



MARIANA ANDRADE DIAS

**VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. E *Glomerella* spp.
ASSOCIADAS A SARNA E A ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG
2019**

MARIANA ANDRADE DIAS

**VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. E *Glomerella* spp. ASSOCIADAS A SARNA
E A ANTRACNOSE DO 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.

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Coorientador

**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).

Dias, Mariana Andrade.

Variabilidade de *colletotrichum*spp. e *glomerella* spp.
associadas a sarna e antracnose do feijoeiro. / Mariana Andrade
Dias. - 2019.

67 p. : il.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Coorientador(a): Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Melhoramento Genético. 3.
Temperatura. I. Souza, Elaine Aparecida de. II. Medeiros, Flávio
Henrique Vasconcelos de. III. Título.

MARIANA ANDRADE DIAS

**VARIABILIDADE DE *Colletotrichum* spp. E *Glomerella* spp. ASSOCIADAS A SARNA
E A ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO**

**VARIABILITY OF *Colletotrichum* spp. AND *Glomerella* spp. ASSOCIATED THE
SCABIES AND ANTHRACNOSE OF THE BEAN**

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 22 de fevereiro de 2019.

Dra. Maria Cristina Mendes Costa UNILAVRAS

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Coorientador

**LAVRAS – MG
2019**

*Aos meus pais, José e Andréa, à minha irmã Juliana, ao meu marido Breno e ao meu tio
Tadeu, que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta caminhada.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por se fazer presente nela, iluminando sempre o meu caminho.

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

Aos meus pais, José e Andréa, pelo incentivo, apoio incondicional, paciência, amor, e por todos os sonhos dos quais abriram mão para que o meu se realizasse.

À minha irmã Juliana, pela paciência, carinho, atenção e dedicação, e por toda a ajuda nesse trabalho.

Ao meu Tio Tadeu e à minha avó Júnia (*in memoriam*), por todo o carinho e ensinamentos durante estes anos.

Ao meu marido Breno, por toda a paciência, carinho, amor, por sempre estar ao meu lado em todos momentos, e por sempre me apoiar e entender todas as minhas ausências. Minha eterna gratidão, carinho e amor.

À professora Elaine, pela oportunidade, pela orientação na elaboração e execução deste projeto, pelos ensinamentos, pela paciência e confiança.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas: César, Magno, João Cândido, José Airton e Flávia, pelo conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Aos amigos de Laboratório de Resistência, os que já se foram e os que permanecem ainda no laboratório, em especial à Ana, por toda a ajuda, amizade e a prazerosa convivência. Ana, sem você este trabalho não existiria.

À minha amiga Carol, por toda a paciência, por toda ajuda, por toda a amizade e companheirismo, e por tornar os meus dias de trabalho mais prazerosos e felizes.

Ao Miller, pela disposição, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

Aos amigos dessa jornada, obrigada pela paciência, convivência, e desculpe pelos estresses diários.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para que este sonho se tornasse realidade.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O gênero *Colletotrichum* causa doenças em diversos hospedeiros, apresentando ampla variabilidade entre e dentro das espécies. Sua fase teleomórfica é denominada *Glomerella*. No feijoeiro comum a antracnose causa muitos prejuízos, sendo seu agente etiológico o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. No entanto, tem sido observado nos campos de produção, uma doença emergente, a sarna, que vem sendo associada ao gênero *Colletotrichum*, porém, ainda não se sabe a espécie. Diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento e estabelecimento do patógeno no hospedeiro. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e da sensibilidade a diferentes fungicidas no crescimento, esporulação e morfologia de conídios de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. Quanto a sensibilidade a cinco fungicidas (tiofanato metílico, piraclostrobina, mancozeb, clorotalonil, piraclostrobina + metconazol), 30 linhagens do patógeno foram avaliadas quanto ao diâmetro colonial (DC), índice de crescimento (IVCM) e taxa de esporulação. A influência de três temperaturas (17°C, 23°C e 33°C) em caracteres morfológicos e citológicas das linhagens foi avaliada por meio do DC, IVCM, esporulação, porcentagem de germinação dos conídios, porcentagem de formação de CATs (Tubos de anastomoses entre conídios) e porcentagem de formação de apressório. Foi observada uma ampla variabilidade para todas as características avaliadas. Houve diferença entre as linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. quanto a sensibilidade aos diferentes fungicidas. A temperatura influenciou todas as características avaliadas e, para a maioria das linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp., a temperatura de 23 °C foi a mais adequada. Portanto, para os testes *in vivo* em casa de vegetação, sugere-se avaliar temperaturas próximas a este valor, para a avaliação da sarna do feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Melhoramento Genético. Temperatura.

ABSTRACT

The *Colletotrichum* genus causes diseases in several hosts, presenting wide variability among and within the species. In common bean, the anthracnose causes many damages and its etiologic agent is the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. However, an emerging disease, scab, which has been associated with the genus *Colletotrichum* has been observed in the production fields, but the species is not known yet. Several factors may influence the development and establishment of the pathogen in the host. This study aimed to evaluate the influence of temperature and sensitivity of different fungicides on the growth, sporulation and morphology of conidia of *Colletotrichum* spp. and *Glomerella* spp.. Regarding the sensitivity to five fungicides (methyl thiophanate, pyraclostrobin, mancozeb, chlorothalonil, pyraclostrobin + metconazole), 30 lines were evaluated for colonial diameter (DC), growth index (IVCM) and sporulation rate. The influence of three temperatures (17 ° C, 23 ° C and 33 ° C) on morphological and cytological traits was evaluated by means of DC, IVCM, sporulation, percentage of conidia germination, percentage of CATs (conidia anastomosis tubes between) and percentage of appressory formation. A wide variability was observed for all evaluated traits. There were differences between the strains of *Colletotrichum* spp. and *Glomerella* spp. sensitivity to different fungicides. The temperature influenced all the traits evaluated and for most strains of *Colletotrichum* spp. and *Glomerella* spp. the temperature of 23°C was the most adequate. Therefore, for the in vivo tests in greenhouse it is suggested to evaluate temperatures close to this value for the evaluation of the common bean scab.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Genetic breeding. Temperature.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	A cultura do feijão no Brasil.....	11
2.2	Antracnose do feijoeiro	12
2.3	Sarna do feijoeiro.....	13
2.4	<i>Colletotrichum</i> spp. no feijoeiro	15
2.5	Controle Químico da antracnose.....	17
2.6	Efeito da temperatura	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local.....	21
3.2	Origem das linhagens	21
3.3	Análises de PCR de genes <i>Mating-type</i>	22
3.4	Sensibilidade <i>in vitro</i> de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp. a diferentes fungicidas	23
3.5	Efeito da temperatura no crescimento e esporulação de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp.	25
3.6	Caracterização citológica de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp.	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Análises de PCR genes <i>Mating-type</i>	27
4.2	Sensibilidade <i>in vitro</i> de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp. a diferentes fungicidas	28
4.3	Efeito da temperatura no crescimento e esporulação de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp.	33
4.4	Caracterização citológica de linhagens de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Glomerella</i> spp.	41
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICES	61

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* pertencente ao filo Ascomiceta, abrange um grande número de espécies capazes de causarem diferentes doenças em muitos hospedeiros. No feijoeiro comum, além da antracnose causada pelo fungo (*Colletotrichum lindemuthianum*), tem-se constatado a presença da sarna, doença também atribuída ao gênero *Colletotrichum*, porém, a espécie ainda não foi identificada.

Linhagens de feijoeiro ao serem inoculadas com *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp., oriundas de lesões de sarna, apresentaram sintomas típicos de antracnose nas folhas e caules (MOTA et al., 2016). No entanto, nas vagens, os sintomas foram similares à sarna, o que levanta a hipótese de se tratar de um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum* associados a essas doenças (DIAS et al., 2017).

Na literatura, a ocorrência da sarna no feijoeiro vem sendo associada a elevadas precipitações e a altas temperaturas (COSTA et al. 2001), já para a antracnose, é necessário temperaturas moderadas a baixas (17 °C a 25 °C), associadas a alta umidade relativa do ar (acima de 90%) (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007). A temperatura é um dos principais fatores climáticos que influenciam em todas as fases do desenvolvimento do hospedeiro e, também, no ciclo de vida do patógeno (AGRIOS, 2005). No entanto, no caso da sarna, por se tratar de uma nova doença, as variáveis climáticas que influenciam no desenvolvimento dela não estão bem estabelecidas (DIAS et al. 2017). Essas informações são importantes para os programas de melhoramento do feijoeiro visando a resistência às doenças, pois, para obter cultivares resistentes é necessário a avaliação da doença *in vivo* por meio dos sintomas. Portanto, conhecer o comportamento de diferentes isolados do patógeno *in vitro* em relação à temperatura *a priori* torna-se necessário para, posteriormente, realizar os testes *in vivo*, mais laboriosos e que demandam mais tempo.

O emprego de cultivares resistentes tem-se mostrado um dos métodos de controle mais eficiente e ecologicamente viável para maioria das doenças. Entretanto, para antracnose do feijoeiro a resistência genética é dificultada devido a variabilidade do patógeno (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006). Desta forma, uma alternativa a curto prazo para o controle da mesma seria a utilização de fungicidas, tanto nas sementes como na parte aérea da planta. Porém, sua larga utilização faz com que haja uma redução da eficiência dos produtos utilizados comercialmente, visto que é associada à seleção de isolados resistentes (SARTORATO, 2006). No controle da antracnose vários fungicidas são recomendados (AGROFIT, 2018), porém,

nenhum produto vem sendo relatado na literatura para o controle da sarna do feijoeiro. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e da sensibilidade de diferentes fungicidas no crescimento, esporulação e morfologia de conídios de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão no Brasil

O feijão comum pertence à família Fabaceae (ou Fabáceas), subfamília Faboideae, gênero *Phaseolus* L. e espécie *Phaseolus vulgaris* L. É uma espécie autógama, apresentando baixa taxa de alogamia, sendo esta, inferior a 1,4% (VIEIRA et al., 2005; BORÉM; CARNEIRO, 2015). Cerca de 61% da produção mundial deste produto é proveniente de apenas seis países, sendo eles o Brasil, China, EUA, Índia, Myanmar e México. Na produção nacional de feijão da safra 2018/2019 deverá ocorrer redução de 7,9% a 4% na área em relação à safra passada, refletindo numa produção média de 1,1 milhões de toneladas. Deste total, 643,8mil toneladas são de feijão comum cores, 294,5 mil toneladas são de feijão comum preto e 180,6 mil toneladas são de feijão-caupi. Essa leguminosa é cultivada em todo o território brasileiro, tendo como principais produtores os estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e São Paulo (CONAB, 2018).

O consumo nacional do produto, por pessoa, em média, é de 19 quilos de feijão por ano e depende da disponibilidade interna e dos preços no mercado. O feijão, por ser um alimento de baixo custo, desempenha um papel importante na dieta brasileira pois os grãos contêm alto valor nutricional como fonte de proteína vegetal, vitaminas do complexo B e sais minerais. Além disso, pode ser cultivado em diferentes condições de clima e solo (CONAB, 2018).

No Brasil, o feijoeiro é cultivado em três diferentes safras: i) a primeira, conhecida como safra das águas, e é assim chamada porque o plantio e a colheita ocorrem com alto índice de chuvas, o que favorece a ocorrência de doenças fúngicas, como por exemplo, a antracnose. O plantio dessa safra na região Centro-Sul vai de agosto a dezembro, e no Nordeste, de maio a junho; ii) a segunda safra, realizada no período com o menor índice de chuva no país, é chamada de safra da seca, e a semeadura é realizada de dezembro a março; iii) já a terceira, a safra irrigada, ou de outono-inverno, é assim conhecida por se referir à colheita do feijão irrigado, a qual tem a concentração do plantio na região Centro-Sul no período de abril a junho. O feijão pode ser colhido em média após 90 dias depois da semeadura (MAPA, 2016). Considerando a primeira safra 2018/2019, estima-se que a área semeada poderá variar de 51 e 55 mil hectares, podendo ter um acréscimo de 16,2% e 25,3% em relação à safra passada (CONAB, 2018).

Vários fatores limitam a produção do feijoeiro, dentre eles destacam-se as doenças, pois estas reduzem a produtividade da cultura e depreciam a qualidade do produto (SARTORATO

et al., 2000). Dessa forma, a obtenção de cultivares resistentes é uma questão relevante tratada pelos melhoristas, uma vez que é a forma mais eficiente e econômica de controle de diversas enfermidades que acometem a cultura. No entanto, a obtenção de cultivares com resistência durável é dificultada pela variabilidade do patógeno, os quais frequentemente conseguem quebrar essa resistência (BORÉM; MIRANDA, 2005).

2.2 Antracnose do feijoeiro

A antracnose causada pelo fungo *C. lindemuthianum* é uma das principais doenças do feijoeiro, pois é capaz de infectar a cultura nas três épocas de cultivo, se destacando nas regiões subtropicais e temperadas, especialmente em localidades com temperaturas moderadas a frias, entre 13 a 27°C, e com alta umidade relativa. No Brasil, esta doença prevalece nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KIMATI et al., 1997).

Os sintomas da doença aparecem em todos os estágios de crescimento da planta, e geralmente são observados no sexto dia da infecção nas folhas, caules, ramos vagens e sementes. As sementes infectadas são ligeiramente descoloridas, podendo apresentar cancrs, cuja coloração varia de amarela a café-escuro ou negro. Já nos pecíolos e caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura. Nas folhas as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escuras a negras. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por um bordo de coloração laranja-avermelhada (SARTORATO, 1988).

O patógeno sobrevive em restos culturais na forma de esporos, sendo as sementes contaminadas consideradas a principal via de sobrevivência e disseminação (VECHIATO et al., 2001). Após a germinação destas sementes, observam-se lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo das plantas (BARCELOS, 2010). Além da disseminação via sementes infectadas, a água da chuva ou da irrigação torna-se um meio de disseminação a curta distância.

A ampla distribuição deste patógeno no Brasil é facilitada pelo livre comércio de grãos entre os estados e pela reutilização dos grãos como sementes, uma vez que o feijão é uma espécie autógama, para futuros plantios em uma mesma área, acarretando em um aumento no potencial do inóculo do patógeno de uma safra para outra (THOMAZELLA et al., 2000).

As perdas causadas por este patógeno podem chegar a 100% quando são utilizadas sementes contaminadas para plantio e quando ocorrem períodos prolongados de condições

favoráveis ao seu desenvolvimento, como alta umidade (acima de 90%) e temperaturas amenas (17 °C a 25 °C) (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SINGH et al., 1991; TRUTMANN; GRAF, 1993). A antracnose ocasiona mancha nos grãos, o que deprecia a qualidade do produto e inviabiliza o seu consumo (DALLA PRIA et al., 2003).

Entre os métodos de controle empregados, destacam-se o controle químico e o uso de cultivares resistentes a um ou mais patógenos. A resistência varietal é um dos métodos mais eficientes no controle da doença, pois além de não onerar o custo de produção, evita o controle químico. No entanto, a resistência genética é dificultada devido à grande variabilidade patogênica de *Colletotrichum* (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006).

A fase sexual deste patógeno é conhecida como *Glomerella cingulata* f sp. *phaseoli*. Por meio de análises morfológicas, citológicas, moleculares e patogênicas, Barcelos et al., (2014), separaram linhagens de *Glomerella cingulata* sp., obtidas de lesões de antracnose do feijoeiro, em dois grupos distintos, denominadas *Glomerella cingulata* sp grupos I e II. As linhagens do grupo I não causaram sintomas no feijoeiro comum e amplificaram para o par de *primers* específico de *Glomerella cingulata* spp. (HMGglo) (BARCELOS et al., 2011) e não amplificou para o par de *primers* específico para *C. lindemuthianum* (GARCIA-SERRANO et al., 2008). Já as linhagens do grupo II causaram sintomas leves aos 10 dias após a inoculação e não amplificaram para nenhum dos pares de *primers*. Essa grande variabilidade de linhagens oriundas de lesões de antracnose também foram investigadas por Mota et al. (2016) e Dias et al. (2017).

2.3 Sarna do feijoeiro

A sarna do feijoeiro comum, é encontrada principalmente nos estados de Goiás e Minas Gerais. Os sintomas iniciam-se no estágio de plântula, formando manchas vermelhas ou pretas, com bordas avermelhadas, localizadas nos talos e internódios, o que compromete o enchimento de grãos. As folhas e as vagens, por sua vez, apresentam pequenas lesões avermelhadas lembrando uma sarna (COSTA et al., 2001). Por se tratar de uma doença emergente, as formas de controle ainda não estão bem estabelecidas. Entretanto, como o fungo pode ser transmitido por sementes, o ideal é adotar as de boa qualidade fitossanitária (SARTORATO; RAVA, 2002).

Análises morfológicas e moleculares indicam que o agente etiológico do patógeno seria o fungo *Colletotrichum truncatum*. Testes de patogenicidade na cultura do feijoeiro foram realizados na Embrapa utilizando isolados de *C. truncatum* e *C. graminicola*, provenientes do

sorgo e do milho. Constatou-se que *C. truncatum* é patogênico às três culturas (sorgo, milho, feijão), enquanto os isolados de *C. graminicola* não causaram sintomas no feijoeiro (COSTA et al., 2001).

C. truncatum também infecta outras espécies, como soja, lentilha e feijão-fava, no entanto, nestes casos, a doença causada é denominada antracnose. Já no feijão-caupi a doença é chamada mancha-café. Em soja, a doença caracteriza-se por apresentar, no estágio de plântula, a chamada infecção latente, no qual o patógeno infecta a planta, sendo os sintomas da doença só observados em estádios mais avançados. Entretanto, o fungo infecta em qualquer estágio de desenvolvimento, podendo causar a morte das plântulas, necrose dos pecíolos, manchas nas folhas, queda total das vagens ou deterioração total das sementes em colheita retardada. O inóculo proveniente de restos de cultura e sementes infectadas pode causar necrose nos cotilédones, que pode se estender para o hipocótilo, causando o *damping-off* de pré e pós-emergência. As vagens apresentam manchas deprimidas, de coloração castanho-escuro e nos estádios R3 e R4 adquirem coloração castanha escura à negra e ficam retorcidas (ALMEIDA et al., 2005). A doença é favorecida por elevadas precipitações e altas temperaturas, principalmente nos estádios finais do ciclo da cultura (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007).

Figura 1 - Diferenciação dos sintomas de antracnose (A e B) e sarna (C e D) em vagens do feijoeiro comum.



Fonte: Da autora (2019).

Mota et al. (2016) estudaram linhagens isoladas de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro, pertencentes a três diferentes grupos, *Glomerella cingulata* spp. grupo I e II previamente identificados por Barcelos et al. (2014) e *Colletotrichum* spp. As linhagens do grupo I não apresentaram sintomas, já as linhagens do grupo II e de *Colletotrichum* spp.

apresentaram lesões características da antracnose, sendo observadas a partir do décimo dia, após a inoculação, em folhas e pecíolos. No entanto, a melhor visualização foi aos 17 dias. Sendo os sintomas característicos de sarna só observados no fim do ciclo da cultura nas vagens.

Dias et al. (2017), avaliaram linhagens oriundas de lesões de sarna e demonstraram que tanto as linhagens que amplificaram para o par de *primers* específicos para *C. lindemuthianum*, quanto para o par de *primers* específicos para *Glomerella* spp. apresentaram sintomas típicos de antracnose quando avaliados na fase de plântula e sintomas típicos de sarna quando avaliados em vagens do feijoeiro. Porém, algumas linhagens apresentaram ambos os sintomas nas vagens, ou seja, ocorre variabilidade nestas lesões.

A ocorrência de sintomas típicos de sarna causados por linhagens de *C. lindemuthianum*, observados por Dias et al. (2017), indica que estudos de avaliação dos sintomas da antracnose deveriam ser conduzidos no fim do ciclo da cultura. É necessário elucidar se a antracnose é expressa por meio de diferentes sintomas devido a linhagem do patógeno e/ou hospedeiro, ou a sarna é realmente outra doença do feijoeiro e, além disso, verificar a influência da temperatura na expressão dessas doenças. Essas informações são importantes para os programas de melhoramento visando obter cultivares resistentes de feijoeiro.

2.4 *Colletotrichum* spp. no feijoeiro

O gênero *Colletotrichum* infecta diversas espécies de plantas, causando em sua maioria, a doença conhecida como antracnose. Segundo Dean et al. (2012), este grupo foi classificado como o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos de plantas, sendo, portanto, sempre necessários estudos a respeito do gênero.

Para a infecção do tecido do hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum* utilizam estratégias que variam de hemibiotróficos intracelulares a necrotróficos subcuticulares, desenvolvendo estruturas especializadas para penetrar no hospedeiro, como por exemplo, os apressórios. Com o processo de colonização do patógeno nos tecidos da planta afetada, surgem os sintomas de antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos (MENEZES, 2006).

Caracteres morfológicos e culturais são tradicionalmente utilizados para diferenciar espécies de fungos, porém, no caso do *Colletotrichum*, esta identificação é dificultada em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres em função do ambiente (ANDRADE et al., 2007). No feijoeiro há evidências da ocorrência de diferentes espécies do gênero a partir de isolamentos de lesões típicas de antracnose, sendo observadas

linhagens de *Glomerella*, a qual é a forma sexual ou teleomórfica (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017). Estes estudos têm caracterizado essas e outras linhagens do gênero *Colletotrichum* spp. isoladas de lesões de sarna do feijoeiro, por meio da morfologia da colônia, taxa de esporulação, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro colonial (DC), teste de patogenicidade e marcadores moleculares. Dias et al. (2017), mostraram que linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. isoladas a partir de lesões de sarna apresentaram comportamento divergente quando utilizados pares de *primers* específicos para *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp.. Neste estudo, 66% das linhagens avaliadas amplificaram para o primer HMG de *C. lindemuthianum*, 19% para o primer HGM de *Glomerella* spp. e 15% não amplificaram para nenhum dos *primers*. Já as linhagens obtidas a partir de lesões de antracnose não amplificaram para nenhum dos *primers* utilizados.

Para características como o IVCM e o DC, resultados semelhantes foram obtidos por Dias (2017) e Mota et al. (2016). As linhagens que amplificaram para o gênero *C. lindemuthianum* apresentaram crescimento mais lento quando comparadas com aquelas amplificadas para *Glomerella* spp. Resultado similar foi observado para a taxa de esporulação dessas espécies, onde as linhagens que amplificaram para o marcador específico de *C. lindemuthianum* apresentaram baixa capacidade de esporulação quando comparados às demais linhagens (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS, 2017).

Na análise da severidade da doença por meio de escala de notas, Dias et al. (2017) verificaram que as linhagens de *C. lindemuthianum*, foram mais virulentas quando comparadas com as linhagens de *Glomerella* spp. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Mota et al. (2016). No entanto, as linhagens amplificadas para o primer HMGglo, nos estudos de Barcelos et al. (2014) e Mota et al. (2016) não foram patogênicas, contrastando com os resultados obtidos por Dias et al. (2017), onde as linhagens que amplificaram para *Glomerella* spp. apresentaram notas elevadas.

Segundo Mota et al. (2016), as linhagens que não amplificaram para ambos os *primers* HMG pertenciam a *Glomerella* spp. grupo II e causavam sintomas brandos aos 10 dias nas folhas e caules, sendo observados sintomas típicos da sarna na vagem do feijoeiro. Já as linhagens avaliadas por Dias et al. (2017) não amplificadas para nenhum dos pares de *primers* HMG apresentaram médias elevadas. Estes resultados corroboram com a hipótese de um complexo de espécies de *Colletotrichum* infectam o feijoeiro (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016) e tem causado sintomas de ambas as doenças (MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017).

Devido à alta variabilidade das espécies de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características, a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, inter e intraespecíficas, podem ser feitas por outros métodos não morfológicos. Tais métodos ampliam o conjunto de caracteres usados para identificar essas espécies, e deve promover uma forma de estimar a diversidade genética e entender melhor a estrutura da população (MENEZES, 2006).

2.5 Controle Químico da antracnose

Uma alternativa para controlar a antracnose do feijoeiro é a utilização de fungicidas, tanto nas sementes quanto na parte aérea da planta. Porém, sua larga utilização faz com que haja uma diminuição da eficiência dos produtos utilizados comercialmente, visto que é associado à seleção de isolados resistentes (SARTORATO, 2006).

Existem várias opções de produtos químicos controlando a antracnose no Brasil. Dos 149 fungicidas registrados, ou seja, produtos comerciais, cita-se os grupos dos benzimidazóis, dos ditiocarbamatos, dos inorgânicos (cobre e estanho), das estrobilurinas e dos triazóis e algumas misturas desses grupos (AGROFIT, 2018). Vários são os mecanismos de ação do fungicidas estrobilurinas, que atuam como inibidores da respiração, já o fungicida tiofanato metílico age na inibição da mitose e divisão celular, sendo que ambos os fungicidas são sistêmicos. Já os fungicidas de contato mancozeb e clorotalonil são fungicidas protetores que desencadeiam interferência generalizada das funções celulares com atividade multi-sítio (RODRIGUES, 2006).

Entretanto, linhagens resistentes de *C. lindemuthianum*, podem surgir na população devido à grande diversidade do fungo, sua intensa capacidade de multiplicação, seus mecanismos para ampliar a variabilidade e as aplicações sucessivas de um mesmo ingrediente ativo ou do mesmo grupo químico de fungicida. Essas linhagens resistentes podem predominar na população até o produto perder sua eficiência. Portanto, torna-se necessário monitorar a variabilidade patogênica e a sensibilidade de linhagens de *C. lindemuthianum* à aplicação de diferentes princípios ativos (GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência dos patógenos aos diversos fungicidas tem sido denominada por alguns pesquisadores como a perda de sensibilidade dos fungos aos produtos, resultando em uma diminuição da eficiência destes sob condições de campo (GHINI, KIMATI, 2000). Esse

fenômeno se deve a um aumento da frequência de uso de um mesmo fungicida ou fungicidas de um mesmo grupo químico, agravado ainda pelo fato de se tratar de patógenos que produzem uma grande quantidade de esporos e um curto período entre gerações. Existe uma boa compreensão dos mecanismos mais importantes de resistência aos fungicidas benzimidazóis, difenilamidas, carboxanilidas e fosforotiolatos (BRENT, 1995).

De acordo com Kimati (1987), a seletividade, que possibilita um fungicida atuar sistemicamente, aumentando sua eficiência, é também a causa principal da sua vulnerabilidade. O principal motivo para o elevado risco de resistência destes fungicidas se dá devido à toxicidade para um único sítio de ação do fungo, sendo que, uma única alteração neste, pode resultar em resistência ao fungicida (EDGINGTON et al., 1980; BRENT, 1995). Ao testarem três fungicidas pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, o patógeno produziu estruturas semelhantes a escleródios, ao ser cultivado em meio de cultura contendo benomyl, formados em resposta ao estresse causado pelo fungicida, segundo Tu e Jarvis (1979 a; b).

A ineficácia do controle químico da antracnose com fungicidas benzimidazóis em isolados de *C. lindemuthianum* coletados no estado de São Paulo foi verificada por Maringoni e Barros (2002). Pinto et al. (2012) também observaram a ineficiência do controle de linhagens de *C. lindemuthianum* quando avaliados *in vitro*, onde 90,5% das linhagens avaliadas apresentaram-se sensíveis ou de sensibilidade intermediária ao fungicida tiofanato metílico, comprovando a ineficiência do produto. Este grupo vem sendo ineficiente para muitas espécies de *Colletotrichm*, segundo Fischer et al. (2012), linhagens de *C. gloeosporioides* isolado de goiaba também foram resistentes ao mesmo. Já quando a eficiência de fungicidas do grupo das estrubilurinas e dos triazóis no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro foram testadas, observou-se que, para a antracnose, trifloxystrobin + propiconazol na maior dose (187,5 g/ha) e propiconazol + trifenil hidróxido de estanho destacaram-se no controle total da doença. Os demais produtos testados foram igualmente eficientes, apresentando baixos níveis de infecção (OLIVEIRA, 2003).

Em estudo recente, Souza Filho et al. (2015) avaliaram a sensibilidade de isolados de *C. lindemuthianum* a diferentes fungicidas *in vitro* e *in vivo* e observaram que os produtos piraclostrobina e a mistura piraclostrobina + metiram foram os mais eficazes na inibição do crescimento da colônia e germinação de conídios *in vitro*. Já os tratamentos contendo clorotalonil, mancozeb e misturas mancozeb + oxicleto de cobre e clorotalonil + tiofanato metílico foram eficazes na redução da severidade da antracnose *in vivo*. Porém, a ineficácia dos benzimidazóis e óxido de cobre foram comprovadas *in vivo* e *in vitro*.

A redução da eficiência dos produtos utilizados comercialmente no controle da antracnose é um fator a ser considerado, uma vez que esse fato é associado ao aparecimento de microrganismos com níveis elevados de tolerância a esses produtos (TAVARES et al, 2005).

2.6 Efeito da temperatura

Fatores climáticos, tais como a temperatura, exercem importância crucial, tanto na infecção quanto na colonização do patógeno, constituindo-se o fator climático mais correlacionado com respostas biológicas (AGRIOS, 2005). Sabe-se que a ocorrência de doenças está diretamente relacionada a três fatores: hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável, que constituem o triângulo da doença. Qualquer modificação em um desses fatores pode afetar a intensidade ou até mesmo sua taxa de progresso.

Em alguns estudos sobre *Colletotrichum* spp. a temperatura ótima para a colonização dos tecidos e início dos sintomas, é citada geralmente entre 22 °C e 28 °C (DIAS et al. 2005, POLTRONIERI et al. 2013). Segundo Araujo et al. (2016) os sintomas da antracnose variam com a estação, indicando que as condições ambientais influenciam a severidade da doença em plantas ornamentais de pimenta. McIntosh et al. (1995) mostraram uma forte influência da interação Genótipos x Ambientes (principalmente a temperatura) na expressão fenotípica observada, ou seja, ocorre uma expressão fenotípica diferencial em função do ambiente. Sendo assim, estudos sobre a influência de fatores ambientais, é de suma importância para um melhor conhecimento do patógeno e para a obtenção de cultivares resistentes (MAIA et al., 2011).

A associação da temperatura com umidade é importante para o progresso de epidemias de patógenos da parte aérea, contudo, a temperatura é considerada, na maioria das vezes, o fator com maior destaque no surgimento de epidemias. O período de incubação e o período latente dependem da temperatura (VALE et al., 2004). A temperatura interfere tanto nos processos iniciais de infecção, quanto nos processos de colonização e reprodução do patógeno (AGRIOS, 2005; VALE et al. 2004).

O efeito da temperatura no progresso de uma doença em particular, após a infecção, depende da combinação específica entre o patógeno e o hospedeiro. A doença tem uma taxa de progresso maior, ou seja, necessita de menor tempo para completar um ciclo de infecção, usualmente quando a temperatura é ótima para o desenvolvimento do patógeno. Quando a

temperatura está acima ou abaixo do ótimo, o desenvolvimento do hospedeiro é prejudicado (AGRIOS, 2005).

A temperatura exerce papel fundamental na produção dos diferentes tipos de propágulos dos fitopatógenos, além de influenciar no seu crescimento, produção de estruturas de resistência e a germinação das mesmas. Em pesquisas realizadas durante o processo de infecção, a temperatura atuou aumentando ou diminuindo a taxa de germinação dos esporos (MAIA et al., 2011; POLTRONIERI et al., 2013). Segundo Kurian et al. (2018), estudando o efeito da temperatura em *Fusarium oxysporum*, a germinação dos esporos foi inibida quando avaliados na temperatura de 35 °C. Já na produção de CATs, não foram observadas diferenças significativas para as temperaturas testadas (22, 25 e 35 °C). Após a infecção, a temperatura pode determinar a rapidez e a extensão da infecção, sendo a mais favorável ao desenvolvimento de patógeno, aquela com maior número de ciclos da doença (MAY-DE-MIO et al., 2002; VALE et al., 2004).

Uma vez que a duração de um ciclo de infecção determina o número de ciclos da mesma, fica evidente que o efeito da temperatura sobre a prevalência de uma doença numa dada estação é expressivo. Além do efeito direto sobre o patógeno, a temperatura também pode afetar a estrutura genética da célula do hospedeiro, favorecendo ou inibindo a expressão de certos genes envolvidos na resistência ou suscetibilidade a doenças (AGRIOS, 2005). Além disso, várias características sofrem influência da temperatura, como o crescimento micelial, esporulação, germinação de conídios e a coloração das colônias, o que viabiliza a utilização dos mesmos como parâmetro para diferenciação de espécies (MAIA et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e em casa de vegetação, localizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG.

3.2 Origem das linhagens

Foram utilizadas 30 linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. obtidas de lesões típicas de antracnose e sarna do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) pertencentes à Micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Essas linhagens foram submetidas à purificação genética para obter culturas monospóricas de conídios e ascósporos e mantidas em meio de cultura M3 a 22 °C, no escuro. Essas linhagens foram caracterizadas por Dias (2017) quanto a cultivar de origem, lesão, tipo de esporos que as originaram e ao tipo de colônia, de acordo com metodologia proposta por Chilton e Wheeler (1949). Além disso, a autora caracterizou essas linhagens quanto a severidade da doença e sintomas nas vagens (TABELA 1).

Tabela 1- Classificação morfológica das linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. quanto ao tipo de colônia, lesão isolada, tipo de esporo que originaram as linhagens e sintomas causados nas vagens de feijoeiro.

ID ¹	Linhagem	Tipo da colônia	Lesão ²	Sintoma na vagem	ID ¹	Linhagem	Tipo da colônia	Lesão ²	Sintoma na vagem
1	2-1 A1	Conidial B	S-MO	-	16	19-1 D	Conidial A	S-MO	-
2	9 A	Minus	S-MA	-	17	19-2 A	Conidial B	S-MO	Ant/Sarna
3	12-1 D1	Conidial A	S-MO	-	18	19-2 B	Conidial B	S-MO	Sarna
4	13-1 C	Minus	S-MA	Sarna	19	19-2 C	Conidial B	S-MO	Antracnose
5	13-1 A1	Plus	S-MA	Antracnose	20	19-3 A	Conidial B	S-MO	Sarna
6	13-2 A	Plus	S-MA	Sarna	21	19-3 B	Conidial A	S-MO	Ant/Sarna
7	17-3 A	Conidial A	S-MO	-	22	19-3 C	Conidial A	S-MO	Antracnose
8	17-3C	Conidial A	S-MO	Antracnose	23	19-4 A	Conidial A	S-MO	Sarna
9	17-3 D	Conidial A	S-MO	Ant/Sarna	24	19-4 B	Conidial B	S-MO	Sarna
10	18-1 A	Conidial B	A-MO	Sarna	25	38-2 A	Minus	A-MA	-
11	19 A	Conidial A	S-MO	Sarna	26	38-2 B	Minus	A-MA	-
12	19 B	Conidial A	S-MO	Sarna	27	38-3 A	Minus	A-MA	Sarna
13	19-1 A	Conidial A	S-MO	Sarna	28	40-2 A	Conidial A	S-MO	Sarna
14	19-1 B	Conidial A	S-MO	Ant/Sarna	29	51-2 A	Minus	S-MA	Sarna
15	19-1 C	Conidial A	S-MO	Ant/Sarna	30	52	Conidial A	S-MO	-

¹ Os números de 1 a 30 representam a identificação das linhagens. ² S-MO- sarna e monospórica, S-MA- sarna e monoascospóricas, A-MO- antracnose e monospórica e A-MA- antracnose e monoascospóricas.

Fonte: Dias et al. (2017).

3.3 Análises de PCR de genes *Mating-type*

Para a obtenção da massa micelial, pequenos discos de meio de cultura, contendo micélio do fungo, foram transferidos para *erlenmeyers* contendo aproximadamente 125 mL de meio de cultura líquido M3. Os frascos foram mantidos a 22°C em incubadora com agitação constante de 110 rpm/min por cerca de 2 a 3 dias. O micélio teve sua umidade reduzida utilizando Miracloth e foi congelado. O DNA foi extraído conforme as instruções do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification (Promega).

Nas reações de PCR foram utilizados um par de *primers* específico para *C. lindemuthianum*, descrito na literatura por García-Serrano et al. (2008), que amplifica a região HMG do gene *mating-type* MAT1-2-1, sendo eles HMGCLF e HMGCLR. Um par de *primers* específicos para os isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, HMGGLOF e HMGGLOR, os quais foram desenvolvidos por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), também foram utilizados na caracterização dessa população. Assim como os *primers* descritos por García Serrano et al. (2008), os *primers* específicos para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* amplificam a região HMG do gene *mating-type* MAT1-2-1. Como algumas linhagens são provenientes de lesões da sarna do feijoeiro, foram utilizados também um par de *primers* descritos por Menat et al. (2012), CT21HMG, que amplifica para *Glomerella truncata*. Todos os géis foram tratados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta (Fotodyne Ultraviolet Trans-illuminator) e fotografados com câmera digital Kodak EDA-290.

3.4 Sensibilidade *in vitro* de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. a diferentes fungicidas

A sensibilidade a fungicidas foi avaliada por meio do crescimento e da esporulação das linhagens em bioensaios *in vitro*. Os fungicidas foram incorporados em meio de cultura M₃S fundente, na mesma proporção do volume de calda aplicado por ha recomendados na bula do fabricante e vertidos para placas de Petri. Após a solidificação do meio, discos de micélio de 6 mm de diâmetros foram adicionados à placa de Petri. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 30 x 6, sendo 30 linhagens, 5 fungicidas e o controle (sem fungicida), totalizando 180 tratamentos com três repetições. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri. Os seguintes fungicidas foram utilizados em concentrações comerciais: Piraclostrobina, Mancozeb, Clorotalonil, Piraclostrobina + Metconazol e Tiofanato Metílico. Esses fungicidas são recomendados para o controle da antracnose do feijoeiro (TABELA 2).

Tabela 2 - Nome comercial, ingrediente ativo, concentração do ingrediente ativo, dose comercial do produto, concentração PPM e o volume de calda em L/ha dos fungicidas utilizados.

Produto Comercial	Ingrediente Ativo	Concentração ingrediente ativo	Grupo Químico	Dose comercial	Concentração ppm/mg/kg	Volume (L/ha)
Comet	Piraclostrobina	250 g/L	Estrobilurina	0,3 L/ha	250	300
Manzate750	Mancozeb	750 g/kg	Ditiocarbamato	750 g/ha	7500	300
Bravonil 500	Clorotalonil	500 g/L	Isofitalonitrila	3 L/ha	5000	300
Cercobin 700	Tiofanato Metílico	700 g/kg	Benzimidazol	70 g/ha	70	300
Opera Ultra	Piraclostrobina + Metconazol	210 g/L	Estrobilurina Triazol	0,5 L/ha	525	200

Fonte: Da autora (2019).

O crescimento das linhagens foi avaliado por meio do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e do diâmetro colonial (DC).

O IVCM foi avaliado por meio da leitura das médias, em milímetros, entre os dois diâmetros ortogonais da colônia, em intervalos de 24 horas, durante 9 dias e estimado de acordo com a expressão proposta por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\Sigma(Dc - Dp)}{N} \quad (1)$$

Em que:

Dc é a média atual do diâmetro colonial;

Dp é a média do dia anterior do diâmetro colonial;

N é o número de dias após a inoculação.

As porcentagens médias de inibição de cada Fungicida + Linhagem crescida no meio M₃S foram comparadas com o crescimento do controle. As linhagens resistentes, intermediárias ou sensíveis, foram definidas como aquelas que exibiram nível de inibição menor que 10%, entre 10% a 60% e maior que 60%, respectivamente, quando comparadas com os controles (PINTO et al., 2012). Já o diâmetro colonial foi determinado medindo-se os diâmetros ortogonais das colônias em milímetros após 10 dias de incubação.

Para avaliar a capacidade de esporulação das linhagens foi obtida uma suspensão de esporos de cada linhagem após 15 dias de incubação. Foram adicionados 6 mL de água estéril nas placas e estas foram raspadas e, posteriormente, filtradas usando Miracloth estéril. Foram

adicionados 10 µL da suspensão na Câmara de Neubauer e contados o número de esporos, obtendo-se assim, a concentração.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância. As médias dos caracteres avaliados foram comparadas pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$) no programa estatístico R Development Core Team (2015). Para a esporulação foi realizada uma análise de variância apenas entre o fungicida Cercobin e o Controle, uma vez que os demais fungicidas apresentaram nível de controle de quase 100%. Para melhor atender os pressupostos da análise de variância, os dados foram transformados para $\log(x+1)$ e, posteriormente, as médias para o fungicida Cercobin foram comparadas por Scott Knott ($P \leq 0,05$) no programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

3.5 Efeito da temperatura no crescimento e esporulação de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp.

Foi conduzido um experimento em DIC com três repetições para cada uma das três temperaturas avaliadas (17 °C, 23 °C e 33 °C). Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri contendo meio de cultura M₃S, onde um disco de micélio de 6 mm de diâmetro de cada linhagem foi adicionado. Posteriormente, as placas foram armazenadas a 23 °C, 17 °C e 33 °C em BOD no escuro. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro colonial (DC) e a taxa de esporulação foram avaliados conforme descrito no item 3.3. Foram realizadas as análises individuais para cada temperatura e, posteriormente, a conjunta, considerando as 3 temperaturas. As médias dos caracteres avaliados foram comparadas por Scott Knott ($p \leq 0,05$) no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

O crescimento e a esporulação das 30 linhagens também foram avaliados alternando-se a temperatura e o fotoperíodo em BOD. O experimento foi conduzido em DIC com três repetições. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri. Discos de micélio de 6 mm de diâmetro de cada linhagem foram depositados no centro da placa contendo meio M₃S em BOD, com fotoperíodo e temperatura controlados: 18 horas na luz a 32 °C e 6 horas no escuro a 23 °C. Foram avaliados o IVCM, DC e esporulação, conforme descrito no item 3.3. Todos os dados foram submetidos à análise de variância. As médias dos caracteres avaliados foram comparadas pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$) no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

3.6 Caracterização citológica de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp.

A caracterização citológica foi realizada por meio da avaliação da dimensão dos conídios, porcentagem de germinação e formação de tubos de anastomoses entre conídios (CATs) e porcentagem de formação de apressórios das 30 linhagens avaliadas.

Placas de Petri de cada linhagem contendo meio M3S foram incubadas em BOD por 15 dias a 23°C no escuro. Posteriormente, foram adicionados 6 mL de água estéril nas placas e estas foram raspadas e a suspensão de esporos foi filtrada usando Miracloth estéril. Foram adicionados 10 µL da suspensão em Câmara de ‘Neubauer’ para contar os esporos e a concentração foi ajustada para $1,2 \times 10^6$ conídios/mL. A partir desta, 200 µL das suspensões de esporos foram gotejados em uma célula em lâmina de cultivo de oito células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubadas a 17 °C, 23 °C e 33 °C no escuro por 24 horas. Amostras foram examinadas usando um microscópio invertido Zeiss Vert.A1 (Zeiss Axio Observer Z1).

Para as medições citológicas foram analisados 30 conídios não germinados de cada linhagem em DIC, com duas repetições, incubadas a 23 °C. A largura e o comprimento dos conídios (µm) foram obtidos utilizando-se o software Zeiss Axiovision com aumento de 63X.

Na avaliação da porcentagem de germinação de conídios, porcentagem de formação de CATs e porcentagem de formação de apressórios, um experimento em DIC foi conduzido em esquema de parcela subdividida no tempo com duas repetições. Foram utilizadas suspensões de conídios ajustadas para $1,2 \times 10^6$ conídios/mL de cada linhagem. Uma alíquota de 200 µL foi colocada em câmaras de cultivo conforme descrito anteriormente. Essas foram incubadas a 17 °C, 23 °C e 33 °C, no escuro. Após 24 e 48 horas foram avaliados 100 conídios por repetição por meio de microscopia de luz, sendo considerados germinados os conídios com tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que o menor diâmetro do conídio. A formação de CATs foi quantificada como a porcentagem de conídios envolvidos em fusões (ISHIKAWA et al., 2010b). Para esta análise foram realizadas duas repetições, sendo avaliados 100 conídios por repetição.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância. As médias dos caracteres avaliados foram comparadas pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$) no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 Análises de PCR genes Mating-type

Três pares de *primers* específicos foram utilizados para separar as espécies. Das 30 linhagens avaliadas, 18 amplificaram para o par de *primers* da região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*, que caracteriza linhagens de *C. lindemuthianum* descritos por García-Serrano et al. (2008). Vale ressaltar, que essas linhagens foram isoladas de lesões de sarna. Para os *primers* específicos da região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1* desenvolvida por Barcelos, Souza e Vaillancourt (2011), seis linhagens oriundas de lesões de sarna amplificaram, caracterizando linhagens de *Glomerella* spp. Já para o par de *primer* CT21HMG específico para *G. truncata*, 10 linhagens amplificaram, sendo três isoladas de lesões de antracnose e sete de sarna (TABELA 3). As linhagens 13-1 C, 13-1 A1, 40-2 A e 51-2 A amplificaram tanto para o par de *primers* para *Glomerella* spp quanto para *G. truncata*.

Tabela 3 - Análise molecular para os *primers* específicos para região HMG do gene *mating-type MAT1-2-1*, que caracteriza linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. e *G. truncata*.

Linhagem	CT21HMG	HMGCL	HMGGL	Linhagem	CT21HMG	HMGCL	HMGGL
2-1 A1	-	+	-	19-1 D	-	+	-
9 A	+	-	-	19-2 A	-	+	-
12-1 D1	-	+	-	19-2 B	-	+	-
13-1 C	+	-	+	19-2 C	-	+	-
13-1 A1	+	-	+	19-3 A	-	+	-
13-2 A	-	-	+	19-3 B	-	+	-
17-3 A	-	+	-	19-3 C	-	+	-
17-3C	-	+	-	19-4 A	-	+	-
17-3 D	-	+	-	19-4 B	-	+	-
18-1 A	-	-	+	38-2 A	+	-	-
19 A	+	-	-	38-2 B	+	-	-
19 B	+	-	-	38-3 A	+	-	-
19-1 A	-	+	-	40-2 A	+	-	+
19-1 B	-	+	-	51-2 A	+	-	+
19-1 C	-	+	-	52	-	+	-

“+” linhagens que amplificaram para o par de *primers* utilizado

Fonte: Da autora (2019).

4.2 Sensibilidade *in vitro* de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. a diferentes fungicidas

Foi observada ampla variabilidade entre as linhagens para todas as características avaliadas, assim como para o efeito dos fungicidas e da interação Linhagem x Fungicida. Para o IVCm e para o DC todas as fontes de variação foram significativas ($P \leq 0,05$) (APÊNDICE A). A significância da interação Linhagens x Fungicidas indica que a sensibilidade das linhagens não foi coincidente nos fungicidas testados.

O diâmetro colonial das linhagens no tratamento controle (sem fungicida) variou de 30,83 a 68,33 mm, sendo formados quatro grupos estatisticamente distintos pelo teste Scott-Knott (APÊNDICE B). O diâmetro colonial das linhagens variou de 8 a 69 mm quando foi

utilizado o fungicida Tiofanato Metílico. Neste caso, foram formados oito grupos estatisticamente distintos, sendo o fungicida que menos inibiu o crescimento das linhagens. Para os demais fungicidas utilizados, a maioria das linhagens apresentaram diâmetro médio próximo de 6,0mm, indicando o bom desempenho da maioria dos fungicidas no controle do crescimento micelial das linhagens. Somente as linhagens 2-1 A1, 13-2 A, 19A, 19B, 19-3B, 19-3C, 19-4A, 38-3 A e 51-2 A apresentaram crescimento colonial para mais de um fungicida sendo esses o Tiofanato Metílico, o Clorotalonil e o Mancozeb (GRÁFICO 1) (FIGURA 1).

Gráfico 1- Estimativas médias para o DC das 30 linhagens (identificação na TABELA 1) de *Colletotrichum* e *Glomerella* avaliadas nos seis tratamentos testados.

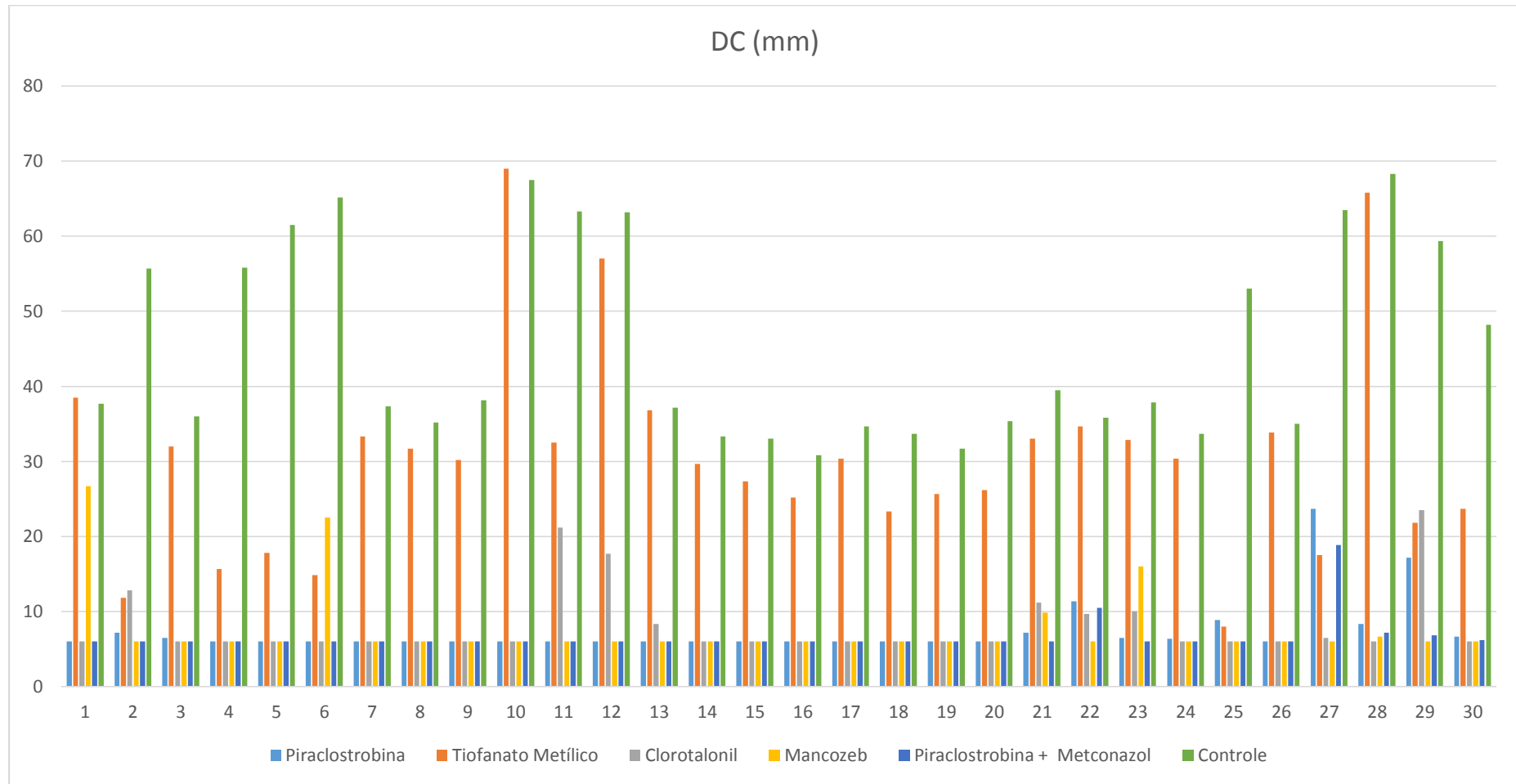
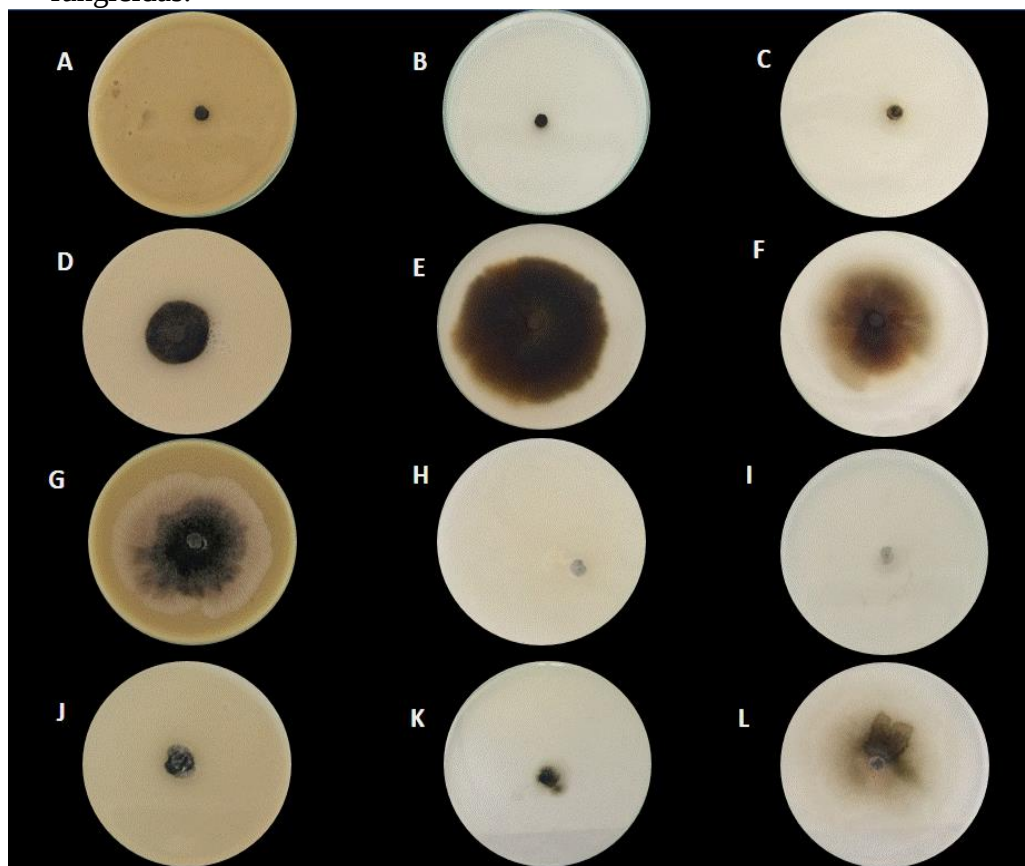


Figura 1- *Bioensaio* da sensibilidade *in vitro* das linhagens 19B (A à F) e 13-2 A (G à L) à cinco fungicidas.



Mancozeb (A e G). Piraclostrobina + Metconazol (B e H)). Piraclostrobina (C e I). Clorotalonil (D e J). Tiofanato Metílico (E e K). Testemunha sem fungicida (F e L).

Fonte: Da autora (2019).

Para a característica IVCm, o controle, sem fungicida, variou de 2,7 a 6,8mm por dia e as médias de crescimento foram agrupadas em cinco grupos estatisticamente distintos. A porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle foi calculada para cada linhagem em cada fungicida testado. Todas as linhagens foram sensíveis aos fungicidas Piraclostrobina, e Piraclostrobina + Metconazol. Para o fungicida Clorotalonil, 3,3% das linhagens apresentaram sensibilidade intermediária. Já para o fungicida Mancozeb 6,7% das linhagens apresentaram sensibilidade intermediária, o restante das linhagens foram sensíveis ao fungicida testado. O fungicida Tiofanato Metílico foi o que menos inibiu o crescimento das linhagens, sendo que 23,3% das linhagens podem ser consideradas resistentes, 53,4% intermediárias e 23,2% foram sensíveis (TABELA 5) (FIGURA 1).

Tabela 5- Estimativas médias para a porcentagem de inibição média do crescimento micelial nos 5 fungicidas avaliados em relação ao controle.

Linhagem	Piraclostrobina	Tiofanato Metílico	Clorotalonil	Mancozeb	Piraclostrobina + Metconazol
2-1 A1	100% S	0% R	100% S	95% S	100% S
9 A	97,8% S	88,4% S	86,2% S	58,3% I	100% S
12-1 D1	98,5% S	13,2% I	100% S	100% S	100% S
13-1 C	100% S	80,7% S	100% S	100% S	100% S
13-1 A1	100% S	78,8% S	100% S	100% S	100% S
13-2 A	100% S	85,1% S	100% S	72,2 S	100% S
17-3 A	100% S	12,6% I	100% S	100% S	100% S
17-3C	100% S	12,0% I	100% S	100% S	100% S
17-3 D	100% S	24,6% I	100% S	100% S	100% S
18-1 A	100% S	0% R	100% S	100% S	100% S
19 A	100% S	53,8% I	73,5% S	100% S	100% S
19 B	100% S	10,7% I	79,7% S	100% S	100% S
19-1 A	100% S	1,2% R	92,5% S	100% S	100% S
19-1 B	100% S	13,5% I	100% S	100% S	100% S
19-1 C	100% S	21% I	100% S	100% S	100% S
19-1 D	100% S	22,8% I	100% S	100% S	100% S
19-2 A	100% S	15,4% I	100% S	100% S	100% S
19-2 B	100% S	37,1% I	100% S	100% S	100% S
19-2 C	100% S	23,2% I	100% S	100% S	100% S
19-3 A	100% S	31,3% I	100% S	100% S	100% S
19-3 B	66,1% S	20,6% I	84,2% S	87,3% S	100% S
19-3 C	82,0% S	3,4% R	87,5% S	100% S	83,1% S
19-4 A	100% S	14,4% I	14,4% I	67% S	100% S
19-4 B	100% S	12,7% I	100% S	100% S	100% S
38-2 A	94,0% S	95,7% S	100% S	100% S	100% S
38-2 B	100% S	3,1% R	100% S	100% S	100% S
38-3 A	70,0% S	81,5% S	100% S	100% S	77,9% S
40-2 A	97,1% S	5,3% R	100% S	100% S	92,8% S
51-2 A	78,7% S	71,0% S	66,1% S	100% S	98,1% S
52	100% S	60,0% I	100% S	100% S	100% S

R- Linhagens Resistentes ao fungicida; I- linhagens com resistência intermediária ao fungicida; S- Linhagens sensíveis ao fungicida

Fonte: Da autora (2019).

Para a capacidade de esporulação, diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram observadas para todas as fontes de variação Linhagens, Fungicidas e na interação Linhagens x Fungicidas. No teste de médias as linhagens foram separadas em oito grupos distintos quando estas foram avaliadas sem a presença de fungicidas. Já na presença da maioria dos fungicidas, houve inibição significativa da esporulação das linhagens. Apenas na presença do fungicida Tiofanato Metílico é que a maioria das linhagens apresentaram elevada esporulação e o mesmo foi comparado com o controle (TABELA 6).

Em alguns casos, como para as linhagens 12-1 D1, 17-3C, 19-1 A, 19-1 B, 19-2 B, 19-2 C e 40-2 A, a esporulação na presença do fungicida Tiofanato Metílico foi superior ao controle. Já para as linhagens 2-1 A1, 9 A, 13-1C, 13-2 A, 19 A, 19-1 D1, 19-3 A, 38-2 A e 51-2 A não foram observadas diferenças entre o fungicida e o controle, ou seja, as linhagens apresentaram a mesma taxa de esporulação na presença e na ausência do fungicida. Para a linhagem 19B, a maior taxa de esporulação foi observada em placas contendo o fungicida Clorotalonil. A interação significativa entre Linhagens x Fungicidas, evidencia diferenças na sensibilidade entre as linhagens aos fungicidas, isto é, a esporulação das linhagens não foi coincidente na presença dos diferentes produtos.

Tabela 6 - Estimativas médias para a capacidade de esporulação (10^7 conídios/ml) das linhagens com o fungicida Tiofanato Metílico em relação ao controle.

Linhagem	Tiofanato Metílico	Controle	Linhagem	Tiofanato Metílico	Controle
2-1 A1	0,005 ^{NS} E	0,02	19-1 D	0,08 ^{NS} E	0,03
9 A	0,02 ^{NS} E	0,03	19-2 A	0,43* C	0,99
12-1 D1	0,46* C	0,08	19-2 B	0,17* D	0,03
13-1 C	0,04 ^{NS} E	0,05	19-2 C	0,33* D	0,08
13-1 A1	0,00* E	0,04	19-3 A	0,10 ^{NS} E	0,04
13-2 A	0,00 ^{NS} E	0,01	19-3 B	0,02* E	0,61
17-3 A	0,01* E	0,02	19-3 C	0,05* E	1,03
17-3C	0,25* D	0,04	19-4 A	0,15* D	2,39
17-3 D	0,02* E	0,22	19-4 B	0,01* E	0,01
18-1 A	1,15* A	0,36	38-2 A	0,16 ^{NS} D	0,25
19 A	0,11 ^{NS} E	0,21	38-2 B	0,92* B	1,48
19 B	0,01* E	0,18	38-3 A	0,00* E	0,09
19-1 A	0,84* B	0,18	40-2 A	0,61* C	0,09
19-1 B	0,63* C	0,16	51-2 A	0,00 ^{NS} E	0,02
19-1 C	0,25* D	0,86	52	0,00* E	0,35

*= diferenças significativas pelo teste F a 5% de probabilidade

ns= diferenças não significativas pelo teste F a 5% de probabilidade

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

Fonte: Da autora (2019).

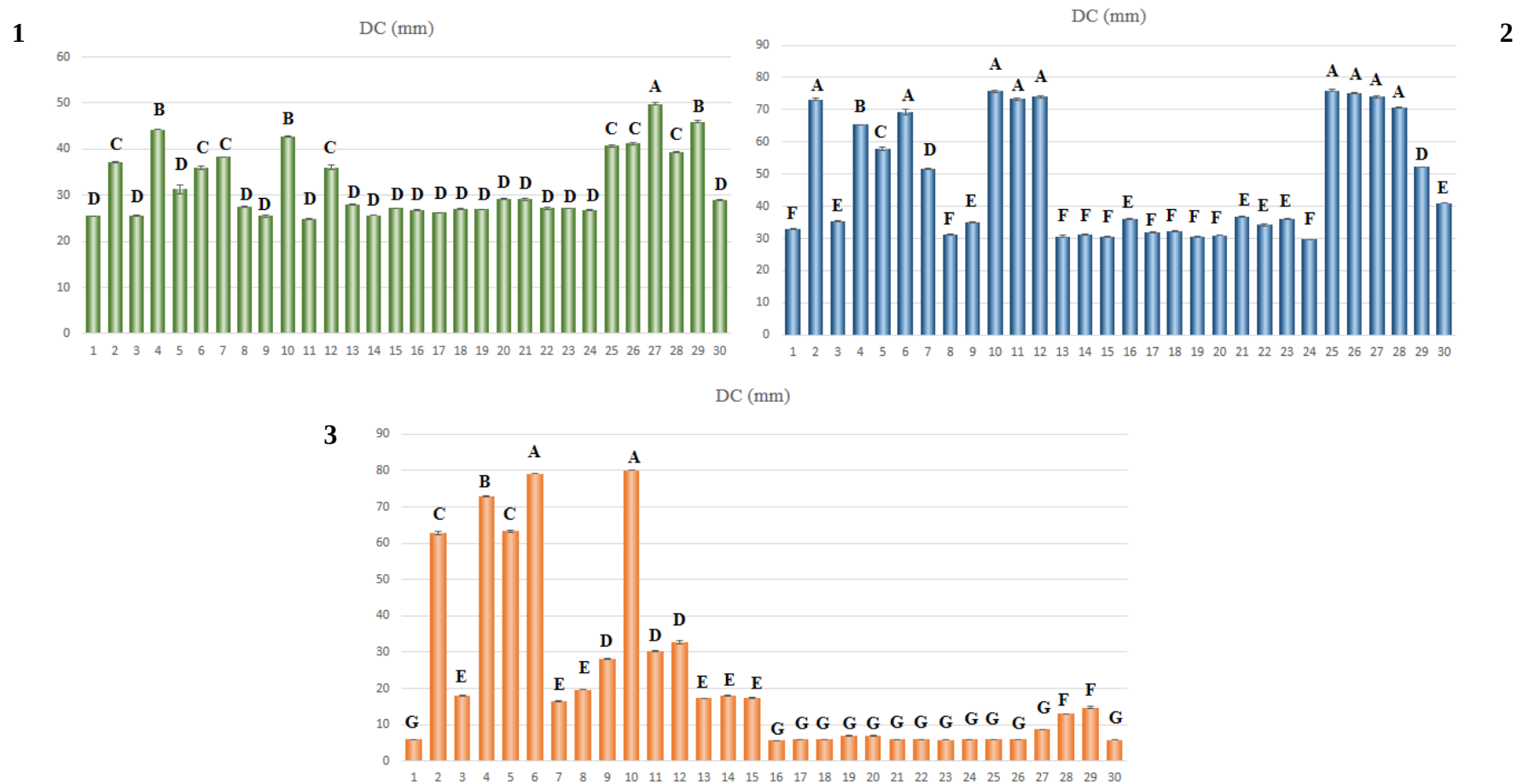
4.3 Efeito da temperatura no crescimento e esporulação de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp.

Na análise de variância individual realizada para cada temperatura, houve diferença significativa entre as linhagens ($P \leq 0,05$) para o IVC, DC e esporulação (Apêndice C). Posteriormente, foi realizada a análise conjunta considerando as diferentes temperaturas. Todas

as fontes de variação foram significativas ($P \leq 0,05$) para as três características avaliadas (APÊNDICE D). Na temperatura de 23 °C, o DC variou de 29,67 a 76,00mm. Aos 17 °C as médias foram inferiores e variaram de 24,83 a 49,83mm. A 33 °C as linhagens foram significativamente mais distintas, variando de 6 a 80,00mm. Maiores médias para o DC foram observados na temperatura de 23 °C para a maioria das linhagens, porém para as linhagens 13-1 C, 13-1 A1, 13-2 A foram na temperatura de 33 °C.

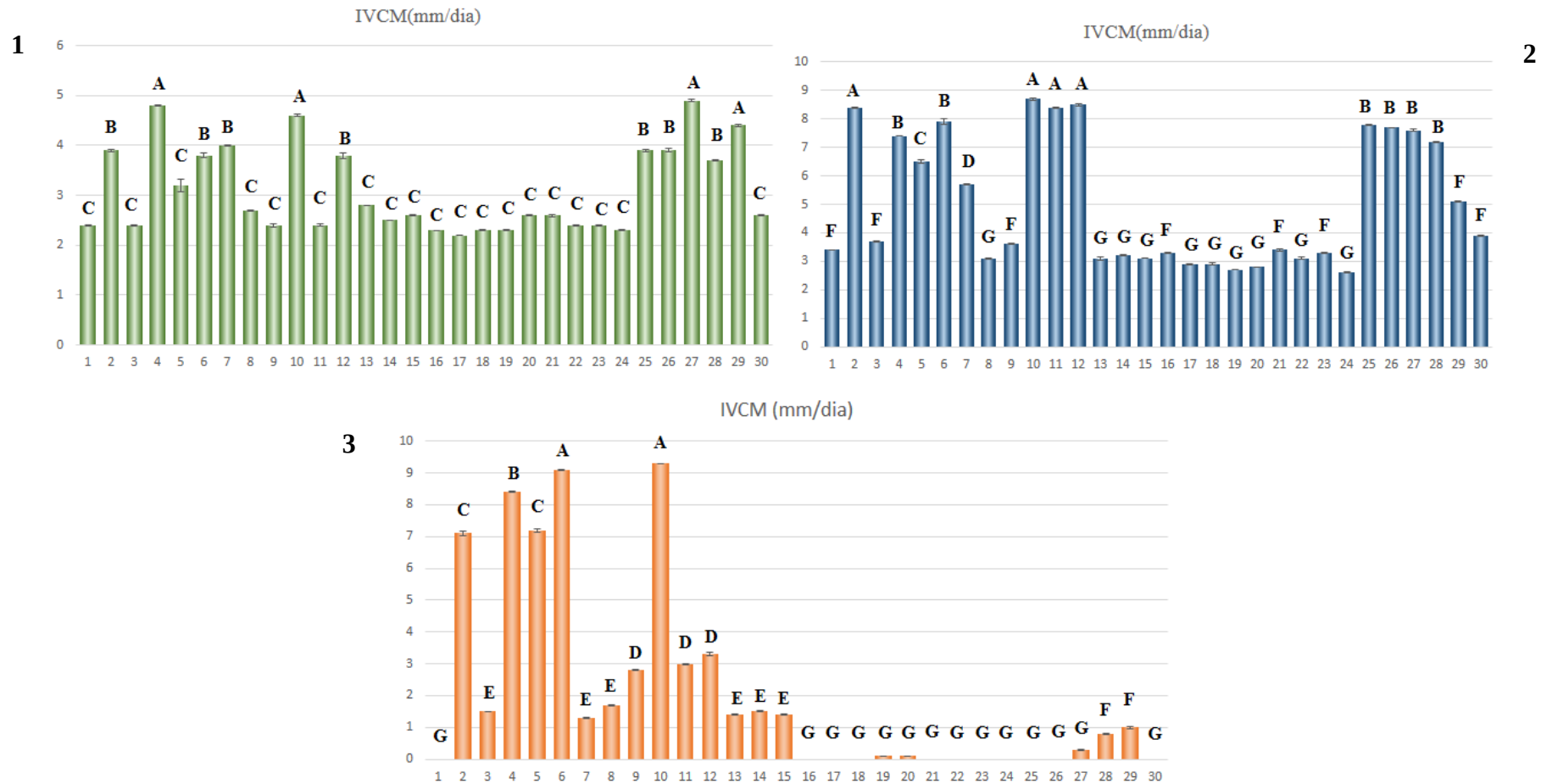
Quanto ao IVC, as linhagens apresentaram maiores índices de crescimento na temperatura de 23 °C (APÊNDICE F). Com exceção das linhagens 13-1 C, 13-1 A1, 13-2 A e 18-1 A, como para o DC, estas apresentaram maiores médias de crescimento na temperatura de 33°C (GRÁFICO 2). Vale ressaltar, que essas linhagens amplificaram para o par de *primers* específico para *Glomerella truncata*, exceto as 13-1A1 e 18-1A. É importante destacar que as linhagens que amplificaram para o *primer* específico de *C. lindemuthianum* apresentaram crescimento mais lento quando comparadas com as demais. Além disso, tais linhagens não apresentaram crescimento ou apresentaram crescimento inferior às demais na temperatura de 33 °C (GRÁFICO 2). Foram observadas também, alterações na morfologia da colônia e na produção de peritécios, nas três temperaturas, não sendo observada produção de peritécios nas linhagens de *Glomerella* spp. crescidas a 33 °C (FIGURA 3).

Gráfico 2 - Estimativas médias para o DC (mm) das 30 linhagens (identificação na TABELA 1) de *Colletotrichum* e *Glomerella* avaliadas nos três tratamentos testados.



1 representa as linhagens crescidas a 17°C, 2 a 23°C e 3 a 33°C. Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.
Fonte: Da autora (2019).

Gráfico 3 - Estimativas médias para o IVC (mm/dia) das 30 linhagens (identificação na TABELA 1) de *Colletotrichum* e *Glomerella* avaliadas nos três tratamentos testados.



Legenda: 1 representa as linhagens crescidas a 17°C, 2 a 23°C e 3 a 33°C. Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

As linhagens apresentaram maiores médias para a capacidade de esporulação quando avaliadas aos 23°C (TABELA 7). Considerando as temperaturas de 23 °C, 17 °C e 33 °C, as linhagens com maiores médias foram respectivamente: 17-3 A (66×10^6 conídios/mL), 38-3 A (10×10^6 conídios/mL) e 13-1 C (12×10^6 conídios/mL) (TABELA 7). Vale ressaltar, que aproximadamente 90% das linhagens apresentaram as menores médias de esporulação quando avaliadas aos 33 °C, sendo que dessas, 46,7% não cresceram nesta temperatura. Em relação as linhagens que obtiveram elevados índices de crescimento na temperatura de 33 °C, vale destacar as linhagens 13-1C e 13-2^a, pois estas apresentaram capacidade de esporulação elevadas em comparação com as demais temperaturas, comprovando a variabilidade das linhagens.

Tabela 7- Estimativas médias para capacidade de esporulação (conídios/mL) e seus respectivos desvios padrões das linhagens avaliadas nas três temperaturas.

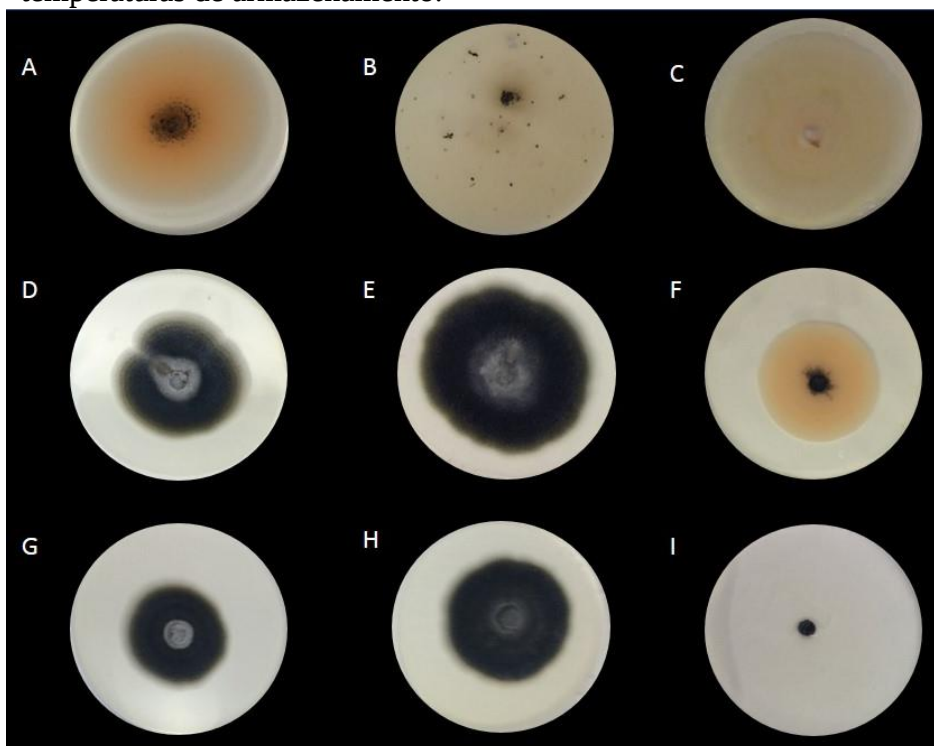
Linhagem	Esporulação (10^6 conídios/mL)								
	17°C			23°C			33°C		
2-1 A1	0,60	± 0,57	D ^{ns}	0,10	± 0,02	E ^{ns}	0	0	C ^{ns}
9 A	0,30	± 0,30	D ^{ns}	0,10	± 0,06	E ^{ns}	0,3	± 0,18	C ^{ns}
12-1 D1	1,50	± 0,73	C a	0,40	± 0,15	E b	0,2	± 0,08	C b
13-1 C	0,20	± 0,04	D b	0,70	± 0,06	E b	12,0	± 5,10	A a
13-1 A1	2,60	± 1,96	C a	3,30	± 1,35	D a	0	0,00	C b
13-2 A	0,60	± 0,25	D b	1,00	± 0,37	E b	8,2	± 0,15	B a
17-3 A	0,70	± 0,54	D b	66,00	± 9,98	A a	1,9	± 1,04	C b
17-3C	1,00	± 0,65	D a	1,10	± 0,37	E a	0	0,00	C b
17-3 D	0,40	± 0,30	D b	3,10	± 1,61	D a	0	0,00	C b
18-1 A	1,60	± 1,76	C c	16,00	± 4,89	B a	8,4	± 1,62	B b
19 A	0,20	± 0,07	D ^{ns}	1,10	± 0,67	E ^{ns}	0,2	± 0,06	C ^{ns}
19 B	0,30	± 0,04	D b	6,10	± 1,98	D a	0,6	± 0,50	C b
19-1 A	1,90	± 1,49	C b	4,10	± 0,59	D a	0,1	± 0,06	C c
19-1 B	1,80	± 0,92	C b	6,70	± 1,12	C a	0,2	± 0,16	C c
19-1 C	7,80	± 1,61	B b	12,00	± 3,18	B a	0	0	C c
19-1 D	1,30	± 0,21	C b	3,90	± 1,16	D a	0	0	C c
19-2 A	1,10	± 0,33	D b	5,50	± 1,90	D a	0	0	C c
19-2 B	1,60	± 0,50	C a	0,60	± 0,22	E a	0	0	C b
19-2 C	0,20	± 0,04	D ^{ns}	0,20	± 0,06	E ^{ns}	0	0	C ^{ns}
19-3 A	0,10	± 0,02	D b	0,60	± 0,12	E a	0	0	C b
19-3 B	0,20	± 0,08	D b	9,70	± 2,06	C a	0	0	C b
19-3 C	0,80	± 0,35	D b	5,70	± 1,49	D a	0	0	C c
19-4 A	7,00	± 1,63	B a	4,40	± 2,41	D b	0	0	C c
19-4 B	0	0	D ^{ns}	0,10	± 0,06	E ^{ns}	0	0	C ^{ns}
38-2 A	2,80	± 0,96	C b	11,00	± 5,95	B a	0	0	C c
38-2 B	1,80	± 0,45	C a	0,30	± 0,09	E b	0	0	C b
38-3 A	10,00	± 2,55	A a	7,30	± 1,06	C a	0,3	± 0,22	C b
40-2 A	0,20	± 0,07	D b	4,90	± 2,31	D a	0,1	0	C b
51-2 A	0,10	± 0,04	D ^{ns}	0,40	± 0,06	E ^{ns}	0,1	± 0,02	C ^{ns}
52	0,40	0	D a	0,50	± 0,24	E a	0	0	C b

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e, minúscula na linha, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

ns= diferenças não significativas pelo teste F a 5% de probabilidade

Fonte: Da autora (2019).

Figura 3 - *Bioensaio* da sensibilidade *in vitro* das linhagens 9A, 17-3D e 19-1D a diferentes temperaturas de armazenamento.



Crescimento micelial das linhagens 9A, 17-3D e 19-1D na temperatura 17°C (A, D, G), 23°C (B, E, H), 33°C (C, F, I).

Fonte: Da autora (2019).

A alternância de temperatura e fotoperíodo (18 horas na luz a 32 °C e 6 horas no escuro a 23 °C) foi avaliada simulando as condições de campo. Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para as linhagens em todas as características avaliadas, IVCm, DC e esporulação (APÊNDICE E). O DC variou de 7,3 a 85 mm, valores esses semelhantes aos obtidos pelas linhagens mantidas na temperatura de 33 °C (TABELA 8). Para a esporulação, os resultados foram semelhantes ao anterior, onde 60% das linhagens obtiveram baixa taxa de esporulação mesmo com a alternância da temperatura. Porém, o IVCm apresentou valores menores quando comparados com a temperatura de 33°C, variando de 0,1 a 7,2 mm, enquanto que apenas aos 33 °C essa amplitude foi de 0 a 9,3 mm.

Entretanto, houve coincidência das linhagens que apresentaram maiores valores de IVCm, 13-1 C, 13-1 A1 e 18-1 A. Já para as linhagens que apresentaram baixo IVCm, houve uma taxa de coincidência de 85,7% das linhagens, exceto para as linhagens 38-2 A e 38-3 A que apresentaram uma boa taxa de crescimento com a alternância da temperatura (FIGURA 4). Esses resultados indicam que a alternância de temperatura não foi suficiente para contornar a inibição de altas temperaturas no crescimento e esporulação dessas linhagens. Portanto, a temperatura é um fator limitante no crescimento e reprodução das linhagens.

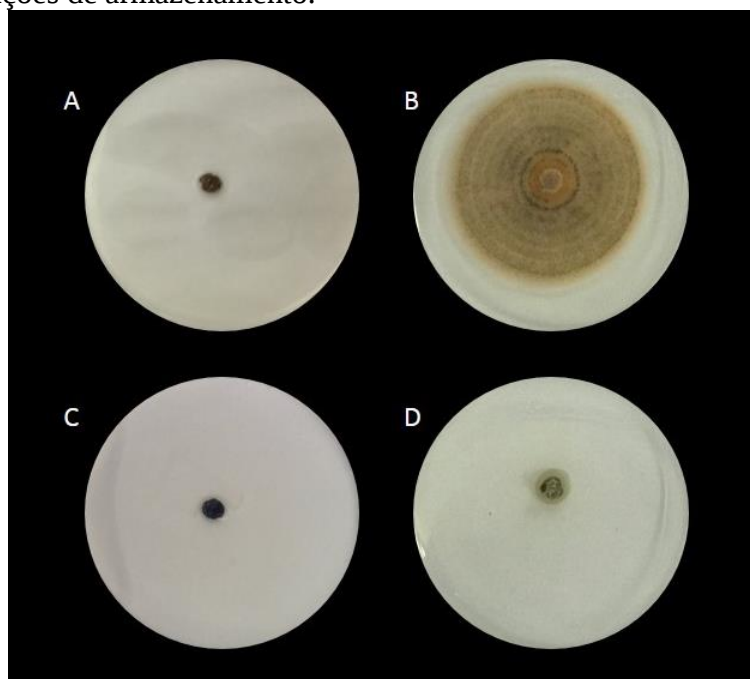
Tabela 8 - Estimativas médias para o IVCm (mm/dia), DC (mm) e capacidade de esporulação de esporulação (conídios/mL) para as 30 linhagens quando avaliadas alternando-se a temperatura e o fotoperíodo na BOD.

Linhagem	IVCM (mm/dia)		DC (mm)		Esporulação (conídio/mL)		Linhagem	IVCM (mm/dia)		DC (mm)		Esporulação (conídio/mL)	
2-1 A1	0,1	G	7,3	F	0,0	E	19-1 D	0,4	G	10,0	F	0,0	E
9 A	3,9	D	52,2	D	0,1	D	19-2 A	0,5	G	10,7	F	0,0	E
12-1 D1	0,2	G	8,5	F	0,0	E	19-2 B	0,5	G	10,7	F	0,0	E
13-1 C	6,7	A	79,2	A	0,4	C	19-2 C	0,4	G	10,2	F	0,0	E
13-1 A1	5,8	B	70,2	B	0,0	E	19-3 A	0,4	G	10,3	F	0,0	E
13-2 A	5,3	C	63,2	C	0,0	E	19-3 B	0,3	G	8,8	F	0,0	E
17-3 A	0,2	G	8,7	F	0,1	D	19-3 C	0,5	G	10,5	F	0,0	E
17-3C	0,3	G	9,3	F	0,0	E	19-4 A	0,3	G	9,2	F	0,0	E
17-3 D	0,4	G	10,0	F	0,0	E	19-4 B	0,3	G	9,8	F	0,0	E
18-1 A	7,2	A	85,0	A	2,5	A	38-2 A	4,7	C	58,5	C	1,5	B
19 A	2,0	F	28,5	E	0,0	D	38-2 B	2,7	E	34,3	E	0,0	D
19 B	1,9	F	27,0	E	0,1	D	38-3 A	4,0	D	51,5	D	0,5	C
19-1 A	0,3	G	9,0	F	0,0	E	40-2 A	6,8	A	84,0	A	0,1	D
19-1 B	0,4	G	9,7	F	0,0	E	51-2 A	6,9	A	83,8	A	0,0	E
19-1 C	0,4	G	10,2	F	0,0	E	52	0,3	G	9,3	F	0,0	E

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

Fonte: Da autora (2019).

Figura 4 - *Bioensaio* da sensibilidade *in vitro* das linhagens 19-1 D e 38-2 A a diferentes condições de armazenamento.



A e B; C e D representam o crescimento micelial das linhagens 38-2 A e 19-1D, respectivamente nas temperaturas de 33°C (A e C) e com a alternância da temperatura e fotoperíodo (B e D).

Fonte: Da autora (2019).

4.4 Caracterização citológica de linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp.

Todos os conídios apresentaram formato cilíndrico, com exceção da linhagem 13-2 A que apresentou somente ascósporos e com formato falciforme (FIGURA 5) (TABELA 9).

Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram observadas para a largura e o comprimento dos conídios. A largura variou de 5,0 (19 A) a 22,6 μm (13-2 A), formando seis grupos de linhagens distintos estatisticamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

Já na avaliação do comprimento dos conídios para as linhagens, formaram-se cinco grupos distintos, sendo que as médias variaram de 2,6 (19 B) a 6,4 μm (9 A). As linhagens 19 A e 19 B apresentaram tamanho de conídios inferiores às demais, sendo agrupadas separadamente para ambas as características (TABELA 9) (FIGURA 6).

Tabela 9- Estimativa para a dimensão dos conídios (μm) e formato dos conídios das 30 linhagens armazenadas a 23°C.

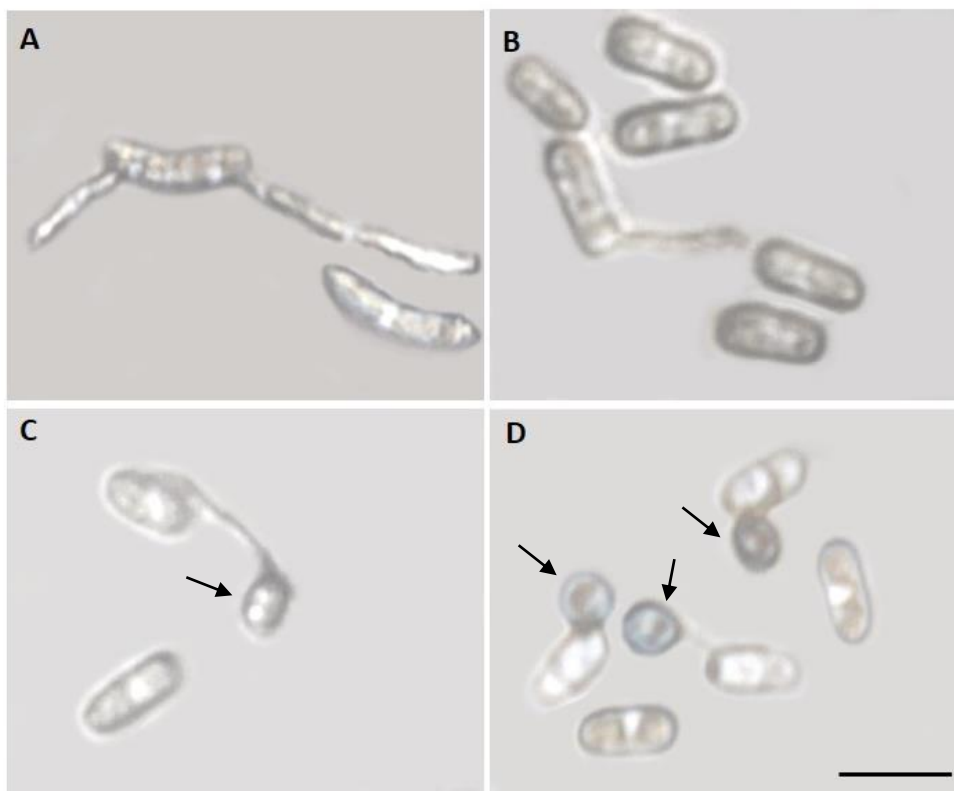
Tamanho conídio (μm)						Tamanho conídio (μm)					
Linhagem	Comprimento		Largura		Formato	Linhagem	Comprimento		Largura		Formato
2-1 A1	13,4	E	5,2	C	Cilíndrico	19-1 D	12,7	E	4,6	D	Cilíndrico
9A	15,2	D	6,4	A	Cilíndrico	19-2 A	13,1	E	4,9	D	Cilíndrico
12-1 D1	14,0	D	5,0	C	Cilíndrico	19-2 B	12,9	E	4,8	D	Cilíndrico
13-1 C	17,4	B	5,2	C	Cilíndrico	19-2 C	12,8	E	4,9	D	Cilíndrico
13-1 A1	18,0	B	5,7	B	Cilíndrico	19-3 A	12,6	E	4,6	D	Cilíndrico
13-2 A	22,6	A	6,1	A	Falciforme	19-3 B	12,7	E	4,7	D	Cilíndrico
17-3 A	12,3	E	4,8	D	Cilíndrico	19-3 C	12,7	E	4,8	D	Cilíndrico
17-3C	13,5	D	5,2	C	Cilíndrico	19-4 A	12,5	E	4,8	D	Cilíndrico
17-3 D	16,0	C	4,8	D	Cilíndrico	19-4 B	12,9	E	4,8	D	Cilíndrico
18-1 A	16,6	C	4,5	D	Cilíndrico	38-2 A	13,3	E	6,1	A	Cilíndrico
19 A	5,0	F	2,9	E	Cilíndrico	38-2 B	14,8	D	6,1	A	Cilíndrico
19 B	5,4	F	2,6	E	Cilíndrico	38-3 A	13,7	D	5,7	B	Cilíndrico
19-1 A	12,9	E	5,6	B	Cilíndrico	40-2 A	13,8	D	4,9	D	Cilíndrico
19-1 B	13,7	D	5,4	B	Cilíndrico	51-2 A	19,1	B	5,6	B	Cilíndrico
19-1 C	14,3	D	5,2	C	Cilíndrico	52	12,0	E	5,4	B	Cilíndrico

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

Fonte: Da autora (2019).

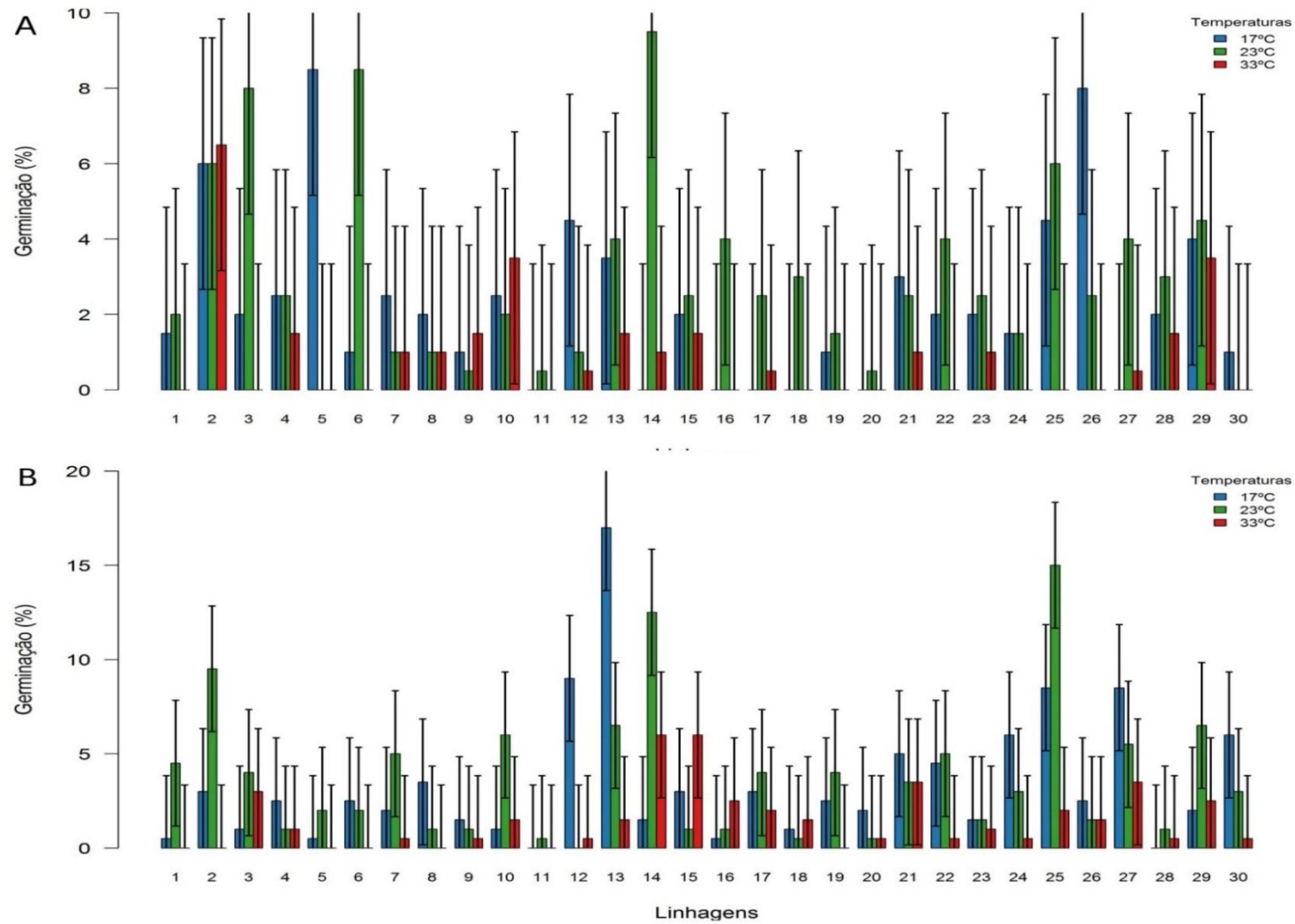
Para a porcentagem de germinação (FIGURA 5), foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para todas as fontes de variação, exceto para a interação Temperaturas x Tempos. Para todas as temperaturas não houve diferenças significativas na porcentagem de germinação para os dois tempos avaliados, exceto para as linhagens avaliadas aos 23 °C onde a maior porcentagem de germinação foi observada às 48 horas. A porcentagem de germinação das linhagens não foi coincidente nos dois tempos e nas três temperaturas avaliadas separadamente, uma vez que a interação Linhagens x Tempos x Temperaturas foi significativa. No Gráfico 4 observa-se que a maior porcentagem média de conídios germinados foi aos 23 °C para ambas as linhagens em ambos os tempos. Vale ressaltar que poucas linhagens apresentaram taxas elevadas de germinação quando mantidas aos 30 °C.

Figura 5 - Conídios Germinados e com a presença de apressório.



Nota: A- Linhagem 13-2A, B- Linhagem 40-2A, C- Linhagem 19-2C e D- Linhagem 38-2A. Escala 20 μ m.
Fonte: Da autora (2019).

Gráfico 4 - Porcentagem média de germinação para as 30 linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. avaliadas após 24 (A) e 48 (B) horas para as três temperaturas.

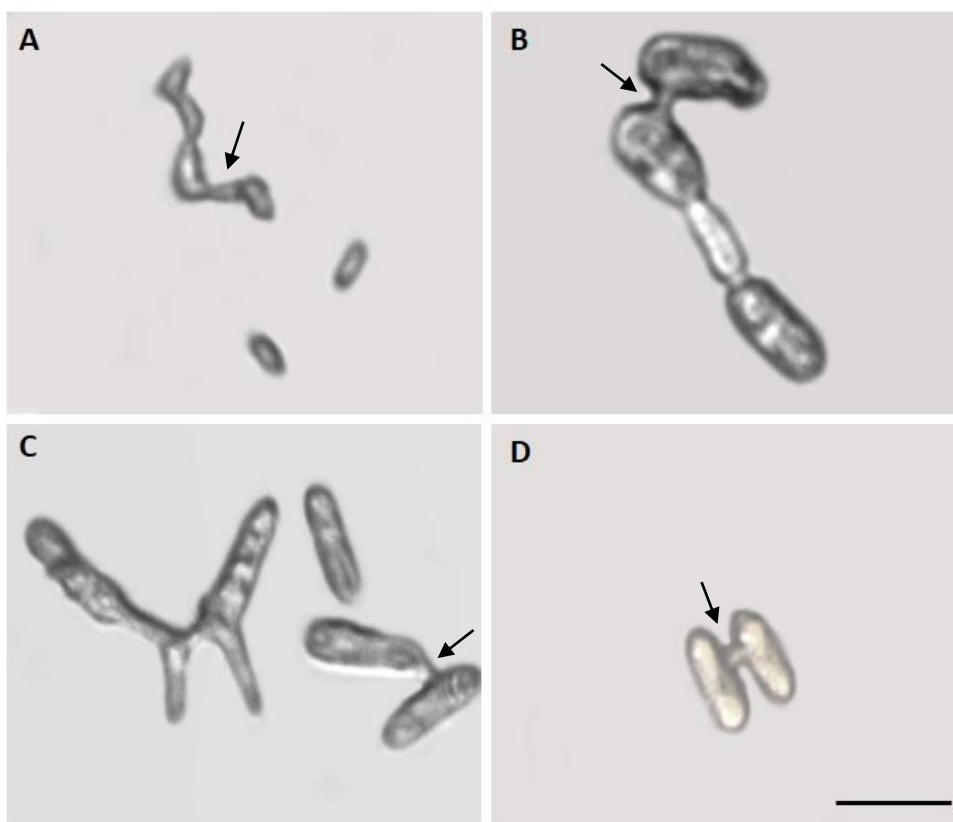


Fonte: Da autora (2019).

Na avaliação da porcentagem de anastomoses entre conídios (CATs), foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para todas as fontes de variação, exceto para o Tempo. Todas as linhagens apresentaram formação de CATs, exceto as linhagens 13-2 A e 19 A. Para todas as temperaturas não houve diferenças significativas na porcentagem da formação de CATs para os dois tempos avaliados, exceto para as linhagens avaliadas aos 17°C onde a maior porcentagem de formação de CATs foi observada às 48h.

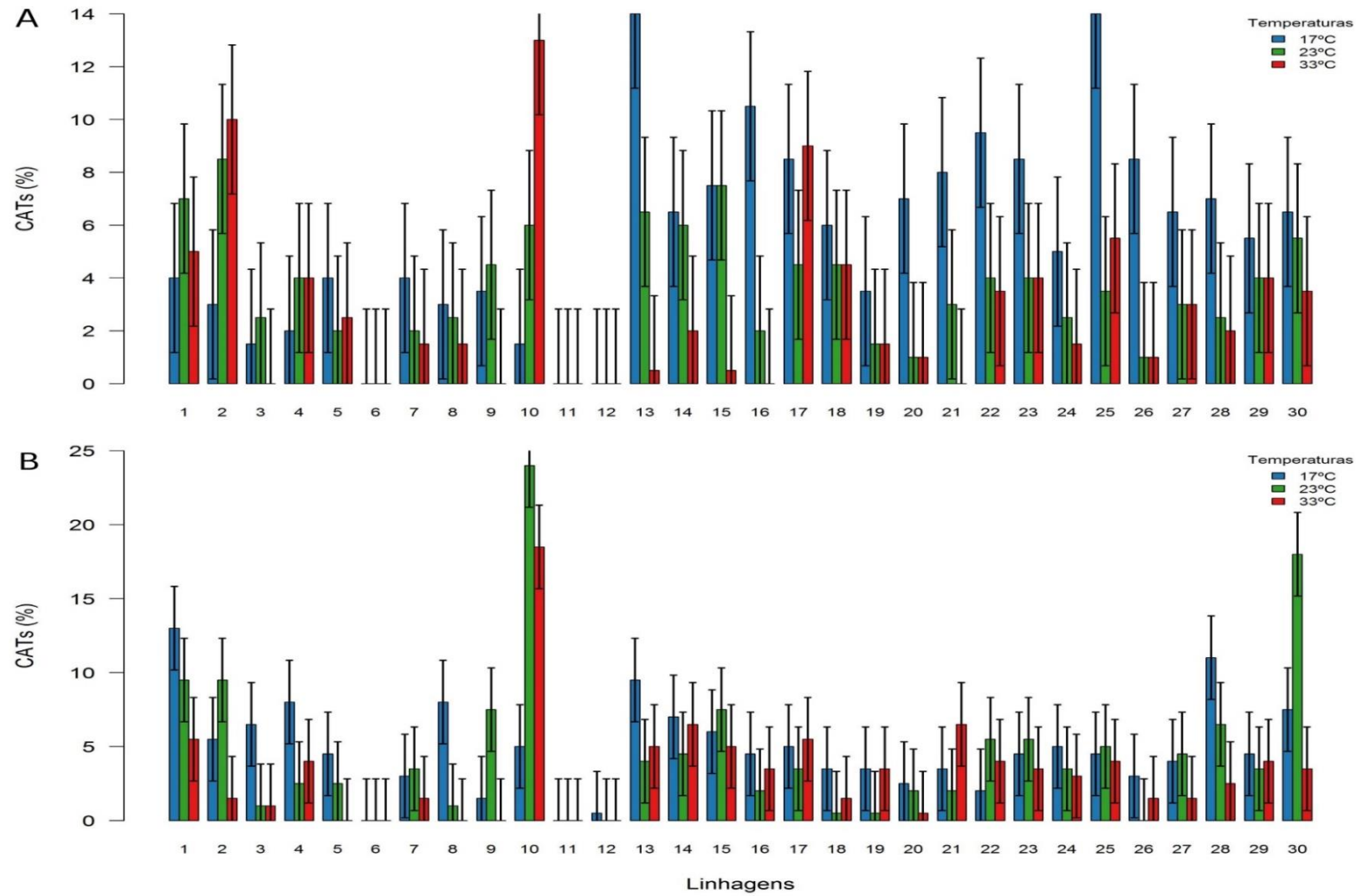
A interação Linhagens x Tempos x Temperaturas foi significativa havendo uma grande variação quanto a temperatura ideal para formação de CATs de acordo com as linhagens. Porém, em geral, a melhor temperatura foi 17 °C, seguida por 23 °C e 33 °C (GRÁFICO 5). No entanto, observa-se que a formação de CATs decresceu com o aumento da temperatura para a maioria das linhagens, exceto para as linhagens 9 A, 18-1 A e 19-2 A quando avaliadas no tempo de 24 horas e 19-2 A e 19-3 B no tempo de 48 horas. Essas linhagens apresentaram maior formação de CATs aos 33°C. Vale ressaltar que a linhagem 18-1 A foi a de maior média de formação de CATs em ambos os tempos (FIGURA 6).

Figura 6 - Formação de tubos de anastomose entre conídios (CAT's)



Nota: A. Linhagem 19B, B. Linhagem 9A, C. Linhagem 18-1A, D. Linhagem 19-1C. Escala 20 μ m.
Fonte: Da autora (2019).

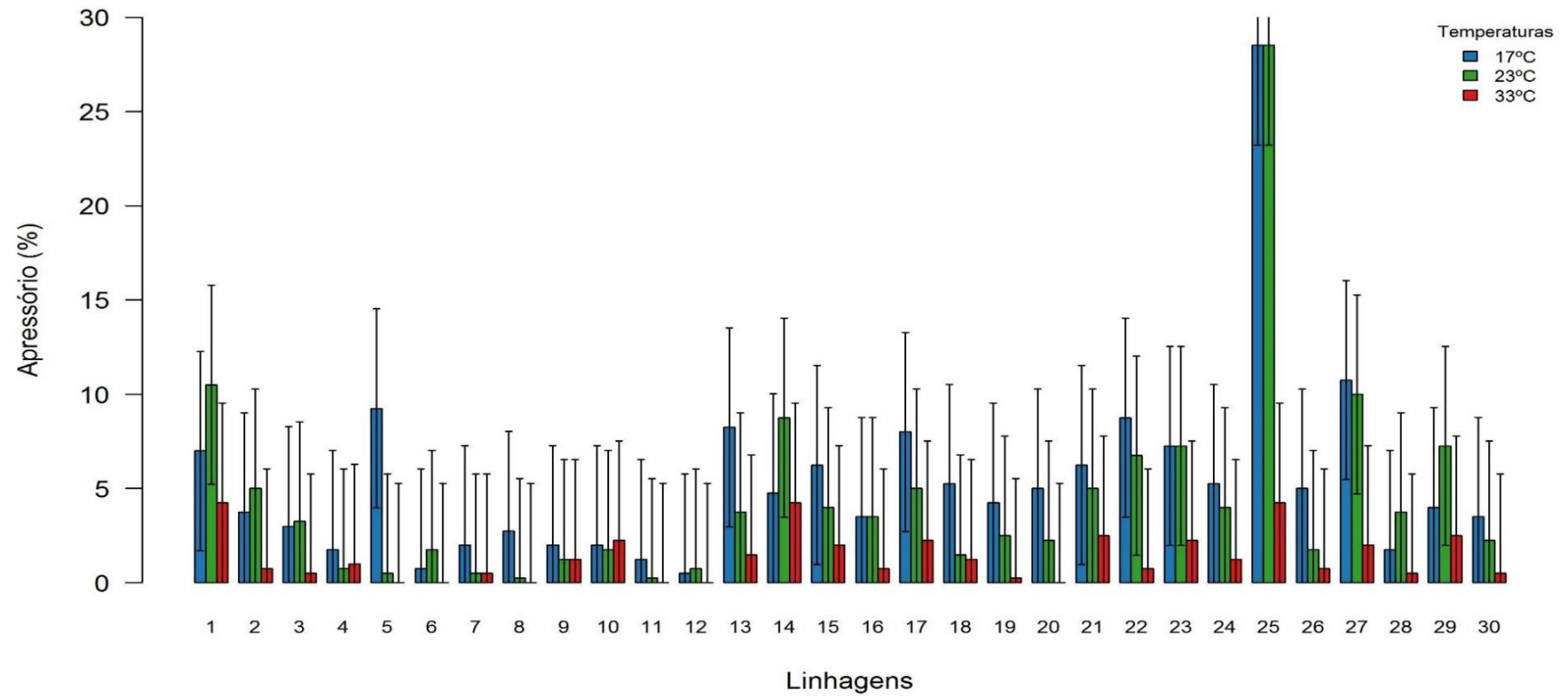
Gráfico 5 - Porcentagem média de CATs para as 30 linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. avaliadas após 24 (A) e 48 (B) horas para as três temperaturas.



Fonte: Da autora (2019).

Já para a produção de apressório, foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para todas as fontes de variação, exceto para interação Temperaturas x Linhagens e Tempos x Linhagens x Temperaturas. Em geral, as maiores porcentagens de formação de apressório foram observadas na temperatura de 17 °C. Não foram observadas linhagens que apresentaram médias superiores na temperatura de 33°C, ou seja, a temperatura inibiu significativamente esta característica. A linhagem 38-2 A foi a que apresentou as maiores médias para produção de apressórios tanto para temperatura de 17 °C quanto 23 °C (FIGURA 5) (GRÁFICO 6).

Gráfico 6 - Porcentagem média de apressórios para as 30 linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. avaliadas nas três temperaturas.



Fonte: Da autora (2019).

5 DISCUSSÃO

Linhagens de *Glomerella* isoladas a partir de lesões de antracnose e sarna tem sido relatada recentemente (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017). A avaliação destes isolados por meio de caracteres morfológicos e moleculares tem mostrado grande variabilidade. No presente trabalho, as linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. isoladas a partir de lesões de sarna e antracnose apresentaram padrões moleculares distintos, sendo que 60% das linhagens amplificaram para o *primer* HMG *C. lindemuthianum*, 20% para o *primer* HGM *Glomerella* spp. e 33% para o *primer* HGM *Glomerella truncata*. No entanto, as linhagens obtidas a partir de lesões de antracnose amplificaram para os pares de *primers* específicos para *Glomerella*. Todas as linhagens que amplificaram para o par de *primer* específico de *Colletotrichum lindemuthianum* originaram-se de lesões de sarna. Portanto, concordando com a hipótese de um complexo de espécies de *Colletotrichum* que infectam o feijoeiro (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017), causando sintomas de ambas as doenças. Vale ressaltar, que devida a ampla variabilidade das linhagens avaliadas, a confiabilidade na determinação de cada uma das espécies com base apenas nesses *primers* não é o mais indicado. Uma determinação segura das espécies envolvidas demandaria uma análise filogenética multilocos.

Na avaliação da sensibilidade das linhagens *in vitro* a diferentes fungicidas, foi observado que a maioria dos ingredientes ativos testados foram efetivos no controle das linhagens, exceto para o fungicida Tiofanato Metílico, que apresentou menor eficiência no controle do crescimento das mesmas (TABELA 5). A baixa sensibilidade de linhagens de *Colletotrichum* a benzimidazóis tem sido relatada, Sartorato (2006) observou que apenas dois isolados testados se mostraram sensíveis a este fungicida. O fato da maioria das linhagens apresentarem maior crescimento na presença do tiofanato metílico em relação aos demais fungicidas indica a ocorrência de linhagens resistentes a este princípio ativo. Neste estudo, 76,6% das linhagens avaliadas se mostraram sensíveis ou de sensibilidade intermediária ao produto, demonstrando o elevado grau de resistência das linhagens. Resultados semelhantes foram observados por Pinto et al. (2012), que também demonstraram a ineficiência do controle de linhagens de *C. lindemuthianum* quando avaliados *in vitro* para este fungicida, sendo que 31,1% das linhagens avaliadas se mostraram sensíveis ou de sensibilidade intermediária, comprovando a ineficiência do produto. Souza Filho et al. (2015) também comprovaram a

ineficiência de fungicidas do grupo dos benzimidazóis e óxido de cobre no controle da antracnose em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

A pressão de seleção exercida pela aplicação constante de fungicidas é o principal fator responsável pela perda de sensibilidade das populações (GHINI; KIMATI, 2000). Porém, a grande variabilidade apresentada pelos patógenos é o principal fator para que ocorra a baixa eficiência a um determinado grupo químico. Dentre alguns fatores que afetam a variabilidade do patógeno estão a mutação, a recombinação sexual, heterocariose e parassexualidade e anastomose entre conídios, sendo este último, relatado recentemente como um dos fatores responsáveis pela presença de polimorfismo cromossômico em *C. lindemuthianum* e *Glomerella* (GONÇALVES, 2016). Este autor tem relatado a plasticidade do genoma nessas espécies, o que poderia explicar essas diferenças nos resultados da análise molecular realizada no presente trabalho e em outros trabalhos recentes (ISHIKAWA et al., 2012, PINTO et al., 2012; MOTA et al., 2016).

Para os demais fungicidas testados, as linhagens apresentaram elevado grau de sensibilidade. Este fato pode sugerir que não houve uma pressão suficiente causada pelo uso desses fungicidas ao longo dos anos. Com relação as estrobilurinas, as linhagens testadas se mostraram altamente sensíveis, fato este que já havia sido relatado por Sartorato (2006). Além disso, este produto vem sendo recomendado como uma medida eficiente no controle da antracnose no campo (RAVA, 2002). No presente trabalho, todas as linhagens se mostraram sensíveis a este fungicida, tanto as linhagens provenientes de lesão de sarna quanto de antracnose. Souza Filho et al. (2015) já demonstraram a grande eficiência da piraclostrobina na inibição do crescimento colonial e germinação de conídios *in vitro* para isolados de *C. lindemuthianum*. Vale ressaltar, que em geral, as linhagens que amplificaram para o par de *primers* específicos de *C. lindemuthianum* se mostraram sensíveis a todos os fungicidas testados, exceto para o Tiofanato metílico. Somente a linhagem 19-4A apresentou sensibilidade intermediária ao fungicida Clorotalonil. Já para as linhagens que amplificaram para o par de *primers* específico de *Glomerella truncata* e *Glomerella* spp. somente a linhagem 9A obteve sensibilidade intermediária ao fungicida Mancozeb, as demais linhagens foram sensíveis a todos os fungicidas testados, exceto para o Tiofanato metílico.

Alguns autores indicam algumas estratégias anti-resistência, como a alternância de princípio ativo, utilização de misturas eficazes e, principalmente, a utilização de cultivares resistentes ao patógeno, contribuindo para a redução na pressão de seleção do patógeno (RODRIGUES et al., 2007).

A produção dos diferentes propágulos dos fitopatógenos, a taxa de crescimento, a produção de estruturas de resistência e a germinação dos mesmos são processos altamente dependentes da temperatura, fazendo com que este fator seja limitante no desenvolvimento ou não de uma epidemia. A ocorrência da sarna do feijoeiro tem sido observada nos campos de cultivo normalmente quando as temperaturas são elevadas (COSTA et al., 2001). Portanto, é importante observar o comportamento das linhagens isoladas de lesões de antracnose e sarna em diferentes temperaturas. No presente trabalho, na avaliação de diferentes temperaturas, pode-se observar a influência direta da temperatura no crescimento e esporulação das linhagens avaliadas. Na avaliação do crescimento micelial, as linhagens apresentaram maior IVCM quando crescidas a 23 °C. A melhor temperatura para o desenvolvimento de *C. lindemuthianum* é relatada como sendo de 17 a 25 °C (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Este fato foi comprovado devido a um maior desenvolvimento das linhagens quando crescidas a 17 °C e 23 °C quando comparadas a temperatura de 33 °C. O efeito inibidor da temperatura sobre o crescimento dos fungos é bastante variável, porém, a maioria dos patógenos apresentam melhor desenvolvimento entre 20 °C e 25 °C (POLTRONIERI et al., 2013), o que também ocorreu neste trabalho. As linhagens 13-1C, 13-1A1, 13-2A e 18-1A apresentaram os maiores índices de crescimento na temperatura de 33°C, sendo que essas linhagens amplificaram para pares de *primers* específicos de *Glomerella*. No entanto, as linhagens 13-1C e 13-1A1 amplificaram para ambos os pares de *primers* de *Glomerella* spp. utilizados (CT21HMG e HMGGLO) e as linhagens 13-2A e 18-1A apenas para o par de *primers* de *Glomerella* spp. (HMGGLO).

Quanto à capacidade de esporulação das linhagens, a temperatura também teve forte influência, sendo que a temperatura de 23 °C foi a ideal. Cada espécie de fungo exige uma faixa de temperatura ideal para esporular, sendo que há fungos que reduzem suas taxas de esporulação sob baixas temperaturas e aumentam à medida que a temperatura se eleva, até atingir um ponto máximo ou o ponto ótimo, podendo também ocorrer o oposto (POLTRONIERI et al., 2013). As linhagens avaliadas mostraram um padrão semelhante. A maioria das linhagens apresentaram aumento da esporulação com o aumento da temperatura até atingirem 23 °C. No entanto, as linhagens 13-1 C e 13-2A apresentaram maior esporulação aos 33 °C. Essas linhagens amplificaram para o par de *primers* específicos para *Glomerella* spp. Além disso, a linhagem 13-1C também amplificou para o par de *primers* específico para *Glomerella truncata*. Sardhara et al. (2016) observaram que para isolados de *C. lindemuthianum*, o intervalo ideal da temperatura foi de 25 a 30 °C, porém, o máximo de esporulação e crescimento foram observadas na temperatura de 30 °C, diferentemente do

resultado observado neste trabalho, em que as linhagens que amplificaram para o par de *primers* específico para *C. lindemuthianum* apresentaram crescimento e esporulação inibidos na temperatura de 33 °C.

O estudo de caracteres fisiológicos pode auxiliar diretamente na classificação dos isolados que possuem maior facilidade no estabelecimento na superfície do seu hospedeiro, ou seja, é importante para o entendimento dos eventos de pré e pós-infecção do hospedeiro pelo patógeno (BARCELOS, 2010; ISHIKAWA et al., 2010b). Neste estudo, altos níveis de diversidade foram detectados na análise da germinação de conídios e ascósporos das linhagens para as três temperaturas e os dois tempos avaliados (24 horas e 48 horas). Durante o processo de infecção, a temperatura pode aumentar ou diminuir a taxa de germinação dos esporos (MAIA et al., 2011; POLTRONIERI et al., 2013). A germinação média para ambos os tempos foi maior para a temperatura de 23 °C, diferentemente do que foi observado em trabalhos utilizando isolados de *C. gloeosporioides*, nos quais a temperatura ótima para germinação de conídios foi entre 25 °C a 30 °C (DENNER et al., 1986; POLTRONIERI et al., 2013). No presente trabalho, apenas duas linhagens apresentaram germinação ótima quando avaliadas na temperatura de 33 °C, considerando os dois tempos, as linhagens 9A, que amplificou para o par de *primer* específico para *Glomerella truncata*, e 18-1^a, que amplificou para o par de *primer* específico de *Glomerella* spp. Já Dias et al. (2005) observaram que isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram variação quanto a temperatura ótima para germinação conidial. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho, pois, as linhagens 13-1 A1, 19 B, 19-1 A, 38-2 B e 52 apresentaram maiores taxas de germinação na temperatura de 17 °C considerando os dois tempos.

Os CATs foram descritos com detalhes pela primeira em isolados de *C. lindemuthianum* por Roca et al. (2003) e tem sido relatada no gênero *Colletotricum* (BARCELOS et al., 2014; GONÇALVES; VELHO; STADINIK et al., 2016; ISHIKAWA et al., 2012; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012), principalmente em *C. lindemuthianum*. Este é um mecanismo que permite a troca de água, nutrientes, organelas, e até mesmo material genético dentro e entre espécies diferentes (READ et al., 2009). Por este processo pode ocorrer recombinação entre espécies diferentes de fungos, até mesmo entre espécies incompatíveis sexualmente (ISHIKAWA et al., 2010; MOTA et al., 2016).

No presente estudo, a temperatura se apresentou como um fator determinante na formação de CATs, nessas espécies, a temperatura ideal para a formação na maioria das linhagens avaliadas foi a de 17 °C. Esse resultado pode ser explicado, uma vez que a melhor

temperatura para o desenvolvimento da espécie é entre 17 e 25°C (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Já se sabe que outros fatores favorecem a formação de CATs em *Colletotrichum*, como a idade da colônia, densidade dos conídios, nutrientes (meio de cultura pobre: água) e longo tempo de incubação (após 48 horas) (ISHIKAWA et al., 2010a; ROCA; READ; WHEALS, 2005). No presente trabalho, a maior média considerando as três temperaturas foram observadas nas linhagens quando avaliadas no tempo de 48 horas. Houve uma redução na porcentagem de CATs a 30 °C para a maioria das linhagens, exceto para as linhagens 9A, 18-1 A e 19-2A para o tempo de 24 horas e para as linhagens 19-2A e 19-3B no tempo de 48 horas, onde foi observado um aumento da porcentagem de CATs à medida que se aumentou a temperatura. Foi observado também, para maioria das linhagens avaliadas, uma redução da formação de CATs em decorrência do aumento da porcentagem de germinação ou o contrário, o mesmo foi observado por Ishiawa et al. (2010a), exemplo, o comportamento da linhagem 18-1A, onde houve uma redução da porcentagem de germinação do tempo de 24 para 48 horas e um aumento da porcentagem de CATs formados nas mesmas condições. O estudo da influência da temperatura na formação de CATs vem sendo relatado também para outras espécies, como por exemplo, *Fusarium oxysporum* (KURIAN et al. 2018). Estes autores observaram que a produção de CATs para as temperaturas de 22, 25 e 35 °C foram similares, não havendo interferência deste fator na formação de CATs para esta espécie. No entanto, Mota (2017) observou redução na formação de CATs nas temperaturas de 22 °C e 24 °C em relação à temperatura de 20 °C para uma linhagem de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. Além disso, a autora observou que para *C. lindemuthianum* houve decréscimo a 22 °C e acréscimo a 24 °C. Comportamento semelhante pode ser observado para todas as linhagens testadas que amplificaram para pares de *primers* específicos para *C. lindemuthianum*, exceto para as linhagens 12-1D1, 19-1C, 19-3A, 19-3C e 19-4A.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que um complexo de espécies atua no feijoeiro comum e, assim, estudos de filogenia deveriam ser realizados, bem como a avaliação criteriosa dos sintomas.

6 CONCLUSÕES

Houve diferença entre as linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. quanto a sensibilidade aos diferentes fungicidas.

A temperatura influenciou todas as características avaliadas e para a maioria das linhagens de *Colletotrichum* spp. e *Glomerella* spp. a temperatura de 23 °C foi a mais adequada.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press. 2005. 922 p.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários, 2018**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588. v. 2.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 021-031, 2007.
- ARAUJO, N. A. F. et al. Pathogenicity and aggressiveness of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in ornamental pepper. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 46, n. 3, p. 321-326, Jul./Sep. 2016
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 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 of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.
- BARCELOS, Q. L. **Análise dos eventos de pré e pós penetração de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro**. Lavras: UFLA, 2010. 62 p.: il.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: CARNEIRO, J.E.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 9-15.
- BORÉM A; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005.
- BRENT, K. J. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed** Brussels: GIFAP, 1995. 48 p. (FRAC Monograph, n.1).
- CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H.F.; GÁLVEZ, G.E. **Problemas de production del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53.
- CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VI. Linkage. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, n. 3, p. 270-273, 1949.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. In: **A cultura do feijão**. OLIVEIRA NETO, A. A. de; SANTOS, C.M. R. (Orgs). Brasília: Conab, 2018.

COSTA, J. L. S. et al. **Quem causa sarna**. Pelotas: Cultivar, 2001. 8 p.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

DEAN, R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, London, v. 13, n. 4, p. 414-430, apr. 2012.

DENNER, F.D.N.; KOTZÉ J.M.; PUTTERILL J.F. The effect of temperature on spore germination, growth and appressorium formation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Dothiorella aromatica*. **South African Avocado Growers Association Yearbook**, v. 9 p. 19-22, 1986.

DIAS, M. A. et al. Characterization of *Colletotrichum* spp. strains from common bean anthracnose and scab lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 60, n. 1. 2017.

DIAS, M. A; SOUZA, E. A. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. E *Glomerella* spp.** 2017. 30 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

DIAS, M.D., POZZA, E.A., ABREU, M.S.; OROZCO MIRANDA, E.F. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 545-552, 2005.

EDGINGTON, L.V.; MARTIN, R.A.; BRUIN, G.C.; PARSONS, I.M. Systemic fungicides: a perspective after 10 years. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 19-23, 1980.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J.D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. In: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. Translational Genomics for Crop Breeding: **Biotic Stress**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2013. p. 151- 181. v. 1.

FISCHER, I.H.; SILVA, B.L.; SOARES, A.R.; ARRUDA, M.C.; PARISI, M.C.M.; AMORIM, L. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina**, Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, p. 2753-2766, 2012.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causadas por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, abr./jun. 2007.

GARCÍA-SERRANO, M. et al. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, v. 49, n. 5, p. 312-317, 2008.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GONÇALVES, A. E.; VELHO, A. C.; STADNIK, M. J. Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 3, p. 497-506, Apr. 2016.

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, MG, 2016.

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. 31175, Feb. 2012.

_____. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2-9, jan. 2010a.

_____. Symptoms and prepenetration 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. 2010b.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p. 382-385.

KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. **Agrotécnica**, n.1, p.5-7. 1987.

KURIAN, S.M., DI PIETRO, A. Read ND Live-cell imaging of conidial anastomosis tube fusion during colony initiation in *Fusarium oxysporum*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 2018.

MAIA, F.G.M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W.L.A.; MAIA, J.B.; ABREU, M.S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cultura do Feijão**. 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

MARINGONI, A. C.; BARROS E. M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, v, 28, n. 2, p. 197-200, 2002.

MAY-DE MIO, L.L. AMORIM, L. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar nos componentes monocíclicos da ferrugem do álamo. **Summa Phytopathologica**, v. p. 2833-40, 2002.

MCINTOSH, R. A.; WELLINGS, C. R.; PARK, R. F. **Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes**. Melbourne: CSIRO Publications, 1995.

MENAT, J. et al. *Glomerella truncata*: another *Glomerella* species with an atypical mating system. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 641–649, 2012.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum* Telemorfo: *Glomerella*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, n. 1, p. 170-179, Aug. 2006.

MOTA, S. F. **Proteína SOFT na formação de CATs em espécies de *Colletotrichum* do feijoeiro**. 2017. 57 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.

OLIVEIRA, S.H.F. de. Novos fungicidas e programas de pulverização para o controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 1, p. 45-48, 2003.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântula de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Lavras. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 1991.

PAULA JÚNIOR, T.J.; ZAMBOLIN L. **Doenças**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, R.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 415-436.

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

PINTO, J. M. A. **Variabilidade fenotípica de isolados sexuais e assexuais de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2012. 94 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

POLTRONIERI, T.P.S.; AZEVEDO, L.A.S.; SILVA, D.E.M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

R CORE TEAM (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria.

RAVA, C.A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 1, p. 65-69, 2002.

READ, N. D. et al. Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 608-615, Dec. 2009.

ROCA, M. M. G.; DAVIDE, C. L.; 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.

ROCA, M. N. G. et al. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 4, n. 5, p. 911-919, May. 2005.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 323-327, 2007.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 291 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP- Campus de Botucatu, 2006.

SARDHARA, M.J.; DAVARA, D.K.; MORADIA, A.M.; KAPADIYA, H.J. Effect of culture media and temperature on growth and sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* of urdbean in vitro. **Internat. J. Plant Protec.**, v. 9, n. 1, p. 47-51, 2016.

SARTORATO, A. Sensibilidade "in vitro" de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 211-213, set./dez. 2006. (Comunicação científica).

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. **Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum com aplicação de fungicidas pelo método convencional**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 9 f. (Relatório técnico).

SARTORATO, A. et al. Principais doenças transmitidas pela semente. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Ed.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2000. p. 147-199.

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1988. p. 457-477.

SINGH, S. P.; PASTOR-CORRALES, M. A.; MOLINA, A.; URREA, C.; CAJIAO, C. Independent, alternate, and simultaneous selection for resistance to anthracnose and angular leaf spot and effects on seed yield in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, Berlin, v. 106, p. 312-318, 1991.

SOUZA FILHO, R. C. et al. Sensitivity of *Colletotrichum lindemuthianum* from green beans to fungicides and race determination of isolates from State of Sao Paulo. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 2041-2047, 2015.

TAVARES, A. A. C.; PEREIRA, M. N.; TAVARES, M. R.; CHAVES, M. L. Performance of Holstein-Zebu cows under partial replacement of corn by coffee hulls. **Cientia Agricola**, v. 62, n. 2, p. 95-101, 2005.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDA, J. B.; VIDIGAL FILHO, P. S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 43, p. 82- 83, 2000.

TRUTMANN, P.; GRAF, W. The impact of pathogens and arthropod pests on common bean production in Rwanda. **International Journal of Pest Management**, Cambridge, v. 39, p. 328-333, 1993.

TU, J.C.; JARVIS, W.R. Response of *Colletotrichum lindemuthianum* to benomyl. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v. 1, p. 12-16, 1979 b.

VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L. C.; LIBERATO, J. R.; DIAS, A. P. S. Influência do clima no desenvolvimento de doenças de plantas. In: VALE, F. X. R. do; JESUS JUNIOR, W. C. de; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, 2004. cap. 2, p. 47-87.

VECHIATO, M.H.; LASCA, C.C.; KOHARA, E.Y.; CHIBA, S. Antracnose do feijoeiro: tratamento de sementes e correlação entre incidência em plantas e infecção de sementes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 83-87, 2001.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A (Ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 301-391.

APÊNDICES

Apêndice A- Quadro de análise de variância para as características IVCM, DC e taxa de esporulação.

FV	QM			
	GL	IVCM	DC	Esporulação
Linhagens (L)	29	0,03**	2,91**	1,89**
Fungicidas (F)	5	2,75**	241,9**	0,23**
L x F	145	0,02**	2,00**	0,19**
Erro	360	0,001	0,12	0,01
CV%		29,32	19,53	29,96

** significativo a 1%

Fonte: Da autora (2019).

Apêndice B - Estimativas das médias para o diâmetro colonial (mm) para as 30 linhagens avaliadas crescidas em meio utilizando fungicida e um controle sem fungicida.

Linhagem	1	2	3	4	5	Controle
2-1 A1	6,00 Cb	38,50 Ca	6,00 Bb	26,67 Ab	6,00 Bb	37,67 Da
9 A	7,16 Cd	11,83 Hc	12,83 Bc	6,00 Cb	6,00 Bd	55,67 Ba
12-1 D1	6,50 Cb	32,00 Ca	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	36,00 Da
13-1 C	6,00 Cc	15,67 Gb	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	55,83 Ba
13-1 A1	6,00 Cc	17,83 Fb	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	61,50 Aa
13-2 A	6,00 Cd	14,83 Gc	6,00 Bd	22,50 Ab	6,00 Bd	65,17 Aa
17-3 A	6,00 Cb	33,33 Ca	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	37,33 Da
17-3C	6,00 Cb	31,67 Ca	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	35,17 Da
17-3 D	6,00 Cc	30,17 Db	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	38,17 Da
18-1 A	6,00 Cb	69,00 Aa	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	67,50 Aa
19 A	6,00 Cd	32,50 Cb	21,17 Ac	6,00 Cd	6,00 Bd	63,33 Aa
19 B	6,00 Cd	57,00 Bb	17,67 Ac	6,00 Cd	6,00 Bd	63,17 Aa
19-1 A	6,00 Cb	36,83 Ca	8,33 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	37,17 Da
19-1 B	6,00 Cb	29,67 Da	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	33,33 Da
19-1 C	6,00 Cc	27,33 Db	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	33,00 Da
19-1 D	6,00 Cc	25,17 Db	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	30,83 Da
19-2 A	6,00 Cb	30,33 Da	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	34,67 Da
19-2 B	6,00 Cc	23,33 Eb	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	33,67 Da
19-2 C	6,00 Cc	25,67 Db	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	31,67 Da
19-3 A	6,00 Cc	26,17 Db	6,00 Bc	6,00 Cc	6,00 Bc	35,33 Da
19-3 B	7,16 Cc	33,00 Cb	11,17 Bc	9,83 Cc	6,00 Bc	39,50 Da
19-3 C	11,33 Cb	34,67 Ca	9,67 Bb	6,00 Cb	10,50 Bb	35,83 Da
19-4 A	6,50 Cc	32,83 Ca	10,00 Bc	16,00 Bb	6,00 Bc	37,83 Da
19-4 B	6,33 Cb	30,33 Da	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	33,67 Da
38-2 A	8,83 Cb	8,00 Hb	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	53,00 Ba
38-2 B	6,00 Cb	33,83 Ca	6,00 Bb	6,00 Cb	6,00 Bb	35,00 Da
38-3 A	23,66 Ab	17,50 Fb	6,50 Bc	6,00 Cc	18,83 Ab	63,50 Aa
40-2 A	8,33 Cb	65,83 Aa	6,00 Bb	6,65 Cb	7,17 Bb	68,33 Aa
51-2 A	17,16 Bb	21,83 Eb	23,50 Ab	6,00 Cc	6,83 Bc	59,33 Ba
52	6,66 Cc	23,67 Eb	6,00 Bc	6,00 Cc	6,17 Bc	48,17 Ca

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e, minúscula na linha, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fungicida 1- Piraclostrobina; Fungicida 2- Tiofanato Metílico; Fungicida 3- Clorotalonil; Fungicida 4- Mancozeb; Fungicida 5- Piraclostrobina + Metconazol

Fonte: Da autora (2019).

Apêndice C - Quadro de análise de variância individual para as características IVCM, DC e taxa de esporulação sob diferentes temperaturas.

FV		17°C	23°C	33°C	17°C	23°C	33°C	17°C	23°C	33°C
QM										
	GL	DC			IVCM			Esporulação		
Linhagem	29	1,63**	10,47**	17,10**	0,023**	0,156**	0,268**	1,714**	7,57**	2,501**
Erro	60	0,10	0,099	0,046	0,001	0,001	0,007	0,131	0,186	0,059
CV%		9,70	6,53	9,54	12,44	7,59	12,95	18,012	15,18	16,54

** significativo a 1%

Fonte: Da autora (2019).

Apêndice D - Quadro de análise de variância conjunta para as características IVCN, DC e taxa de esporulação sob diferentes temperaturas.

FV	QM			
	GL	DC	IVCN	Esporulação
Linhagens (L)	29	17,811**	0,289**	4,965**
Temperatura (T)	2	156,252**	2,073**	42,412**
L x T	58	5,697**	0,078**	3,411**
Erro	180	0,082	0,0012	0,125
CV%		8,309	1,014	10,29

Legenda: ** significativo a 1%

Fonte: Da autora (2019).

Apêndice E - Quadro de análise de variância para as características IVCN, DC e taxa de esporulação na alternância de temperatura e fotoperíodo.

FV	QM			
	GL	IVCN	DC	Esporulação
Linhagens (L)	29	0,19**	24,09**	0,45**
Erro	60	0,02	0,19	0,11
CV%		18,9	14,8	8,7

** significativo a 1%

Fonte: Da autora (2019).

Apêndice F- Estimativas das médias para o diâmetro colonial (mm) e índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) para as 30 linhagens avaliadas crescidas nas três temperaturas testadas.

Linhagem	DC(mm)								IVCM(mm/dia)									
	17°C		23°C		33°C				17°C		23°C		33°C					
2-1 A1	25,5	± 0,04	b	33	± 0,05	a	6	0	c	2,4	± 0,01	b	3,4	± 0,01	a	0	0	c
9 A	37,2	± 0,16	c	73,2	± 0,23	a	62,8	± 0,61	b	3,9	± 0,02	c	8,4	± 0,03	a	7,1	± 0,08	b
12-1D1	25,5	± 0,15	b	35,3	± 0,10	a	18	± 0,04	c	2,4	± 0,02	b	3,7	± 0,01	a	1,5	± 0,01	c
13-1 C	44,3	± 0,05	c	65,3	± 0,05	b	73	± 0,19	a	4,8	± 0,01	c	7,4	± 0,01	b	8,4	± 0,02	a
13-1A1	31,3	± 0,99	c	57,8	± 0,51	b	63,3	± 0,41	a	3,2	± 0,12	c	6,5	± 0,06	b	7,2	± 0,05	a
13-2 A	36	± 0,41	c	69,3	± 0,77	b	79,2	± 0,12	a	3,8	± 0,05	c	7,9	± 0,09	b	9,1	± 0,02	a
17-3 A	38,3	± 0,06	c	51,7	± 0,12	a	16,5	± 0,08	c	4	± 0,01	b	5,7	± 0,02	a	1,3	± 0,01	c
17-3C	27,5	± 0,12	a	31,2	± 0,13	a	19,7	± 0,09	b	2,7	± 0,02	a	3,1	± 0,02	a	1,7	± 0,01	b
17-3 D	25,5	± 0,32	b	35	± 0,14	a	28,2	± 0,06	b	2,4	± 0,04	b	3,6	± 0,02	a	2,8	± 0,01	b
18-1 A	42,7	± 0,17	b	75,7	± 0,25	a	80	0	a	4,6	± 0,02	b	8,7	± 0,03	a	9,3	0	a
19 A	24,8	± 0,16	b	73,3	± 0,24	a	30,3	± 0,12	c	2,4	± 0,02	c	8,4	± 0,03	a	3	± 0,02	b
19 B	36	± 0,48	b	74	± 0,33	a	32,7	± 0,41	b	3,8	± 0,06	b	8,5	± 0,04	a	3,3	± 0,05	b
19-1 A	28	± 0,04	a	30,7	± 0,38	a	17,3	± 0,08	b	2,8	± 0,01	a	3,1	± 0,05	a	1,4	± 0,01	b
19-1 B	25,7	± 0,05	b	31,3	± 0,12	a	18	± 0,15	c	2,5	± 0,01	b	3,2	± 0,02	a	1,5	± 0,02	c
19-1 C	27,2	± 0,02	a	30,5	± 0,04	a	17,3	± 0,13	b	2,6	± 0,01	a	3,1	± 0,01	a	1,4	± 0,02	b
19-1 D	26,8	± 0,02	b	36	± 0,15	a	5,7	± 0,02	c	2,3	0	b	3,3	± 0,02	a	0	0	c
19-2 A	26,2	± 0,06	b	32	± 0,15	a	6	0	c	2,2	± 0,01	b	2,9	± 0,02	a	0	0	c
19-2 B	27	± 0,07	b	32,3	± 0,31	a	6	0	c	2,3	± 0,01	b	2,9	± 0,03	c	0	0	c
19-2 C	27	± 0,04	a	30,5	± 0,04	a	7	± 0,04	b	2,3	± 0,01	a	2,7	± 0,01	a	0,1	± 0,01	b
19-3 A	29,3	± 0,09	a	31	0	a	7	± 0,08	b	2,6	± 0,01	a	2,8	0	a	0,1	± 0,01	b
19-3 B	29,2	± 0,22	b	36,7	± 0,24	a	6	0	c	2,6	± 0,03	b	3,4	± 0,03	a	0	0	c
19-3 C	27,2	± 0,17	b	34,2	± 0,35	a	6	0	c	2,4	± 0,02	b	3,1	± 0,04	a	0	0	c
19-4 A	27,2	± 0,06	b	36	± 0,07	a	5,8	± 0,02	c	2,4	± 0,01	B	3,3	± 0,01	a	0	0	c
19-4 B	26,7	± 0,12	a	29,7	± 0,12	a	6	0	b	2,3	± 0,01	a	2,6	± 0,01	a	0	0	b
38-2 A	40,7	± 0,21	b	76	± 0,2	a	6	0	c	3,9	± 0,02	b	7,8	± 0,02	a	0	0	c
38-2 B	41,2	± 0,31	b	75,2	± 0,06	a	6	0	c	3,9	± 0,03	b	7,7	± 0,01	a	0	0	c
38-3 A	49,8	± 0,21	b	74	± 0,45	a	8,7	± 0,08	c	4,9	± 0,02	b	7,6	± 0,05	a	0,3	± 0,01	c
40-2 A	39,3	± 0,08	b	70,8	± 0,19	a	13	± 0,07	c	3,7	± 0,01	b	7,2	± 0,02	a	0,8	± 0,01	c
51-2 A	46	± 0,25	b	52,2	± 0,10	a	14,8	± 0,22	c	4,4	± 0,03	b	5,1	± 0,01	a	1	± 0,03	c
52	29	± 0,07	b	41	± 0,08	a	5,8	± 0,02	c	2,6	± 0,01	b	3,9	± 0,01	a	0	0	c

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

Fonte: Da autora (2019).