência do patógeno quando em mistura. No presente trabalho, os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que AACPD da severidade da antracnose foi maior para os isolados da raça 65 e da mistura M1, em ambas as cultivares avaliadas no experimento 1. No entanto, o mesmo comportamento não se verifica no experimento 2.

De um modo geral, a média da AACPD foi maior no experimento 1 do que no experimento 2 (Tabela 5). Observa-se que o progresso da severidade da antracnose foi mais rápido e intenso no experimento 1 para os isolados/misturas de *C. lindemuthianum* avaliados em ambos os experimentos. Uma provável explicação seria as condições ambientais na casa de vegetação mais favoráveis durante a realização do experimento 1. Apesar do controle da umidade e temperatura em casa de vegetação, temperaturas acima 30 °C podem dificultar a obtenção de condições em torno de 15 a 25 °C, que são favoráveis ao desenvolvimento da doença (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

De acordo com os resultados obtidos no experimento 1, a AACPD foi maior para o isolado da raça 65 e a mistura M1 em ambas as cultivares. No entanto, no experimento 2 as misturas M3, M4 e M5 apresentaram AACPD de maior magnitude enquanto, as três raças 65, 73 e 81 e as misturas M6 e M7 as de

menor magnitude. A raça 81 apresenta um fator de virulência a mais que a raça 65 (Tabela 2) e no entanto, apresentou a mesma virulência que as demais no experimento 2. Já no experimento 1 a raça mais simples, ou seja, a 65 foi a mais virulenta juntamente com a mistura M1. Estes resultados corroboram com a literatura que relata que o conjunto internacional de diferenciadoras não tem conseguido discriminar toda a variabilidade patogênica nos isolados do Brasil (CARBONELL et al. 2012; COSTA et al. 2015; ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011). Considerando os fatores de virulência, a mistura (M1) possui os fatores  $2^0$  e  $2^6$  (Tabela 2) em maior proporção uma vez que todas as raças avaliadas possuem esses fatores. Portanto, os fatores de virulência  $2^3$  e  $2^4$ , presentes nas raças 73 e 81, respectivamente, estão em menor proporção na mistura. Este fato pode justificar o comportamento semelhante da mistura (M1) com o observado para a raça 65.

A maior magnitude da AACPD e também das notas da severidade da antracnose na cultivar Pérola das misturas M1, M2, M3, M4 e M5 indicam um aumento na virulência das raças quando em mistura e também, ao longo das gerações de reisolamento, exceção apenas para as misturas M6 e M7. No caso do isolado M1 que é oriundo da mistura das três raças, apesar da concentração de cada raça estar reduzida a um terço ( $4 \times 10^5$ ) do que quando inoculada separadamente ( $1,2 \times 10^6$ ), a virulência da mistura foi maior ou igual a dos demais isolados/misturas. No entanto, a concentração de  $10^5$  conídios/mL tem proporcionado resultado semelhante à concentração normalmente recomendada ( $1,2 \times 10^6$ ) para a avaliação da severidade da antracnose do feijoeiro (DAVIDE; SOUZA, 2009). A maior virulência apresentada pela mistura M1 pode ser devida a um efeito sinérgico entre estas, como já verificado neste patossistema por Chilipa, Lungu e Tembo (2016). Estes autores constataram que o inóculo da mistura das raças 54 e 311 de *C. lindemuthianum* causou maior severidade da antracnose que as raças inoculadas individualmente em plantas de feijoeiro e

sugerem o uso de misturas na seleção de progênies resistentes em um programa de melhoramento. Outra provável explicação seria a ocorrência de heterose, pois na mistura há a presença de alelos de diferentes raças contribuindo para a virulência do patógeno. Além disso, todas as raças avaliadas formam CATs e estas hifas especializadas permitem a transferência de metabólitos entre conídios, favorecendo o estabelecimento do patógeno (ROCA et al 2004). A ocorrência de CATs *in vivo* em plantas de feijoeiro tem sido observada (ISHIKAWA et al., 2008) e isto poderia contribuir para este efeito heterótico quando se utilizam misturas.

Já no caso das misturas oriundas da 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gerações de reisolamento a diferença na virulência em relação às raças individualmente pode ter ocorrido pela troca de material genético entre as mesmas. Os isolados das raças 65, 73 e 81 foram pareados e apresentaram incompatibilidade micelial, portanto, não houve fusão entre as hifas desses isolados (Figura 5A). De acordo com Hastie (1981) a fusão de hifas é o primeiro passo para a ocorrência do ciclo parassexual, um mecanismo que permite a recombinação entre fungos assexuais. A mistura de inóculo dessas raças quando plaqueada também não apresentou estruturas reprodutivas, o que indicaria a possibilidade de reprodução entre essas linhagens (Figura 5B). No entanto, *C. lindemuthianum* apresenta um mecanismo potencial de recombinação assexual denominado de tubos de anastomoses entre conídios (CATs) que pode promover a transferência horizontal de genes/cromossomos (ISHIKAWA et al., 2012; MEHRABI et al., 2011; SOANES; RICHARDS, 2014). A alteração na virulência de recombinantes oriundos de colônias heterocarióticas obtidas após a fusão de CATs entre linhagens de *C. lindemuthianum* das raças 65 e 72 foi observada por Ishikawa et al. (2012). No presente trabalho, a capacidade de formação dos isolados/misturas das raças 65, 73 e 81 foi avaliada (Tabela 9) sendo que todas as raças e misturas formaram CATs (Figura 6). A diferença na virulência de

diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* tem sido atribuída a presença de cromossomos de linhagem específica (MA et al., 2010). Os isolados utilizados no presente trabalho foram caracterizados quanto ao número de cromossomos pela eletroforese de campo pulsado sendo observados cinco, nove e oito cromossomos para isolados das raças 65, 73 e 81, respectivamente (GONÇALVES et al., 2015; SOUZA, et al., 2016). Neste trabalho foram observados três e um minicromossomos (<1Mb) nas linhagens das raças 73 e 81. Portanto, apesar dos isolados pertencerem a mesma espécie existe ampla plasticidade em relação ao genoma e a sua organização, fato que também tem sido observado em outros fitopatógenos (CROLL; MCDONALD, 2012; MEHABI; TAGA; KEMA, 2007).

A menor magnitude da AACPD e também das notas da severidade da antracnose nas misturas M6 e M7 (Tabelas 5 e 8) indicam que houve uma redução na virulência ao longo das gerações de reisolamento da mistura M1 inicialmente inoculada na cultivar Majestoso. Essa redução pode estar relacionada à ação da seleção estabilizadora que é eficiente contra raças com virulência desnecessária na população do patógeno (VANDERPLANK, 1968), favorecendo os alelos 1 ( $2^0$ ) e 64 ( $2^5$ ), que estavam em maior frequência na primeira mistura, em relação aos alelos 8 e 16 das raças 73 e 81, respectivamente. Casela, Ferreira e Santos (2001) observaram diferenças na capacidade competitiva de raças de *C. sublineolum* após cinco e seis gerações da inoculação da mistura em cultivares de sorgo, indicando uma possível ação da seleção estabilizadora contra raças de maior virulência na população do patógeno. Neste trabalho, esses resultados foram obtidos com apenas duas gerações, porém vale ressaltar que na literatura não há relatos sobre a ocorrência de recombinantes via CATs em *C. sublineolum*, mecanismo que é comum, frequente e tem se mostrado potencial na recombinação assexuada em *C. lindemuthianum* (ISHIKAWA et al. 2012; MOTA et al 2016; PINTO et al

2012). Além disso, a formação de CATs observada em todos os isolados/misturas avaliadas no presente trabalho reforça essa hipótese.

Observando os resultados da AACPD e severidade aos 10 dias após a inoculação, nota-se que tanto os isolados/misturas como as cultivares utilizadas apresentaram comportamentos diferentes e a interação isolados/mistura x cultivar foi significativa (Tabelas 4 e 7). Estes resultados indicam diferenças na virulência dos isolados/misturas assim como na resistência das cultivares e que os isolados/misturas se comportam diferentemente em cada cultivar. Isso também foi constatado por Von der Ohen e Miedaner (2011) que observaram comportamentos significativamente diferentes na agressividade entre os isolados e as misturas e relataram que o ambiente foi responsável pela capacidade competitiva de um isolado particular numa mistura. A diferença na severidade da antracnose nas cultivares avaliadas é evidenciada pela Figura 4. Observa-se que a cultivar Pérola apresenta comportamento típico de resistência vertical enquanto que a Majestoso, a reação é de resistência horizontal ou vertical parcial. A presença de resistência horizontal na cultivar Majestoso é interessante, principalmente porque na literatura alguns autores têm defendido a utilização desses genes na obtenção de resistência durável (NG'AYU-WANJAU, 2016; ROBINSON, 1996).

Foram avaliadas outras características dos isolados/misturas, além da patogenicidade. A taxa de esporulação, germinação de isolados de *C. lindemuthianum* são características que podem interferir no processo de infecção, colonização e desenvolvimento da antracnose no feijoeiro (ISHIKAWA et al. 2008, PINTO et al. 2012). As correlações entre essas características e a severidade da antracnose aos dez dias após a inoculação dos isolados/mistura foram obtidas e as estimativas foram negativas e inferiores 0,5. Portanto, os isolados/misturas que apresentam maior esporulação e/ou germinação de conídios não necessariamente, foram os que apresentaram



sintomas mais severos da antracnose. Ausência de correlação entre essas características também foi constatada por Abreu e Souza (2015) no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* - *P. vulgaris*.

Além da severidade semelhante ou até mesmo maior das misturas em relação às raças individuais, elas podem ser mais eficientes na seleção de progênies com diferentes níveis de resistência porque as misturas reúnem maior número de alelos de virulência. Desta forma, é importante utilizar a mistura das raças a cada inoculação, e não se deve utilizar misturas obtidas de reisolamentos, pois neste caso a seleção estabilizadora estará atuando sobre a população do patógeno.

## 6 CONCLUSÕES

-A mistura de raças de *C. lindemuthianum* foi eficiente na avaliação da severidade da antracnose do feijoeiro;

-A maioria das misturas de raças de *C. lindemuthianum* avaliadas foi mais virulenta que as raças individualmente.



## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 2, p. 6879-6896, 2015.
- ANDRUS, C. F.; WADE, B. L. **The factorial interpretation of anthracnose resistance in beans**. Washington: USDA. Technical Bulletin, 810, 1942.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: C.A.B. International, 1992.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. DE O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2012-2014. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio do Goiás, p. 247, 2012.
- BARCELOS, Q. L. et al. Investigation of sources of resistance to anthracnose disease in a *Phaseolus vulgaris* germplasm collection in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 56, p. 37–38, 2013.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, v. 1, n. 6, p. 190–195, 1911.
- BARRUS, M. F. Varietal susceptibility of beans to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) B. and C. **Phytopathology**, v. 8, p. 589–614, 1918.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. p.79-97
- BIANCHINI, A.; MORINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. v.2 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333–349.
- BOTELHO, F. B. S. et al. Multiline as a strategy to reduce damage caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 3, p. 175-180, 2011.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Monitoring epidemics diseases. In: \_\_\_\_\_. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. p. 107-128.

CARBONELL, S. A. M et al. Antracnose. In: Paula Júnior, T. J. De; Wendland, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: Epamig, 2012. p. 15-39.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, F. G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 217–220, 2001.

CHILIPA, L. N. K.; LUNGU, D. M.; TEMBO, L. Multiple race inoculation as an option in breeding for resistance to *C. lindemuthianum* in common beans. **Journal of Agriculture and Crops**, v. 2, n. 5, p. 45-50, 2016.

COSTA, L. C. et al. Different genes conferring resistance to race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Bean Improvement Cooperative 2015 Bienal meeting**, Niagara Falls, Canadá. p. 28, 2015.

CROLL, D.; MCDONALD, B. A. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002608, 2012.

DAVIDE, L. M. C.; SOUZA, E. A. DE. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 23–30, 2009.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of Genes Conferring Resistance to Anthracnose in Common Bean. In: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. (Eds.). **Translational Genomics for Crop Breeding**. 1. ed. Iowa: JohnWiley & Sons, 2013. p. 151–176.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, v. 9, p. 275–296, 1971.

GONÇALVES, P. R. C. et al. Chromosomal characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Glomerella* spp. strains isolated from anthracnose lesion in common bean (abstract). In: 28<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference, 2015, Asilomar Conference Grounds.

HABGOOD, R. M. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, v. 227, n. 5264, p. 1268–1269, set. 1970.

HASTIE, A. C. The genetics of conidial fungi. In: COLE, G.T.; KENDRICK B. (Eds.). **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. p. 511-547.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, v. 63, n. 2, p. 156-161, 2008.

ISHIKAWA F. H. et al. Symptoms and pre-penetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 270-257, aug. 2010.

ISHIKAWA, F. H.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 2, p. 461–464, 2011.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31175, fev. 2012.

ISHIKAWA, F. H. et al. *Colletotrichum lindemuthianum* exhibits different patterns of nuclear division at different stages in its vegetative life cycle. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 795–801, 2013.

KOLMER, J. A.; LIU, J. Q. Inheritance of leaf rust resistance in the wheat cultivars AC Majestic, AC Splendor, and AC Karma. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 3, p. 327–331, set. 2002.

MA, L. J. et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 367-373, 2010.

MACCAFERRI, M. et al. A major QTL for durable leaf rust resistance widely exploited in durum wheat breeding programs maps on the distal region of chromosome arm 7BL. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 8, p. 1225–1240, 2008.

MEBRATE, S. A.; COOKE, B. M. Response of wheat cultivars to infection by *Stagonospora nodorum* isolates/mixture on detached and intact seedling leaves. **Euphytica**, v. 122, n. 2, p. 263–268, 2001.

MEHRABI, R.; TAGA, M.; KEMA, G. H. J. Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. **Mycologia**, v. 99, n. 6, p. 868-876, 2007.

MEHRABI, R. et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. 542-554, 2011.

MIRDITA, V. et al. Genetic variation for resistance to ergot (*Claviceps purpurea* [Fr.] Tul.) among full-sib families of five populations of winter rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 1, p. 85-90, 2008.

MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1/15027176-22, 2016.

NEWMAN, P. L.; OWEN, H. Evidence of asexual recombination in *Rhynchosporium secalis*. **Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 338–340, set. 1985.

NG'AYU-WANJAU, B. N. et al. Development of a breeding method for durable resistance to angular leaf spot in common bean. **Euphytica**, v. 208, n. 1, p. 91-100, 2016.

O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 393.

PASTOR-CORRALES, M. A. Estandarizacion de variedades diferenciales y de designacion de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 81, p. 694, 1991.

PAULA JÚNIOR, T. J. DE; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; BOREM, A. (Eds.). **Feijão**. Viçosa: UFV, 2006. p. 359–414.

PAULA JÚNIOR, T. J. DE; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: Epamig, 2012. p. 157.

PAULA JÚNIOR, T. J. DE et al. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 384.

PEREIRA, R. et al. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p. 224–225, 2010.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal genetics and Biology**, v. 27, n. 2, p. 186–98, jan. 1999.

PINTO, A. C. S. et al. Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. **Summa phytopatológica**, v. 27, n. 4, p. 392-398, 2001.

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v. 29, n. 8, p. 838–842, ago. 2010.

PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490–497, 2012.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 167–172, 1994.

ROBINSON, R. A. **Return to resistance: breeding crops to reduce pesticide resistance**. Davis: AgAcces, 1996. p. 460.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 40, n. 2, p. 138–145, 2003.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, nov. 2004.

ROCA, M. G. et al. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryote Cell**, v. 4, n. 5, p. 911–919, 2005.



ROCA, M. G.; READ, N. D.; WHEALS, A. E. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 2, p. 191-198, 2005.

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. DE O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p. 457-477.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAUJO, R. S. et al. (Eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1996. p. 669-700.

SCHNURBUSCH, T. et al. Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the Lr34 chromosomal region. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 3, p. 477-484, 2004.

SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. Standard system the evaluation of bean germoplasm. Cali: CIAT, 1987. p. 54.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, E. A. DE; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 4, p. 241-247, abr. 2007.

SINGH, D. P.; SINGH, A. **Disease and Insect Resistance in Plants**. Science Publishers, 2005. p. 417.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SOANES, D.; RICHARDS, T. A. Horizontal gene transfer in eukaryotic plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 583-614, 2014.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de

marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000- 1006, 2007

SOUZA, E. A. et al. Understanding the behavior and relationship of *Colletotrichum* spp. Strains from common bean (abstract). In: *Colletotrichum* Workshop, 2016, 13<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Paris.

TALAMINI, V. **Progresso especial e temporal da antracnose a partir de diferentes níveis de inóculo inicial em sementes de feijoeiro**. 2003. 144 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: Epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. p. 349.

VANDERPLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. p. 206.

VIEIRA, C. et al. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 301–391.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 600.

VON DER OHE, C.; MIEDANER, T. Competitive aggressiveness in binary mixtures of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 6, p. 401–410, 2011.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 149–158, 2001.

YERKES JÚNIOR, W. D.; ORTIZ, M. T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. **Phytopathology**, v. 46, n. 10, p. 564–567, 1956.

ZUIDERVEEN, G. H. et al. Genome-wide association study of anthracnose resistance in andean beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156391, 2016.