



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose
em feijão-fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade
comparativa.**

Gerusa Rodrigues dos Santos Cavalcante

**Recife – PE
2018**

GERUSA RODRIGUES DOS SANTOS CAVALCANTE

Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em feijão-fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade comparativa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara PhD (UFRPE) - Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Coorientador

Prof^a. Dr^a. Beatriz Meireles Barguil (UESPI) – Coorientadora

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

C376e Cavalcante, Gersa Rodrigues dos Santos
Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em
feijão-
fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade comparativa /
Gersa
Rodrigues dos Santos Cavalcante. – 2018.
92 f. : il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Coorientador: Sami Jorge Michereff.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Antracnose 2. *Colletotrichum* 3. *Phaseolus lunatus*
4. Abordagem polifásica 5. Adaptabilidade I. Câmara, Marcos
Paz
Saraiva, orient. II. Michereff, Sami Jorge, coorient. III. Título

CDD 632

**Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em feijão-
fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade comparativa**

GERUSA RODRIGUES DOS SANTOS CAVALCANTE

Tese _____ e _____ pela Banca Examinadora em: ___ / ___ / ___

ORIENTADOR:

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara PhD (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Alexandre Reis Machado

Prof. Dr. Delson Laranjeira

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa Souza

Dr^a. Waléria Guerreiro Lima

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2018**

*“O Senhor dos exércitos está conosco; o **Deus** de Jacó é o nosso refúgio.” Sl. 44:9*

*“Eis que a virgem concederá e dará à luz um **filho**, o qual será chamado EMANUEL, que traduzido é Deus conosco.” Mt. 1:23*

*“E eu rogarei ao Pai, e ele vos dará outro consolador, para que fique convosco para sempre, o **Espírito** da verdade, que o mundo não pode receber, porque não vê e não o conhece; mas vós os conheceis, porque habita convosco e está em vós.” João, 14:16-17.*

*Aos meus pais Felismina e Raimundo e ao meu esposo Mauro pelo apoio e incentivo.
Ao Deus Todo Poderoso por estar comigo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo ao longo dessa caminhada, a Jesus Cristo por ser meu amigo fiel e verdadeiro e ao Espírito Santo pela guia;

À minha mãe Felismina e ao meu Pai Raimundo pela dedicação e apoio;

Ao meu esposo Mauro pelo apoio, incentivo e por me ajudar na montagem de experimentos;

Aos meus orientadores Prof. Marcos Câmara e Prof. Sami Michereff pela orientação e por acreditarem em mim;

À Profa. Beatriz Barguil por ter me orientado em Teresina e pelas vezes que me ajudou na montagem dos experimentos;

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos;

À Universidade Federal do Piauí na pessoa do Prof. Evando Beserra Júnior pelo apoio para realização dos experimentos no laboratório de Fitopatologia;

À Ridesa-UFPI na pessoa do Prof. Francisco Alcântara por ceder o espaço para realização dos experimentos de patogenicidade;

Aos membros do Laboratório de Micologia da UFRPE em especial à Waléria Guerreiro e Willie Anderson pela contribuição direta no trabalho;

Aos alunos da Universidade Estadual do Piauí que me ajudaram na montagem de experimentos;

Aos membros do Laboratório de Fitopatologia da UFPI em especial à funcionária Antônia da Cruz (Toinha) pela amizade e companhia;

A todos os meus amigos da minha turma de doutorado pelos desafios e momentos que passamos juntos;

A todos os meus amigos que me ajudaram enquanto estive em Recife e que me trataram como uma pessoa da família, amigos de várias regiões do Brasil que apesar da saudade de casa e de todas as dificuldades juntaram forças e cuidaram uns dos outros, em especial a minha grande amiga Lusiene Barbosa pela estadia, amizade e companhia.

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista.

SUMÁRIO

	pág.
AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	v
RESUMO GERAL.....	vi
GENERAL ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO I - Introdução Geral.....	8
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II - Diversity, prevalence and virulence of <i>Colletotrichum</i> species associated with lima bean in Brazil.	24
Abstract.....	26
Introduction.....	26
Material and methods.....	28
Results.....	33
Discussion.....	37
References.....	40
CAPÍTULO III – First report of anthracnose caused by <i>Colletotrichum sichuanensis</i> on <i>Phaseolus lunatus</i> in Brasil.....	59
CAPÍTULO IV - Adaptabilidade comparativa de espécies de <i>Colletotrichum</i> causadoras de antracnose em feijão-fava no Brasil.....	61
Resumo.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	66
Resultados.....	72
Discussão.....	76
Referências.....	79
CAPÍTULO V – Conclusões Gerais.....	91

RESUMO GERAL

O feijão-fava é a segunda espécie mais plantada do gênero *Phaseolus*, é considerada uma cultura de grande importância econômica e social para os pequenos produtores no Brasil. Apesar da sua rusticidade o feijão-fava sofre com doenças, sendo a antracnose uma das mais importante para a cultura. A diversidade, a prevalência, a virulência e a adaptabilidade das espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em feijão-fava era desconhecida antes do presente estudo. As espécies *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. sichuanensis* e uma espécie nova *Colletotrichum* sp são aqui relatadas em associação com a antracnose em feijão-fava. Todas as espécies foram patogênicas, no entanto *C. truncatum* é a espécie prevalente e a mais virulenta que as demais espécies. Estamos aqui propondo sinonimizar *C. liaonigense* com *C. brevisporum*. Com o registro de diversas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em feijão-fava foi investigado a diferença de adaptabilidade saprofítica e patogênica das espécies utilizando componentes de adaptabilidade. Esses componentes foram significativamente influenciados pela temperatura. As temperaturas ótimas para crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios foram diferentes entre as espécies. *C. truncatum* evidenciou maior agressividade quando comparado a *C. brevisporum* em folhas destacadas de feijão-fava, e a combinação de 30°C com 36 horas de molhamento foliar foi a mais adequada para a expressão da máxima agressividade. Plantas inoculadas com *C. truncatum* apresentaram menor período de incubação e maior severidade da doença. *C. truncatum* possui menor adaptabilidade saprofítica mas possui grande adaptabilidade patogênica. A diversidade, a virulência e as diferenças na adaptabilidade das espécies de *Colletotrichum* devem ser consideradas no desenvolvimento de estratégias de manejo da antracnose em feijão-fava.

Palavras-chaves: antracnose, *Phaseolus lunatus*, abordagem polifásica, adaptabilidade.

GENERAL ABSTRACT

Lima bean is the second most planted species of the genus *Phaseolus*, is considered a culture of great economic and social importance for the small producers in Brazil. Despite its rusticity the fava beans suffer from diseases, with anthracnose being one of the most important for the crop. The diversity, prevalence, virulence and adaptability of *Colletotrichum* species associated with anthracnose in fava beans were unknown prior to the present study. The species *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. sichuanensis* and a new species *Colletotrichum* sp are reported here in association with anthracnose in fava beans. All species were pathogenic, *C. truncatum* is the most prevalent species and the most virulent species. We are here proposing to synonymize *C. liaonigense* with *C. brevisporum*. With the registration of several *Colletotrichum* species associated with anthracnose in fava beans, the difference in saprophytic and pathogenic adaptability of the species was investigated using adaptive components. These components were significantly influenced by temperature. The optimal temperatures for mycelial growth, sporulation, spore germination and appressory formation were different among species. *C. truncatum* showed greater aggressiveness when compared to *C. brevisporum* on leafy bean leaves, and the combination of 30°C and 36 hours of leaf wetting was the most adequate for the expression of maximum aggressiveness. Plants inoculated with *C. truncatum* had a shorter incubation period and a higher disease severity. *C. truncatum* has lower saprophytic adaptability but has great pathogenic adaptability. Diversity, virulence, and differences in the adaptability of *Colletotrichum* species should be considered in the development of management strategies for anthracnose in fava beans.

Key words: anthracnose, *Phaseolus lunatus*, polyphasic approach, adaptability.

Capítulo I

Introdução Geral

Espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em feijão-fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade comparativa

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do feijão-fava

A família Fabaceae com 18.000 espécies e 643 gêneros, tem ampla distribuição mundial, mas se concentra nas regiões tropicais e subtropicais (BROUGHTON et al, 2003). O gênero *Phaseolus* pertence à essa família e possui 50 espécies, todas originárias do continente americano, sendo somente cinco cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (DEBOUCK, 1991).

A espécie *P. lunatus*, também conhecida como feijão-fava, fava-belém ou fava, tem distribuição em várias regiões do mundo, como América Latina, América do Norte e África, sendo o centro de origem e distribuição a América Central, na Guatemala é possível encontrar o feijão-fava selvagem (MACKIE, 1943). O feijão-fava é uma das principais leguminosas fonte de proteína em muitas partes no mundo (MOSES; OLAWUNI; JO, 2012). Na Califórnia, o feijão-fava representa uma parcela significativa do total da área de produção de feijão seco, chegando bem próximo ao feijão-comum. É considerado como uma excelente fonte de proteína, fibras, vitaminas e minerais, e é também utilizado pelos produtores em rotação de culturas, pois as plantas fixam nitrogênio, adicionam biomassa ao solo e requerem relativamente poucos pesticidas (LONG et al., 2014).

No Brasil, o cultivo de feijão-fava se concentra principalmente na região Nordeste, que é responsável por 99% da produção nacional (IBGE, 2016). Em 2016, essa região apresentou uma área plantada de 20.196 ha e uma produção de 3.609 t. Os estados da Paraíba, Ceará e Pernambuco destacam-se como principais produtores dessa

leguminosa (IBGE, 2016), que apresenta grande potencial para fornecer proteína vegetal à população, constituindo uma fonte alternativa de alimento e de renda complementar para os pequenos agricultores (SOARES et al., 2010). Devido à sua rusticidade, possibilita o prolongamento da colheita em períodos secos em regiões semiáridas, embora se comporte melhor em climas quentes e úmidos (GUIMARÃES et al., 2007).

O feijão-fava possui hábito de crescimento do tipo ereto, trepadeiro ou rasteiro. A germinação é epigea e as vagens são compridas, achatadas, curvas, coriáceas, pontiagudas, de coloração bege quando secas, contendo duas a quatro sementes com grande variação de tamanho e cor do tegumento (SANTOS et al., 2002). No Brasil, há a predominância de cultivares de feijão-fava com hábito de crescimento indeterminado, porte trepador, com ciclo biológico tardio e maturação desuniforme, o que condiciona a uma colheita manual e parcelada (VIEIRA et al., 1992). No Nordeste brasileiro predominam os plantios de sequeiro, com a semeadura realizada no início do período chuvoso, embora a espécie adapta-se bem à distribuição irregular das chuvas, comum na região. Os produtores utilizam como suporte para a fava as cercas ou outras culturas como milho, mamona ou mandioca. A época de colheita é bem distribuída, ocorrendo de março a junho em alguns locais, sendo julho, agosto e setembro os meses nos quais ocorrem a colheita na maioria das áreas, evidenciando a predominância de cultivares de ciclo tardio (SILVA et al., 2010). O sistema de plantio consorciado é a forma mais adotada pelos agricultores, sendo o feijão-fava plantado próximo de árvores ou nas margens de roças (SANTOS et al., 2002).

A ocorrência de doenças tem dificultado o cultivo de feijão-fava e afetando principalmente a qualidade dos grãos, resultando em sérios prejuízos aos produtores. Dentre as doenças que ocorrem nesta cultura destacam-se as viroses e as causadas por

fungos como as podridões de raiz e do colo, a ferrugem e a antracnose (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO, 2010).

A antracnose em feijão-fava

O feijão-fava apresenta grande adaptação às condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro, mas tem sua produtividade reduzida devido à ocorrência da antracnose (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO, 2010; PAULA JÚNIOR; SILVA; VIEIRA, 1995; VIEIRA et al., 1992). Os sintomas da antracnose em feijão-fava são manchas avermelhadas, inicialmente observadas ao longo das nervuras, na face inferior das folhas e sobre hastes e pecíolos jovens. Nas vagens, as lesões são deprimidas, grandes e avermelhadas, sobre as quais se formam os acérvulos do patógeno, com aspecto de uma massa esbranquiçada, de onde saem numerosas setas (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO, 2010; PAULA JÚNIOR; SILVA; VIEIRA, 1995). Lesões avermelhadas e necrosadas também podem ser observadas no hipocótilo, pecíolos e na superfície foliar, resultando em folhas encarquilhadas e plantas subdesenvolvidas (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO, 2010).

A antracnose do feijão-fava foi atribuída exclusivamente ao fungo *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore no Brasil (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO 2010; CARVALHO, 2009; CAVALCANTE et al., 2012; PAULA JÚNIOR; SILVA; VIEIRA, 1995) e no exterior (ANDRUS; MOORE 1935; DAMM et al., 2009), no entanto, já foi encontrado *C. fructicola*, *C. cliviae* e *C. sichuanensis* em associação a antracnose em feijão-fava no Brasil (CAVALCANTE et al., 2018; SOUSA et al., 2017).

O gênero *Colletotrichum* foi associado à antracnose em feijão-fava por Andrus e Moore (1935), que encontraram a espécie *C. truncatum* em vagens nos Estados Unidos

da América. No Brasil, o primeiro relato da antracnose em feijão-fava foi realizado por Paula Júnior; Silva e Vieira (1995), que atribuíram à causa ao fungo *Colletotrichum dematium* f. sp. *truncatum* W.Z. Nik & T.K. Lim. (sinonímia de *C. truncatum*). Baseado em características morfológicas e culturais dos isolados, Carvalho (2009) reafirmou que o agente causal da antracnose em feijão-fava era *C. truncatum*. Além de feijão-fava, essa espécie tem sido associada à antracnose em outras 122 espécies de plantas, com destaque para as leguminosas (FARR; ROSSMAN, 2015).

A penetração de *Colletotrichum* na planta hospedeira ocorre por aberturas naturais, por ferimentos ou ativamente através de estruturas especializadas, denominadas apressórios (AGRIOS, 2005). Os processos de colonização e patogênese são bem caracterizados para diversas espécies de *Colletotrichum*, dentre eles *C. truncatum* (O'CONNELL et al., 2000). Os passos iniciais da infecção do hospedeiro incluem a adesão do conídio ao tecido hospedeiro, germinação do conídio e formação do apressório, culminando com a penetração via apressório. O passo seguinte consiste na invasão do tecido do hospedeiro e sua consequente colonização. A estratégia utilizada por *C. truncatum* consiste na invasão do tecido através da cutícula e da parede periclinal das células da epiderme, resultando em necrose (MANANDHAR et al., 1985). Outras espécies de *Colletotrichum* utilizam outra estratégia: invasão hemibiotrófica intracelular, na qual desenvolve estruturas especializadas para penetrar no hospedeiro, como o apressório, e estruturas especializadas para obter alimento a partir do lúmen celular, por meio de uma vesícula de infecção, sem danificar a membrana plasmática da célula (ARROYO et al., 2005).

Para o controle da antracnose em feijão-fava tem sido recomendado o emprego de práticas culturais como a rotação de culturas com gramíneas, resistência, uso de

sementes sadias e aplicação de fungicidas (CARVALHO; CENTURION; CARVALHO, 2010).

Caracterização do gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella* Spauld. & H. Schrenk.) foi descrito por Corda que forneceu desenhos de *C. lineola* Corda in Sturm em haste de hospedeiro da família Apiaceae encontrado na República Checa. É um Ascomiceto (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hipocreomycetidae, Glomerellales, Glomerellaceae) onde o gênero compreende várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas. São caracterizados por apresentar micélio imerso, ramificado, septado, hialino, marrom pálido ou marrom escuro. Conídios hialinos, não septados (exceto no início da germinação), retos ou falcados, lisos, com parede fina, às vezes gutulados, não aristados ou com o ápice prolongado em um simples apêndice celular. Apressórios marrons, com margens contínuas ou irregulares, simples ou germinando repetidamente para formar colunas complexas de vários apressórios conectados (SUTTON, 1980).

Espécies do gênero *Colletotrichum* são agentes causais da antracnose em folhas, hastes e frutos de numerosas espécies vegetais, incluindo culturas importantes. Estão entre os fitopatógenos de maior importância em todo o mundo, pois possuem uma ampla gama de hospedeiros incluindo cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças, culturas perenes e árvores frutíferas (CAI et al., 2009; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009; DEAN et al., 2012; HYDE et al., 2014; KIM et al., 2009; RATANACHERDCHAI et al., 2010).

Por muito tempo, os critérios para a descrição de uma espécie para o gênero *Colletotrichum* foram forma e tamanho dos conídios e apressórios, presença, ausência e morfologia das setas. Outros critérios complementares foram incluídos posteriormente, como a gama de hospedeiros e o tipo de dano causado (VON ARX 1957, SUTTON

1980, 1992). Em 1957 Von Arx relatou 11 espécies de *Colletotrichum* que aumentou para 40 com base na especificidade do hospedeiro (SUTTON, 1992). A utilização desses critérios clássicos levou a uma grande dificuldade na sistemática de *Colletotrichum* devido à plasticidade dos caracteres morfológicos, que podem variar conforme os métodos e condições experimentais, gerando sobreposições entre as espécies (CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009; HYDE et al., 2009).

Com o avanço da biologia molecular, novas ferramentas foram fornecidas para a identificação e taxonomia de fungos por meio da utilização de caracteres moleculares. O critério de reconhecimento de espécies leva em consideração a divergência molecular entre linhagens intimamente relacionadas com base em dados de sequência de DNA, que podem ser analisados estatisticamente para inferir relações filogenéticas (CAI et al., 2009; SHENOY; JEEWON; HYDE, 2007; SHARMA; SHENOY, 2016). O espaço transcrito interno (ITS) é a região genômica mais amplamente sequenciada nos estudos com o gênero *Colletotrichum*, mas não permite a distinção das espécies com precisão (CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2009; HYDE et al., 2014; PHOULIVONG, 2011). Há uma grande desvantagem na dependência de somente uma pequena porção do genoma para compreender relações filogenéticas entre isolados de *Colletotrichum* devido ao risco de recriar árvores de genes em vez de árvores de espécies (CAI et al., 2009; CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009; DAMM et al., 2009). Como exemplo, a utilização da região ITS para diferenciação de espécies dentro do complexo *C. graminicola* (Ces.) G.W. Wilson levou a uma frequência de erros de identificação de 86% em estudo de similaridade de sequências dentro do complexo (CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009).

Como os genes individualmente não são eficientes para diferenciar as espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, foi sugerido o uso de múltiplos marcadores (CAI et al. 2009). A filogenia multigênica é uma maneira precisa e confiável para o diagnóstico de espécies de *Colletotrichum* e várias regiões do genoma vêm sendo analisadas em conjunto com a região ITS, entre as quais a β -tubulina (TUB2), Fator de alongação 1- α (EF1- α), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), Quitina sintetase (CHS), Histona (HIS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Apn2 e Mat1-2 (ApMat) (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2013; HYDE et al., 2014; PRIHASTUTI et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

O rápido progresso dos métodos de filogenia molecular tornou possível reconhecer clados estáveis e bem desenvolvidos do gênero *Colletotrichum*. Portanto, é recomendada uma abordagem polifásica baseada na análise da sequência de um conjunto de múltiplos *loci*, juntamente com dados morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade, para a identificação precisa das espécies do gênero (CAI et al., 2009). Atualmente há cerca de 150 espécies de *Colletotrichum* aceitas em todo o mundo (SHARMA; SHENOY, 2016).

Em estudo envolvendo espécies de *Colletotrichum* de conídios falcados e a utilização de filogenia multilocus das regiões ITS, GAPDH, ACT, CHS, HIS e TUB2 (DAMM et al., 2009) foi concluído que um dos genes que tem maior capacidade em separar os grupos (variabilidade inter-específica) foi o GAPDH, sendo considerado bom candidato para identificação de espécies. Esse mesmo estudo concluiu que os dois isolados obtidos de feijão-fava eram da espécie *C. truncatum*, que pertencia ao complexo *truncatum*, juntamente com duas outras espécies: *C. curcumae* (Syd.) E.J. Butler & Bisby e *C. jasmiginenum* (Allescher) Damm, P.F. Cannon & Crous. Outros fungos de esporos curvados estão nos clados *dematium*, com as espécies *C. dematium*

(Pers.) Grove, *C. lineola* P.F. Cannon & Crous, *C. fructi* (F. Stevens & J.G. Hall) Sacc, *C. anthrisci* Damm, *C. circinans* (Berk.) Voglino, *C. phaseolorum* S. Takim e *C. spinaciae* Ellis & Halst. e o clado *spaethianum* com as espécies *C. spaethianum* (Allesch.) Damm, *C. liriopes* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. lilii* Plakidas ex Boerema & Hamers, *C. verruculosum* Damm, P.F. Cannon & Crous e *C. tofieldiae* (Pat.) Damm, P.F. Cannon & Crous. Existem ainda fungos de esporo falcado que não pertencem a nenhum complexo são eles: *C. chlorophyti* S. Chandra & Tandon, *C. rusci* Damm e *C. trichellum* (Fr.) Duke (CANNON et al., 2012).

Outro grupo de *Colletotrichum* causador de antracnose em leguminosas, mas não particularmente em feijão-fava, pertence ao complexo *destructivum*, constituído pelas espécies: *C. americanae-borealis* Damm, *C. antirrhinicola* Damm, *C. bryoniicola* Damm, *C. destructivum* O'Gara, *C. fuscum* Laubert, *C. higginsianum* Sacc., *C. lentis* Damm, *C. lini* (Westerd.) Tochinai, *C. ocimi* Damm, *C. panacicola* Uyeda & S. Takim., *C. pisicola* Damm, *C. tabacum* Böning, *C. tanaceti* M. Barimani et al., *C. utrechtense* Damm e *C. vignae* Damm) (DAMM et al., 2014).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* é fundamental para compreender a epidemiologia e desenvolver estratégias eficazes de manejo das doenças (PHOULIVONG, 2011). Portanto, há necessidade da utilização de isolados de *Colletotrichum* obtidos de diferentes polos de produção de feijão-fava no Brasil e o sequenciamento de várias regiões genômicas para determinar com precisão as espécies prevalentes.

Adaptabilidade comparativa de fitopatógenos

Para sobreviverem os fitopatógenos precisam se adaptar, aumentando a virulência e a patogenidade em relação aos seus hospedeiros e ser resistente ou tolerante

ao ambiente e as estratégias de controle empregadas (BALODI et al., 2017). Portanto, a adaptabilidade biológica de um patógeno de planta é descrita como a habilidade competitiva de um organismo para persistir em um ambiente por um longo período de tempo, comparado a outros indivíduos nas mesmas condições, sendo, dessa forma, um conceito comparativo (NELSON, 1979). Essa aptidão biológica ou ecológica está relacionada à habilidade dos patógenos de plantas em sobreviver, se desenvolver e reproduzir somando-se a isso, a combinação de características patogênicas, como agressividade e eficiência na infecção (GHINI; KIMATI, 2002; LEACH et al., 2001).

Indivíduos com maior aptidão física têm a maior capacidade de deixar descendentes com maior capacidade competitiva (LANNOU, 2012). Um fungo com maior adaptabilidade pode substituir "espécies existentes" do patógeno através da exclusão competitiva, essa característica está atrelada, por exemplo, à maior capacidade de colonizar, a adaptação ao estresse biótico e abiótico no ambiente, esses fatores podem desempenhar um papel importante no aumento da aptidão dos fitopatógenos (BALODI et al., 2017).

A adaptabilidade de uma população de patógenos de plantas pode ser determinada por sua capacidade de sobrevivência, reprodução, agressividade e eficiência na infecção (BRASIER, 1999; LEACH et al., 2001). Essa adaptabilidade relativa pode ser inferida indiretamente por componentes de adaptabilidade como a taxa crescimento micelial, potencial reprodutivo, sensibilidade a fungicidas e virulência, esses componentes têm sido úteis para avaliar a adaptabilidade em patógenos das plantas (LANNOU, 2012; PRINGLE; TAYLOR, 2002).

O crescimento micelial e a produção de esporos são denominados componentes que avaliam a aptidão saprofítica de fungos fitopatogênicos (HARTEVELD et al., 2014). A taxa de crescimento micelial sustenta toda a atividade fúngica desde a

germinação de esporos até a formação de corpos de frutificação. Além disso, é extremamente sensível a variações do ambiente externo, sujeita a seleção e às vezes pode ser correlacionada com outros atributos como agressividade patogênica (BRASIER, 1999). A reprodução também pode indicar maior adaptabilidade, pois, indivíduos com reprodução precoce pode ter maior aptidão do que indivíduos de reprodução tardia, esse último pode ser superado pelo habitat por se desenvolver lentamente (PRINGE; TAYLOR, 2002).

Fatores quantitativos da interação patógeno-hospedeiro como a eficiência de infecção, período latente, período infeccioso, tamanho da lesão e para alguns agentes fitopatogênicos a produção de toxinas, podem ser também estudados para avaliação de atributos do patógeno (LANNOU, 2012).

A adaptabilidade de uma espécie é uma consequência das alterações sofridas pelo fungo para adquirir uma característica vantajosa para viver no ambiente (GHINI; KIMATI, 2002). Essas alterações são influenciadas pelo ambiente e pelo hospedeiro, que podem alterar linearmente a condição física do patógeno (LANNOU, 2012).

As condições de estresse impostas pelo ambiente, como o aumento da temperatura, podem influenciar no potencial evolutivo e na capacidade de adaptação dos fitopatógenos. A capacidade dos organismos em se adaptar a modificações do ambiente é resultado da interação de diversos fatores evolutivos e está relacionada com o nível de diversidade genética de suas populações (MCDONALD; LINDE, 2002; GUNTER et al., 2000).

A temperatura pode influenciar no crescimento micelial, esporulação, germinação de conídios e coloração das colônias, podendo ser utilizada como parâmetro para caracterizar a capacidade adaptativa de espécies de patógenos a condições de estresse térmico (POLTRONIERI; AZEVEDO; SILVA, 2013; FERRO, 2012).

Há grande variação na temperatura ótima para o desenvolvimento de *Colletotrichum*, para a maioria das espécies a temperatura ideal para o crescimento vegetativo, germinação e produção de conídios está entre a faixa de 25° a 30°C (SUTTON, 1992). Entretanto, Maia et al. (2011) verificaram que fungos associados com antracnose em mangueira apresentaram melhor desenvolvimento a 20° e 25°C, já germinação e produção de conídios entre as temperaturas de 25° e 30°C. Outras espécies podem se desenvolver melhor em temperaturas mais elevadas, como isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* causadores de antracnose em solanáceas que tiveram melhor crescimento na faixa de 25° e 28°C (TOZZE JÚNIOR, 2006). Isolados de *C. truncatum* causadores de antracnose em feijão-fava apresentaram o maior diâmetro de colônia nas temperaturas 26° e 28°C e produção de conídios nas faixas entre 26° e 30°C (CARVALHO, 2009).

Com o registro de diversas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do feijão-fava, é importante investigar se existe diferença entre estas quanto à adaptabilidade. Até o momento, inexistem em nível mundial estudos sobre a adaptabilidade comparativa de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em feijão-fava.

Nesse contexto, objetivou-se nesse estudo caracterizar a diversidade, prevalência e virulência das espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose em feijão-fava no nordeste brasileiro e ainda investigar a adaptabilidade das espécies comparando (i) o crescimento, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios de quatro espécies de *Colletotrichum* sob a influência da temperatura, (ii) a agressividade de duas espécies de *Colletotrichum* em folhas destacadas feijão-fava sob a influência da temperatura e do período de molhamento, e (iii) os componentes epidemiológicos da antracnose em plantas de feijão-fava induzida por quatro espécies de *Colletotrichum*.

Referências

- AGRIOS, G. N. Plant disease caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Elsevier, 2005. p. 385-614.
- ANDRUS, C.F.; MOORE, W.D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. **Phytopathology**, St. Paul, v. 25, p. 121-125, 1935.
- ARROYO, F. T.; MORENO, J.; GARCÍA-HERDUGO, G.; DE LOS SANTOS, B.; BARRAU, C.; PORRAS, M.; BLANCO, C.; ROMERO, F. Ultrastructure of the early stages of *Colletotrichum acutatum* infection of strawberry tissues. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 83, p. 491-500, 2005.
- BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 88-120.
- BALODI, R.; GHATAK, L. V.; BISHT, S.; SHUKLA, N. Reproductive fitness of fungal phytopathogens: deriving co-evolution of host-pathogen systems. In: GHATAK, A.; ANSAR, M. **The phytopathogen: evolution and adaptation**. New Jersey: Apple Academic Press, 2017. p. 41-64.
- BRASIER, C. M. Fitness, continuous variation and selection in fungal populations: an ecological perspective. In: WORRALL, J. J. (Ed.). **Structure and dynamics of fungal populations**, New York: Springer, 1999. p. 307-339.
- BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 55-128, 2003.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 1-19.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 181-213, 2012.
- CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009. 53f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.
- CARVALHO, E. M. S.; CENTURION, M. A. P. C.; CARVALHO, P. R. S. Doenças. In: LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAÚJO, A. S. F. (Orgs.). **A cultura do feijão-fava no Meio Norte do Brasil**. Teresina: EDUFPI, 2010. p. 191-205.
- CAVALCANTE, G. R. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; SANTOS, A. R. B.; SANTOS, C. M. P. M. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, p. 329-333, 2012.
- CAVALCANTE, G. R. S.; VIEIRA, W. A. S.; MICHEREFF, S. J.; BARGUIL, B. M.; DOYLE, V. P.; CAMARA, M. P. S. First Report of anthracnose caused by *Colletotrichum sichuanensis* on *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 3, p. 680, 2018.
- CROUCH, J. A., CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, London, v. 101, p. 648-656, 2009.

- DAMM, U.; O'CONNELL, R. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2014.
- DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 45-87, 2009.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F.; BARRETO, R. W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p. 29-59, 2013.
- DEAN, R.; KAN, J. A. L. V.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, E.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, New Jersey, v. 13, p. 414-430, 2012.
- DEBOUCK, D. G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. Van; VOYSEST, O. (Eds.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p. 55-118.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases: fungus-host distributions** [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2015. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 18 jan. 2015.
- FERRO, C. G. **Variação genética e adaptabilidade evolutiva de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja sob condições de estresse**. 2012. 30f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Genético e melhoramento de plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2012.
- GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F.; FERRAZ, G. M. G.; OLIVEIRA, F. J. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, p. 37-45, 2007.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2. ed. Jaguariúna: EMBRAPA-CPMA, 2002. 78p.
- GUNTER, L. E.; TUSKAN, G. A.; GUNDERSON, C. A.; NORBY, R. J. Genetic variation and spatial structure in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and implications for predicted global-scale environmental change. **Global Change Biology**, New Jersey, v. 6, p. 335-344, 2000.
- HARTEVELD, O. C., AKINSANMI, O. A., BECKER, M. A., & DRENTH, A. Comparative fitness of *Alternaria* species causing leaf blotch and fruit spot of apple in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 43, p. 495-450, 2014.
- HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.
- HYDE, K. D.; NILSSON, R. H.; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; COCK, A. W. A. M.; DISSANAYAKE, A. J.; GLOCKLING, S. L.; GOONASEKARA, I. D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R. S.; VAN KAN, J. A. L.; LAURENCE, M. H.; LÉVESQUE, C. A.; LI, X.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MANAMGODA, D. S.; MARTIN, F. N.; MCKENZIE, E. H. C.; MCTAGGART, A. R.; MORTIMER, P. E.; NAIR, P. V. R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T. L.; SHIVAS, R. G.; SPIES, C. F. J.; SUMMERELL, B. A.; TAYLOR, P. W. J.; TERHEM, R. B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J. C.; YAN, J.; ZHOU, N. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, p. 21-125, 2014.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção Agrícola 2016**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

KIM, H.; LIM, T. H.; KIM, J.; KIM, Y. H.; KIM, H. T. Potential of cross-infection of *Colletotrichum* species causing anthracnose in persimmon and pepper. **Plant Pathology Journal**, Pisa, v. 25, p. 13-20, 2009.

LANNOU, C. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 319-338, 2012.

LEACH, J. E.; CRUZ, C. M. V.; BAI, J. F.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 187-224, 2001.

LONG, R.; TEMPLES, S.; MEYER, R.; SCHWANKL, L.; ODFREY, L.; CANEVARI, M.; ROBERTS, P. **Lima bean production in California**. Richmond: University of California - ANR, 2014. 24 p.

MACKIE, W. Origin, dispersal and variability of the lima bean, *Phaseolus lunatus*. **Hilgardia**, Davis, v. 15, p. 1-29, 1943.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; MAIA, J. B.; AABREU, 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, p. 205-210, 2011.

MANANDHAR, J. B.; KUNWAR, I. K.; SINGH, T.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p. 704, 1985.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

MOSES, O.; OLAWUNI, I.; JO, I. The proximate composition and functional properties of full-fat flour and protein isolate of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Open Access Scientific Reports**, Novi Sad, v. 1, p. 1-5, 2012.

NELSON, R. R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Eds.). **Plant disease: an advanced treatise**. v. 4: How pathogens induce disease. New York: Academic Press, 1979. p. 23-46.

O'CONNELL, R.J.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J. A.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. (Eds). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St. Paul: APS Press, 2000. p. 57-77.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, p. 63-71, 1995.

PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, Chiang Rai, v. 1, p. 53-73, 2011.

POLTRONIERI, T. P. S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Effect of temperature on mycelial growth and conidial production and germination for *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from juçara palm fruits (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 39, p. 281-285, 2013.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 89-109, 2009.

- PRINGLE, A.; TAYLOR, J. W. The fitness of filamentous fungi. **Trends in Microbiology**, New York, v. 10, p. 475-481, 2002.
- RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research**, Berlin, v. 4, p. 76-83, 2010.
- SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no estado da Paraíba. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 1407-1412, 2002.
- SHARMA, G.; KUMAR, N.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D. ApMat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p. 117-138, 2013.
- SHARMA, G.; SHENOY, B. D. *Colletotrichum* systematics: past, present and prospects. **Mycosphere**, Guiyang, v. 7, p. 1093-1102, 2016.
- SHENOY, B. D.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 26, p. 1-54, 2007.
- SILVA, K. J. D.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; SOUSA, F. M.; ROCHA, M. M. Recursos genéticos. In: LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAÚJO, A. S. F. (Orgs.). **A cultura do feijão-fava no Meio Norte do Brasil**. Teresina: EDUFPI, 2010. p.9-44.
- SOARES, C. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; GÂNDARA, F. C. Aspectos sócio-econômicos. In: LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAÚJO, A. S. F. (Orgs.). **A cultura do feijão-fava no Meio Norte do Brasil**. Teresina: EDUFPI, 2010. p. 237-268.
- SOUSA, S. S.; SILVA, R. A. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; MELO, P. M.; FEIJÓ, F. M., MATOS, K. S.; LIMA, G. S. A.; BESERRA Jr, E. A. B. 2017. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, p. 329-333, 2017.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 1-26.
- TOZZE JÚNIOR, H.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 32, p. 71-79, 2006.
- VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, p. 30-37, 1992.
- VON ARX, J. A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. **Naturkunde**, Berlin, v. 51, p. 1-153, 1957.

Capítulo II

Diversity, prevalence and virulence of *Colletotrichum* species associated with lima bean in Brazil.

Plant Disease

1 **Diversity, prevalence and virulence of *Colletotrichum* species**
2 **associated with lima bean in Brazil.**

3

4 **Gerusa R. S. Cavalcante¹, Beatriz M. Barguil², Willie A. S. Vieira¹, Walléria G.**
5 **Lima¹, Sami J. Michereff¹, Vinson P. Doyle³, Marcos P. S. Câmara^{1,*}**

6

7 ¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900,
8 Recife, PE, Brasil.

9 ²Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Piauí, 64003-120, Teresina, PI,
10 Brasil.

11 ³Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University
12 AgCenter, Baton Rouge, Louisiana, United States of America.

13

14 *Corresponding author:

15 Ph.D. Marcos Paz Saraiva Câmara: Área de Fitossanidade, Departamento de
16 Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil,

17 E-mail: marcos.camara@ufrpe.br.

18

19 **Abstract**

20 Anthracnose is one of the most important diseases of lima bean in Brazil. Previously,
21 the disease was attributed exclusively to *Colletotrichum truncatum*. Therefore, this
22 work aimed to characterize the diversity, prevalence and virulence of *Colletotrichum*
23 species associated with anthracnose in Brazil bean. Here we report the species *C.*
24 *truncatum*, *C. brevisporum* and *C. sichuanensis* in association with anthracnose in lima
25 bean. A single species has not been grouped with any of the previously described
26 species and is considered a new lineage, described here as *Colletotrichum* sp. All
27 species were pathogenic to lima bean. *C. truncatum* is the prevailing species and more
28 virulent than all species studied. Finally, we are proposing to place *C. liaoningense* in
29 synonymy with *C. brevisporum*.

30 **Key works:** anthracnose, *Phaseolus lunatus*, phylogenetic analysis, multilocus, species
31 delimitation.

32 **Introduction**

33 Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an important source of food and income
34 for small farmers in Brazil, in 2016 occupied a planted area of 20.209 ha and a
35 production of 3.637t ha⁻¹ (Brazilian Institute of Geography and Statistics 2017). Lima
36 bean is the second most consumed species of the genus *Phaseolus* in world, behind the
37 common bean (*Phaseolus vulgaris*) (Maquet et al. 1999). The crop is affected by several
38 diseases, with anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. one of the most important
39 diseases of lima bean in Brazil (Carvalho et al. 2015, Paula Júnior et al. 1995).

40 The anthracnose symptoms of lima bean begin with reddish spots along the
41 veins, in the lower part of the leaves and in young stems and petioles. In the pods, the
42 lesions are depressed, large and reddish with developing acervuli. Reddish and necrotic

43 lesions can also be seen in the hypocotyl, petiole and leaf surface, resulting in wrinkled
44 leaves (Carvalho et al. 2015, Ballhorn et al. 2010).

45 Until recently lima bean anthracnose has been attributed exclusively to
46 *Colletotrichum truncatum* in Brazil and worldwide (Ballhorn et al. 2010, Carvalho et al.
47 2015, Cavalcante et al. 2012, Damm et al. 2009, Paula Júnior et al. 1995). *C. truncatum*,
48 which has curved spore, (Andrus and Moore 1935) was first described in association
49 with lima bean anthracnose in the United States. In Brazil, *C. dematium* f.sp. *truncata*
50 was reported in association with lima bean anthracnose in Minas Gerais state (Paula
51 Júnior et al. 1995). Recently, three species with cylindrical spores were recovered
52 causing anthracnose in lima bean in northeast Brazil: *C. sichuanensis* (Cavalcante et al.
53 2018), *C. clivae* and *C. fructicola* (Sousa et al. 2017).

54 Species within the genus *Colletotrichum* are considered to be one of the most
55 important causes of diseases on several crops of economic interest, such as fruit trees,
56 legumes and ornamental plants (Barbieri et al. 2017, Liu et al. 2016, Lima et al. 2015,
57 Sharma and Shenoy 2016). Previously the identification of *Colletotrichum* species was
58 carried out based on morphological and cultural characteristics. However,
59 morphological characters may vary according to environmental factors such as culture
60 medium and temperature. Currently, identification of *Colletotrichum* species is
61 performed using a polyphasic approach that combines morphological and cultural
62 characteristics with multilocus phylogenetic analysis of DNA sequences (e.g. Cai et al.
63 2009, Cannon et al. 2012, Damm et al. 2009, Hyde et al. 2014). The identification of *C.*
64 *truncatum* in association with lima bean anthracnose in the United States and was
65 carried out using a polyphasic approach (Damm et al. 2009). In contrast, the
66 characterization of *C. truncatum* from lima bean in Brazil was done exclusively with
67 morphological markers, using few isolates from only one location.

68 Currently, there is no studies about the prevalence of *Colletotrichum* species in
69 lima bean on different counties of the main producing states in Brazil and the organ
70 preference to natural infection. Therefore, the present study aimed to characterize the
71 diversity, prevalence, and virulence of *Colletotrichum* species associated with
72 anthracnose in lima bean in Brazil.

73

74 **Material and methods**

75 **Sampling, isolation and distribution of species.** In 2015, leaves, branches, and pods
76 with typical anthracnose symptoms were collected from lima bean crops in Northeast
77 Brazil. Collections were done in the following states: Alagoas (1 city), Ceará (6),
78 Paraíba (9), Pernambuco (6) and Piauí (3). Seven leaves and 2 pods were sampled per
79 plant and at least 10 plants were sampled per area.

80 Fragments of 4-5 mm were cut from the transition region between symptomatic
81 and asymptomatic tissues. Fragments were surface-sterilized in 70% alcohol for 30 s,
82 2% sodium hypochlorite for 1 min, and rinsed three times in sterile distilled water.
83 Fragments were plated on potato dextrose agar (PDA) supplemented with streptomycin
84 sulfate (0.5 g/L) and incubated at 25°C with a 12h photoperiod. Colonies were observed
85 daily to check the emergence of fungal colonies. Colonies similar in morphology to
86 *Colletotrichum* (Sutton 1980) were transferred to PDA and preserved in cryogenic tubes
87 containing autoclaved distilled water at room temperature. Isolates were deposited to the
88 culture collection of the Federal Rural University of Pernambuco, Collection of
89 Phytopathogenic Fungi "Professora Maria Menezes" (CMM), Recife, Pernambuco,
90 Brazil.

91

92 **DNA extraction, PCR amplification and DNA sequencing.** For genomic DNA
93 extraction, isolates were grown on PDA for 7 days at 27°C in a 12h photoperiod. The
94 aerial mycelium was scraped off the colony surface and DNA was extracted using the
95 protocol described by Moller et al. (1992) with minor changes. The DNA concentration
96 was estimated visually on a 0.8% agarose gel.

97 A portion of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene
98 was sequenced for all isolates to select representatives for multilocus analysis. A
99 multiple sequence alignment was used to generate a distance tree using the neighbor-
100 joining (NJ) algorithm in MEGA v.7 (Kumar et al. 2016) to identify haplotypes, was
101 considered haplotype distinct groups of isolates with a support equal to or greater than
102 75%. The actin (ACT), nuclear rDNA (ITS) and β -tubulin (TUB2) regions were
103 amplified and sequenced for all representative isolates. Primers used in the present
104 study are listed in the Table 1.

105 Polymerase chain reactions (PCR) were run in a final volume of 50 μ l containing
106 32.8 μ l of water, 1 μ l of DNA, 2.0 μ l of each primer, 0.2 μ l of Taq DNA polymerase, 3
107 mM MgCl₂, 25mM of each dNTP and 2.0 μ l DMSO. Reactions were performed on the
108 MaxiGene Therm-1001 thermal cycler (Axygen, Tewksbury, USA) using the following
109 cycles: initial denaturation of 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s,
110 56°C (GAPDH) or 55°C (ACT, ITS and TUB2) for 1 min, 72°C for 90 s, and a final
111 extension at 72°C for 10 min. Amplified PCR products were observed by gel
112 electrophoresis in 1.5% agarose. PCR products were purified using the AxyPrep™ PCR
113 Cleanup kit (AXYGEN) following the manufacturer's instructions. The regions were
114 sequenced in both directions using ABI 3730 XL sequencer at Macrogen, Inc. (Seoul,
115 South Korea). Sequences generated in the present study were deposited to GenBank
116 (Table 2).

117 **Phylogenetic analysis.** Sequences were assembled using the Staden package (Staden et
118 al. 1998). For approximate species identification, the sequences were compared to
119 GenBank sequences using BLAST to query the NCBI sequence database. Sequences of
120 ex-type isolates were obtained from GenBank (Table 2). Multiple sequence alignments
121 of each independent locus were estimated using the Muscle algorithm implemented in
122 MEGA v.7 and adjusted manually when necessary. For the multilocus analysis, the loci
123 were concatenated using SequenceMatrix v.1.8 (Vaidya et al. 2011).

124 Phylogenetic reconstruction for each locus and the concatenated data set was
125 performed using maximum likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). ML analysis
126 and BI were performed on the CIPRES Science Gateway portal
127 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) using RAXML - HPC2 (Stawatakis 2014)
128 and MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012), respectively. ML tree searches were
129 performed assuming sequences evolved according to the GTRGAMMA model and
130 support values were estimated with 1000 pseudoreplicates. For BI, the best-fit
131 nucleotide substitution models were selected using the program MrModeltest 2.3
132 (Nylander 2004). Three simultaneous Markov chains were run for 30×10^6 generations
133 with samples taken from the posterior every 1000 generations. Convergence of all
134 parameters was checked using Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond 2007) and the
135 first 25% of generations were discarded as burn-in.

136

137 **Species assignment.** Phylogenetic species recognition was performed using the
138 Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) criteria
139 (Dettman et al. 2003). A clade was considered an independent lineage when it met at
140 least one of two criteria: genealogical concordance or genealogical non-discordance.
141 The genealogical concordance criterion is satisfied if the clade is present in most

142 individual gene trees. The criterion of genealogical non-discordance is reached when a
143 clade is strongly supported by at least one locus in both ML and BI analysis ($\geq 70\%$ and
144 ≥ 0.95 , respectively), and not contradicted in any other individual gene tree with the
145 same level of support. Novel species were recognized if the clade was recognized as a
146 phylogenetic species by the GCPSR criterion, is strongly support in both ML and BI
147 analyses of the concatenated matrix, and did not contain the type of any previously
148 described species.

149

150 **Cultural and morphological characterization.** The growth rate and shape and size of
151 conidia and apleria were determined for any novel species delimited based on
152 GCPSR. To determine growth rate, isolates were first grown on corn meal agar (CMA)
153 for seven days (Doyle et al. 2013). Five-millimeter diameter plugs were taken from the
154 edge of colonies and transferred to PDA (HIMEDIA, 39 g⁻¹) and incubated at 25°C
155 under continuous light (Cai et al. 2009). Each isolate was plated to three replicate plates.
156 Orthogonal diameters were measured initiating at 48h after the initial transfer.
157 Measurements were taken each 24h over the course of 5 days, resulting in 6 orthogonal
158 measurements per isolate. Mycelial growth rate was calculated and expressed in
159 mm.day⁻¹. Colonies were characterized in relation to color and topography, and the
160 conidia harvested for morphological characterization, after seven days incubation.
161 Microscopic images were made with an (OPTON) digital camera attached to a
162 (TUCSEN 300STD) microscope using phase contrast illumination. The pictures were
163 captured using the AxioVision version 4.8.10 software. The shape and size of 30
164 conidia per isolate were recorded using the program Micro Measure 3.3.

165 Apleria were observed using slide cultures (Johnston and Jones 1997): a
166 10mm² block of CMA was placed on a sterile microscope slide, each of the four corners

167 of the block was inoculated, covered with a sterile coverslip, and incubated at 25°C for
168 seven days. The shape and size of 30 aprocessoria were observed.

169

170 **Prevalence of *Colletotrichum* species.** The prevalence of *Colletotrichum* species by
171 sampling geography (state) and host organ was recorded as a percentage of the total
172 number of isolates per sampling strata. The prevalence of each species by state was
173 calculated as the total number of isolates per species in a state divided by the total
174 number of isolates from that state and expressed as a percentage. The prevalence of
175 each species by host organ was expressed as a percentage of the total number of isolates
176 of a species from a given host organ divided by the total number of isolates of that
177 species across all host organs.

178

179 **Pathogenicity and virulence of isolates.** Lima bean plants (var. Branca) were
180 inoculated 40 days after planting for pathogenicity and severity assays. Representative
181 isolates of each species were used to inoculate two leaves per plant. For each isolate, 5
182 plants were inoculated and each leaf was considered one replicate. For the preparation
183 of the suspension the isolates were grown in PDA at a temperature of 27°C with a 12h
184 photoperiod for spore production. The inoculation was performed by spraying the dorsal
185 and ventral surface of the leaf with approximately 2mL of the suspension (10^5
186 spores/ml) on each side. Plants were covered with plastic bags for 36 hours to maintain
187 high humidity and kept at a temperature of 27°C with a 12h photoperiod in a room of
188 growth. Pathogenicity was verified five days after inoculation by the presence or
189 absence of symptoms. Severity was evaluated using the scale developed by Carvalho
190 (2009), where: 0 = absence of symptom; 1 = up to 10% of leaf area infected; 2 = 11-25
191 % of the leaf area infected; 3 = 26-50% of leaf area infected, no leaflet drop; 4 = 51-

192 75% of leaf area infected, with or without leaflet drop; 5 = from 76-100% of leaf area
193 infected, with or without falling two or three leaflets. Differences in severity among
194 species was evaluated by the Kruskal-Wallis test (significant at $P \leq 0.05$) using Statistix
195 v.10 (Statistix 2013).

196

197 **Results**

198 **Sampling and isolation.** A total of 126 isolates with morphological characteristics
199 similar to the genus *Colletotrichum* were obtained from lima bean. Of these isolates 55
200 were from the state of Paraíba, 29 from Pernambuco, 20 from Ceará, 13 from Piauí and
201 9 from Alagoas. Ninety-one isolates were obtained from leaves, twenty-six from pods,
202 three from stems, and three from seeds.

203

204 **Phylogenetic analysis.** A preliminary analysis of nucleotide variation among the 126
205 isolates using partial sequences of GAPDH revealed nine distinct haplotypes (H1-H9).
206 Three haplotypes (H1, H2, and H3) were represented by 13, 57 and 13 isolates
207 respectively, and the sequences were similar to sequences of the *C. truncatum* species
208 complex according to a BLAST search. Twenty-three isolates (H4, H5, H6, and H7)
209 were similar to sequences of *C. brevisporum*, 27 isolates (H8) were similar to *C. cliviae*,
210 and three isolates (H9) to *C. cliviae* and *C. orchidearum*. According to the geographical
211 origin, thirty-six isolates representing were chosen from GAPDH haplotypes to
212 sequence the remaining loci. Thirteen isolates of haplotypes H1, H2, and H3, 15 isolates
213 of haplotypes H4, H5, H6, and H7, 5 isolates of haplotype H8 and 3 of haplotype H9
214 were selected.

215 The selected isolates were distributed among four clades well supported in ML
216 and BI analyses (Fig. 1). These clades were recovered in most of the individual gene

217 trees, with TUB2 and GAPDH providing the most robust support and ACT and ITS the
218 weakest support (Fig. 2 to 5).

219

220 **Species assignment.** *Colletotrichum* lima bean isolates were assigned to four species
221 according to GCPSR. Thirteen isolates clustered within the *C. truncatum* clade with
222 maximum support in the ML and BI multilocus analyses. *Colletotrichum truncatum* was
223 recovered as monophyletic in all individual gene trees, but was only strongly supported
224 as such in the TUB2 and ITS gene trees. Five isolates were assigned to *C. sichuanensis*
225 with strong support in the multilocus analyses and was recovered in the ACT, TUB2
226 and GAPDH trees as monophyletic, but this clade is only strongly supported in the
227 TUB2 and GAPDH trees.

228 Fifteen isolates were nested within *C. brevisporum* clade in the multilocus
229 analyses. Isolates of the closely related species *C. liaoningense* also nested in the *C.*
230 *brevisporum* clade with significant support. Although *C. brevisporum* and *C.*
231 *liaoningense* are each monophyletic in the TUB2 tree with strong support, strong
232 discordance is observed in among the GAPDH, ACT and ITS trees, where some
233 isolates of both species are placed together with a high level of support. Since the
234 GCPSR criterion fails to identify *C. liaoningense* and *C. brevisporum* as two
235 independent lineages and *C. liaoningense* is not monophyletic in the concatenated
236 analysis, we are proposing to place *C. liaoningense* in synonymy with *C. brevisporum*.

237 Finally, three isolates did not cluster with any previously described species.
238 These isolates comprise a sister clade of *C. cliviae*, *C. sichuanensis*, *C. aracearum*, and
239 *C. orchidearum*. The clade is strongly supported in multilocus analyses and could be
240 recovered in all individual gene trees with a high level of support. Thus, these isolates

241 represent a novel species *Colletotrichum* sp., which is described in the taxonomic
242 section.

243 Each species was represented by multiple isolates and, in some cases, multiple
244 GAPDH haplotypes. *Colletotrichum truncatum* accounted for 73 of the 126 isolates and
245 were represented by three GAPDH haplotypes (H1:3, H2:57, H3:13), while *C.*
246 *brevisporum* was represented by four haplotypes (H4:6, H5:5, H6:8, H7:4).
247 *Colletotrichum sichuanensis* and *Colletotrichum* sp. nov. were each represented by a
248 single haplotype each accounting for 27 (H8) and 3 (H9) isolates, respectively.

249

250 **Prevalence.** *Colletotrichum truncatum* was the most commonly recovered species,
251 representing 58% of the isolates collected, and was found in all sampled states. It was
252 also the most prevalent species in Ceará (100%), Piauí (62%), Paraíba (53%), and
253 Alagoas (55%) (Fig. 6). *Colletotrichum brevisporum* (18.3%), was found in four states
254 (Piauí, Pernambuco, Paraíba, and Alagoas) and was the most prevalent in Pernambuco
255 (48%). *Colletotrichum sichuanensis* (21.4%) was found in the states of Pernambuco,
256 Paraíba, and Alagoas. *Colletotrichum* sp. nov. (2.3%) was restricted to the state of
257 Paraíba.

258 *C. truncatum* isolates were found in all organs of the plant that were sampled,
259 with the majority (60.2%) in leaves, 24% in pods, 4.1% in seed, and 2.7% in stems.
260 *Colletotrichum brevisporum* and *C. sichuanensis* were isolated from only two organs.
261 *Colletotrichum brevisporum* was found in leaves (91%) and pods (9%), while *C.*
262 *sichuanensis* was found in leaves (96%) and stems (4%). *Colletotrichum* sp. nov. was
263 only found in pods (Fig. 7).

264

265 **Pathogenicity and virulence.** All tested isolates were pathogenic on lima bean leaves,
266 producing anthracnose symptoms, but no symptoms were observed on the uninoculated
267 control plants. Significant differences ($P < 0.05$) were observed among species with
268 respect to virulence (Fig. 8). *Colletotrichum truncatum* was the most virulent species
269 (Fig. 8), being significantly different from the other species (*C. brevisporum*, *C.*
270 *sichuanensis*, and *Colletotrichum* sp. nov.).

271

272 **Taxonomy**

273 ***Colletotrichum* sp.** G.R.S. Cavalcante, B. M. Barguil, W.A.S. Vieira & M.P.S. Câmara
274 **sp.nov.** MycoBank: XXXXX; (Fig. 9a-h).

275

276 **Holotype:** BRASIL, Paraíba, Lagoa do Rancho. Isolated as a pathogen from a pod of
277 *Phaseolus lunatus*, Coll. G. R. S. Cavalcante, May 2017, holotype dried culture URM
278 XXXXX; Ex-type living culture URM XXXX, CMM 2947.

279 *Colonies* on PDA gray, white on the edges, dark gray reverse, growth rate at 25°C 13.06
280 - 18.39 mm dia-1 ($x = 15.39 \pm 0.15$, $n = 9$). *Acervuli* dark. *Setae* abundant, long, dark
281 brown, smooth walls, three or more septa, conical base, acute apex, 50.8-89.2 ($69.5 \pm$
282 9.02) μm length, 1.72-3.18 (2.49 ± 0.46) μm width ($n = 30$). *Conidiophores* hyaline,
283 non-septate, non-branched, smooth-walled. *Conidiogenous cells* hyaline. *Conidia*
284 unicellular, hyaline, cylindrical with rounded ends, 8.59-11.1 (9.66 ± 0.63) μm length,
285 2.3-8.59 (2.91 ± 0.24) μm width ($n = 30$). *Appressoria* dark brown, single or in pairs,
286 smooth-walled, round with wavy margin, 3.9-6.0 (5.19 ± 0.61) μm length, 3.7-5.4 (4.55
287 ± 0.46) μm width ($n = 30$). *Teleomorph* not observed.

288 **Geographic distribution and host range:** Known from *Phaseolus lunatus*, from
289 Paraíba, Brazil.

290 **Note:** This species is closely related to *C. aracearum*, *C. orchidearum*, and *C.*
291 *sichuanensis*. *Colletotrichum* sp. nov. has shorter conidia (av. 9.66µm) when compared
292 to *C. aracearum* (av.16.5µm) (Hou et al. 2016) and *C. orchidearum* (av.17.6µm) (Yang
293 et al. 2011). *Colletotrichum sichuanensis* has slightly shorter conidia (av. 9.4µm) than
294 *Colletotrichum* sp. nov.

295

296 ***Colletotrichum brevisporum*** S. Phoulivong, P. Noireung, L. Cai & K.D. Hyde =
297 *Colletotrichum lioningense* Y.Z. Diao, C. Zhang, L. Cai & X.L. Liu.

298 *Colletotrichum brevisporum* was first described causing anthracnose on *Neoregelia* sp.
299 and *Pandanus pygmaeus* in Thailand (Noireung et al. 2012). *Colletotrichum*
300 *liaoningense* was recently described causing anthracnose on chili in China (Diao et al.
301 2017). *Colletotrichum liaoningense* was sister to *C. brevisporum* in the multilocus
302 analyses of Diao et al. (2017) and both species were strongly supported as
303 monophyletic. However, we included several additional isolates representing these
304 species in our study and *C. brevisporum* is paraphyletic with respect *C. liaoningense* in
305 the concatenated analysis (Fig. 1). While isolates previously described as *C.*
306 *brevisporum* and *C. liaoningense* are reciprocally monophyletic in inferences from the
307 TUB2 alignment (Fig. 3), strong discordance was found between the TUB2 phylogeny
308 and that from ACT and GAPDH gene trees (Fig. 2 and 4). Thus, these species are not
309 considered independent lineages according to GCPSR. We are placing *C. liaoningense*
310 in synonym within *C. brevisporum*.

311

312 **Discussion**

313 This study represents the first survey of the species of *Colletotrichum* that
314 cause anthracnose in lima bean in the main producing states of Brazil with large number

315 of isolates and integrating pathogenicity, virulence, morphology and phylogenetic
316 analysis. In this study we founded four *Colletotrichum* species were found causing
317 anthracnose on lima beans: *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. sichuanensis*, and a new
318 species, *Colletotrichum* sp. nov. *Colletotrichum brevisporum* is reported for the first
319 time on lima bean all over the world.

320 *Colletotrichum truncatum* is the most economically important pathogen of
321 lima bean among those agents of anthracnose sampled in this study. It was not only the
322 most ubiquitous species in terms of its distribution across plant organs and geographic
323 areas, but it was also the most virulent on lima bean of all the species recovered.
324 *Colletotrichum truncatum* was originally described from lima bean by Andrus and
325 Moore (1935). This species is also associated with anthracnose on many other
326 Fabaceous plants, such as soybean, peanut, and cowpea (Damm et al. 2009), as well as
327 Solanaceous species, such as pepper (Liu et al. 2016). This species was previously
328 reported causing anthracnose on lima beans in Brazil in the state of Piauí and Alagoas
329 (Carvalho 2009, Sousa et al. 2017). This work reinforces the occurrence of this species
330 in these states and in three other states of the Brazilian Northeast (Paraíba, Pernambuco
331 and Ceará) increasing the occurrence of the species and reporting three other species
332 that cause anthracnose in lima bean, using a greater number of isolates.

333 *Colletotrichum brevisporum*, *C. sichuanensis*, and *Colletotrichum* sp. nov.
334 were all capable of causing anthracnose on lima bean, but were less virulent than *C.*
335 *truncatum* (Fig. 8). *Colletotrichum sichuanensis* was found in two states causing
336 symptoms on leaves and stems (Fig. 6 and 7). While *C. sichuanensis* was dominant in
337 Pernambuco, the significant difference in virulence between *C. sichuanensis* and *C.*
338 *truncatum* suggests *C. truncatum* has greater relative fitness on lima bean and may

339 become the dominant species in Pernambuco. This species has only been reported
340 causing anthracnose on pepper in China (Liu et al. 2016).

341 *Colletotrichum brevisporum* was isolated from leaves and pods and found in
342 four of the five sampled states (Fig. 6 and 7). While it was not the dominant species in
343 any single geographic area, it rivals *Colletotrichum truncatum* in prevalence in Alagoas.
344 However, *C. brevisporum* is also less virulent than *C. truncatum*. This lower relative
345 fitness on lima bean indicates *C. brevisporum* will decrease in prevalence over time. *C.*
346 *brevisporum* was first reported causing anthracnose on *Neoregelia* sp. and *Pandanus*
347 *pygmaeus* in Thailand (Noireung et al. 2012), and later found causing anthracnose on
348 pepper in the China and in Brazil (Liu et al. 2016, Almeida et al. 2017), in papaya
349 (Vieira et al. 2013), and chayote (Bezerra et al. 2016) in Brazil, in the states of Manaus,
350 Pernambuco and Santa Catarina, respectively. *C. truncatum* and *C. brevisporum* are
351 well distributed species in northeastern Brazil, have been found causing anthracnose in
352 *Capsicum* sp. in the states of Alagoas, Pernambuco and Sergipe (Silva et al., 2017). *C.*
353 *truncatum* has already been found causing anthracnose in soybean in different
354 producing regions causing soybean anthracnose in Brazil (Silva et al. 2017).

355 Diao et al. (2017) described a new species, *C. liaoningense*, causing
356 anthracnose on pepper, considering it a distinct species from *C. brevisporum* based on
357 strong support for monophyly in the concatenated analysis. In this work, we show
358 evidence that *C. brevisporum* and *C. liaoningense* are a unique species. It may be that
359 the lack of conflict observed by Diao et al. (2017) is the result of limited sampling of
360 isolates in the *C. brevisporum/liaoningense* clade. They included just four isolates of *C.*
361 *liaoningense* and two isolates of *C. brevisporum*, making it possible that they happened
362 to exclude isolates that carry the signature of recombination among the lineages
363 recognized in that study. Both species have been found on pepper in China (Diao et al.

364 2017, Liu et al. 2016) and it seems likely, based on our results, they represent isolates
365 from a larger metapopulation.

366 This is the first report on the occurrence of *C. brevisporum* associated with
367 Lima bean in Brazil and worldwide. In addition, a new species is described, here
368 presented as *Colletotrichum* sp. nov. *Colletotrichum truncatum* is the most important
369 species causing anthracnose in lima bean, although three other species were also found.
370 Due to its wide distribution in the main fava bean production areas and its much higher
371 virulence compare to the other species, further epidemiological studies are needed to
372 better understand this pathosystem. Effective control measures and the search for
373 sources of genetic resistance will strongly rely on an accurate understanding of lima
374 bean anthracnose etiology and epidemiology.

375

376 **Acknowledgments**

377 This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
378 de Ensino Superior (CAPES). The authors thank the Universidade Federal do Piauí
379 (UFPI) in the person of Dr. José Evando Beserra Júnior for the space provided for the
380 elaboration of the experiments. M. P. S. Câmara and S. J. Michereff are research
381 productivity fellows of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
382 Tecnológico (CNPq).

383

384 **References**

385 Almeida, L. B., Matos, K. S., Assis, L. A. G., Hanada, R. E., and Silva, G. F. 2017.
386 First Report of Anthracnose of *Capsicum chinense* in Brazil caused
387 by *Colletotrichum brevisporum*. Plant Dis. 101:1035.

- 388 Andrus, C.F., and Moore, W.D. 1935. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on
389 garden and lima beans. *Phytopathology*. 25: 121-125.
- 390 Barbieri, M. C. G., Ciamoi-Guillardil, M., Moraes, S. R. G., Bonaldo, S. M., Rogério,
391 F., Linhares, R. R., and Massola Júnior, N. S. 2017. First report of
392 *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil. *Plant Dis*.
393 101:1677.
- 394 Ballhorn, D. J., Pietrowski, A., and Lieberei, R. 2010. Direct trade-off between
395 cyanogenesis and resistance to a fungal pathogen in lima bean (*Phaseolus*
396 *lunatus* L.). *Journal of ecol.* 98:226-236.
- 397 Bezerra, J. P., Ferreira, P. V., Barbosa, L. F., Ramos-Sobrinho, R., Pinho, D. B., Reis,
398 A., Assunção, I. P., and Lia, G. S. A. 2016. First report anthracnose chayote
399 fruits (*Sechium edule*) caused by *Colletotrichum brevisporum*. *Plant Dis*.
400 100:217.
- 401 Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J.
402 Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G.,
403 Mckenzie, E. H. C., and Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for
404 studying *Colletotrichum*. *Fungal Diver.* 39:183-204.
- 405 Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum* -
406 current status and future directions. *Stud Mycol.* 73:181-21.
- 407 Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation
408 studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91:553–556.
- 409 Carvalho, E. M. S. 2009. Antracnose em feijão-lima (*Phaseolus lunatus* L.):
410 caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum*
411 *truncatum*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e
412 Veterinárias, Jaboticabal.

- 413 Carvalho, E. M. S.; Beserra JR., J. E. A. and Barguil, B. M. 2015. Lima Bean
414 Diseases. In: Ferreira, A. S. A.; Lopes, A. C. A. and Gomes, R. L. F. (Org.).
415 *Phaseolus lunatus*: Diversity, Growth and Production. (p. 113-133), New
416 York: Nova Science Publishers.
- 417 Cavalcante, G. R. S., Carvalho, E. M. S., Gomes, R. L. F., Santos, A. R. B. and
418 Santos, C. M. P. M. 2012. Reação de subamostras de feijão-lima à antracnose.
419 Summa Phytop. 38:329-333.
- 420 Cavalcante, G. R. S.; Vieira, W. A. S.; Michereff, S. J.; Barguil, B. M.; Doyle, V. P.
421 and Câmara, M. P. S. 2018. First report of anthracnose caused by
422 *Colletotrichum sichuanensis* on *Phaseolus lunatus* in Brazil, Plant Dis.
423 <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-0963-PDN>.
- 424 Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F., and Crous, P. W. 2009.
425 *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal
426 Div. 39:45-87.
- 427 Dettman, J. R., Jacobson, N. D. J., and Taylor, J. W. 2003. A multilocus genealogical
428 approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote
429 *Neurospora*. Evolution. 57: 2703–2720.
- 430 Diao, Y-Z., Zhang, C., Liu, F., Wang, W.-Z., Liu, L., Cai, L., and Liu, X.-L. 2017.
431 *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China.
432 Persoonia. 38:20-37.
- 433 Doyle, V. P., Oudemans, P. V., Rehner, S. A., and Litt, A. 2013. Habitat and host
434 indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and
435 agricultural landscapes in North America. Plos One. 8:e62394.

- 436 Glass, N.L., and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use
437 with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.
438 *Applied and Envir. Microb.* 61:1323–1330.
- 439 Hyde, K. D., Nilson, R.H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L.,
440 Cock, A. W. A. M., Dissanayake, A. J. , Glockling, S. L., Goonasekara, I. D.,
441 Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R. S., Van Kan, J. A. L., Laurence, M.
442 H., Lévesque, C. A., Li, X., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N.,
443 Manamgoda, D. S., Martin, F. N., Mckenzie, E. H. C., Mctaggart, A. R.,
444 Mortiner, P. E., Nair, P. V. R., Pawlowska, J., Rintoul, T. L., Shivas, R. G.,
445 Spies, C. F. J., Summerell, B. A., Taylor, P. W. J., Terhem, R. B., Udayanga,
446 D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J. C., Yan, J., and
447 Zhou, N. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic
448 genera: I (2014). *Fungal Diver.* 67:21-125.
- 449 Hou, L. W., Liu, F., Duan, W. J. and Cai, L. 2016. *Colletotrichum aracearum* and *C.*
450 *camelliae-japonicae*, two holomorphic new species from China and Japan.
451 *Mycosphere.* 7: 1111–1123.
- 452 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola 2016.* Rio de
453 Janeiro: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- 454 Johnston, P. R., and Jones, D. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from
455 fruit-rot assessed using rDNA sequences. *Mycologia.* 89:420-430.
- 456 Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary
457 Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biol. and Evol.*
458 33:1870-1874.

- 459 Lima, N. B., Lima, W. G., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., and Câmara, M. P.
460 S. 2015. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in
461 northeastern Brazil. *Euro. Journal of Plant Pathol.* 141:679-688.
- 462 Liu, F., Tang, G., Zheng, X.; Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang,
463 X., Zhang, S., and Gong, G. 2016. Molecular and phenotypic characterization
464 of *Colletotrichum* species associated with anthracnose diseases in peppers from
465 Sichuan Province China. *Scientific Repor.* 6:32761.
- 466 Maquet, A., Vekemans, X., and Baudoin, J.P. 1999. Phylogenetic study on wild allies
467 of lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin.
468 *Plant System. and Evol.* 218: 43-54.
- 469 Moller, E. M., Bahneg. G., Sandermann, H., and Geiger, H. H. 1992. A simple and
470 efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from
471 filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.*
472 22: 6115-6116.
- 473 Nylander, J. A. A. 2014. MrModeltest v2. Program distributed by the author.
474 Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- 475 Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E.,
476 Jones, E. B. G., Bahkali, A. H. and Hyde, K. D. 2012. Novel species of
477 *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Mycologie,*
478 33: 347-362.
- 479 O'Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types
480 within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous.
481 *Molecular Phylo. and Evol.* 7:103–116.
- 482 Paula Júnior, T. J., Silva, M. B., and Vieira, R. F. 1995. Doenças causadas por fungos
483 em hortaliças leguminosas. *Informe Agropecuário.* 17:.63-71.

- 484 Rambaut, A., Drummond, A. 2007. Tracer v. 1.4. University of Oxford, Oxfordshire,
485 U. K. Available from: <http://beast.bioed.ac.uk/Tracer>.
- 486 Rogério, F., Ciampi-Guillardi, M., Barbieri, M. C. G., Bragança, C. A. D., Seixas, C.
487 D. S., Almeida, A. M. R. and Massola Junior, N. S. (2017). Phylogeny and
488 variability of *Colletotrichum truncatum* associated soybean anthracnose in
489 Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 122: 402-415.
- 490 Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu,
491 L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes v. 3.2: efficient
492 Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.
493 *Systematic Biology*. 61: 539–542.
- 494 Silva, J. R. A., Chaves, T. P., Silva, A. R. G., Barbosa, L. F., Costa, J. F. O., Ramos-
495 Sobrinho, R., Teixeira, R. R. O., Silva, S. J. C., Lima, G. S. A. and Assunção,
496 I. P. 2017. Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum*
497 spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil.
498 *Tropical Plant Pathology*. 42: 315-319.
- 499 Sharma, G., and Shenoy, B. D. 2016. *Colletotrichum* systematics: Past, present and
500 prospects. *Mycosphere*. 7:1093-1102.
- 501 Sousa, S. S., Silva, R. A. S., Assunção, I. P., Melo, P. M., Feijó, F. M., Matos, K. S.,
502 Lima, G. S. A., and Beserra Jr, E. A. B. 2017. *Colletotrichum* species causing
503 anthracnose on lima bean in Brazil. *Tropical Plant Pathol*. 38:329-333.
- 504 Stawatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-
505 Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*. 30:1312-1313.
- 506 Staden, R., Beal, K. F., and Bonfiels, J. K. 1998, The Staden package. In S. Misener
507 and S. A. Krawetz. (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols*, Humana
508 Press. 115–130.

- 509 Statistix. Statistix 10. Version 10. Analytical Software. Tallahassee, FL, 2013.
- 510 Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and
511 stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696.
- 512 Templeton, M. D., Rikkerink, E. H., Solon, S. L., and Crowhurst, R. N. 1992. Cloning
513 and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate
514 dehydrogenase – encoding gene and DNA from the plant pathogenic fungus
515 *Glomerella cingulata*. *Gene*. 122:225-230.
- 516 Vaidya, G., Lohman, D. J., and Meier, R. 2011. SequenceMatrix: concatenation
517 software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and
518 codon information. *Cladistics*. 27:171-180.
- 519 Vieira, W. A. S., Nascimento, R. J., Michereff, A. J. and Câmara, M. P. S. 2013. First
520 Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in
521 Brazil. *Plant Dis*. 97:1659.
- 522 White, T. J., Bruns, T., Lee, J. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of
523 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H.,
524 Sninsky, J.J., et al. (eds), PCR protocols: a Guide to Methods and Applications.
525 Academic Press. 315–322.
- 526 Yang, Y., Cai, L., Yu, Z., Liu, Z., and Hyde, K. D. 2011 *Colletotrichum* species on
527 Orchidaceae in southwest China. *Mycologie*, 32:229-253.
- 528

529 **Table 1.** Primers used in this study, sequence details, and reference.

Gene	Product Name	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Reference
ACT	Actin	ACT-512F	Forward	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone and Kohn., 1999
		ACT-783R	Reverse	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
β TUB	β -tubulin	T1	Forward	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell and Cigelnik, 1997 Glass and Donaldson, 1995
		β t2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDF	Forward	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Templeton <i>et al.</i> , 1992
		GDR	Reverse	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	
ITS	Internal transcribed spacer	ITS-1	Forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Glass and Donaldson, 1995 White <i>et al.</i> , 1990
		ITS-4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

530

531

532 **Table 2.** Isolates of *Colletotrichum* used in this study, details of the collection number, and
 533 GenBank accession numbers.

Species	Strain no. ¹	Host	Origin	GenBank accession number ²			
				ACT	BTUB	GAPDH	ITS
<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876*	<i>Neoregelia</i> sp.	Thailand	JN050216	JN050244	JN050227	JN050238
<i>C. brevisporum</i>	MFLUCC100 182	<i>Pandanus</i> <i>pygmaeus</i>	Thailand	JN050217	JN050245	JN050228	JN050239
<i>C. brevisporum</i>	LJTJ27	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP823737	-	KP823797	KP748218
<i>C. brevisporum</i>	CMM2905	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018383	MG018396	MG018414	MG018423
<i>C. brevisporum</i>	CMM2906	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018385	MG018398	MG018416	MG018424
<i>C. brevisporum</i>	CMM2922	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018380	MG018405	MG018411	MG018425
<i>C. brevisporum</i>	CMM2924	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018381	MG018404	MG018412	MG018426
<i>C. brevisporum</i>	CMM2931	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018389	MG018394	MG018407	MG018427
<i>C. brevisporum</i>	CMM2932	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018386	MG018399	MG018421	MG018430
<i>C. brevisporum</i>	CMM4732	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG436775	MG436777	MG018420	MG436779
<i>C. brevisporum</i>	CMM2935	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018384	MG018397	MG018415	MG018431
<i>C. brevisporum</i>	CMM2938	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018388	MG018401	MG018408	MG018432
<i>C. brevisporum</i>	CMM2948	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018392	MG018400	MG018419	MG018428
<i>C. brevisporum</i>	CMM2950	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018382	MG018395	MG018413	MG018429
<i>C. brevisporum</i>	CMM2951	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018379	MG018393	MG018410	MG018434
<i>C. brevisporum</i>	CMM2958	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018391	MG018406	MG018418	MG018433
<i>C. brevisporum</i>	CMM2959	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018387	MG018400	MG018417	MG018422
<i>C. brevisporum</i>	CMM2972	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MG018390	MG018402	MG018409	MG018435
<i>C. cliviae</i>	CBS 125375*	<i>Clivia</i> <i>miniata</i>	China	JX519240	JX519249	JX546611	JX519223
<i>C. cliviae</i>	CSSS1	<i>Clivia</i> <i>miniata</i>	China	GU085861	GU085869	GU085868	GU109479
<i>C. cliviae</i>	CSSS2	<i>Clivia</i> <i>miniata</i>	China	GU085862	GU085870	GU085868	GU109480
<i>C. sichuanensis</i>	LJTJ3	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP823738	KP823850	KP823773	KP748193
<i>C. sichuanensis</i>	LJTJ16	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP823739	KP823851	KP823786	KP748207
<i>C. sichuanensis</i>	LJTJ30	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP823741	KP823853	KP823800	KP748221
<i>C. sichuanensis</i>	CMM2902	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Brazil	MF279921	MF279914	MF279908	MF279904

continued..

<i>C. sichuanensis</i>	CMM2903	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF279920	MF279913	MF279909	MF279902
<i>C. sichuanensis</i>	CMM2943	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF279919	MF279912	MF279907	MF279903
<i>C. sichuanensis</i>	CMM2946	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF279918	MF279916	MF279911	MF279906
<i>C. sichuanensis</i>	CMM2963	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF279917	MF279915	MF279910	MF279905
<i>C. liaoningense</i>	CAUOS2*	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP890097	KP890111	KP890135	KP890104
<i>C. liaoningense</i>	CAUOS3	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP890098	KP890112	KP890136	KP890105
<i>C. liaoningense</i>	CAUOS4	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP890099	KP890113	KP890137	KP890106
<i>C. truncatum</i>	CBS 151.35*	<i>Phaseolus lunatus</i>	USA	GU227960	GU228156	GU228254	GU227862
<i>C. truncatum</i>	CBS 195.32	<i>Glycine max</i>	USA	GU227963	GU228159	GU228257	GU227865
<i>C. truncatum</i>	CBS 182.52	<i>Glycine max</i>	USA	GU227964	GU228160	GU228258	GU227866
<i>C. truncatum</i>	CBS 112998	<i>Arachis hypogaea</i>	Gambia	GU227967	GU228163	GU228261	GU227869
<i>C. truncatum</i>	CBS 136.30	<i>Crotalaria juncea</i>	Trinidad and Tobago	GU227974	GU228170	GU228170	GU227876
<i>C. truncatum</i>	CBS 335.75	<i>Capsicum annuum</i>	Indonesia	GU227977	GU228173	GU228271	GU227879
<i>C. truncatum</i>	CBS 125328	<i>Capsicum annuum</i>	Mexico	GU227983	GU228179	GU228277	GU227885
<i>C. truncatum</i>	CMM4577	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990570	MF990588	MF990602	MF990615
<i>C. truncatum</i>	CMM2904	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990576	MF990594	MF990607	MF990620
<i>C. truncatum</i>	CMM2908	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990577	MF990585	MF990595	MF990608
<i>C. truncatum</i>	CMM2913	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990575	MF990592	MF990605	MF990618
<i>C. truncatum</i>	CMM2925	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990580	MF990591	MF990604	MF990617
<i>C. truncatum</i>	CMM2927	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990579	MF990590	MF990603	MF990616
<i>C. truncatum</i>	CMM2928	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990574	MF990582	MF990598	MF990611
<i>C. truncatum</i>	CMM2929	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990569	MF990584	MF990600	MF990613
<i>C. truncatum</i>	CMM2930	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990578	MF990587	MF990597	MF990610
<i>C. truncatum</i>	CMM2941	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990581	MF990593	MF990606	MF990619
<i>C. truncatum</i>	CMM2944	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990573	MF990583	MF990599	MF990612
<i>C. truncatum</i>	CMM2953	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990572	MF990586	MF990596	MF990609
<i>C. truncatum</i>	CMM2954	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF990571	MF990589	MF990601	MF990614
<i>C. curcumae</i>	IMI 288937*	<i>Curcuma longa</i>	India	GU227991	GU228187	GU228285	GU227893

continued...

<i>C. jasminigenum</i>	LLTX-01*	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	HM131508	HM153770	HM131499	HM131513
<i>C. tropicicola</i>	BCC38877* ³	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	JN050218	JN050246	JN050229	JN050240
<i>C. orchidearum</i>	CORCX6*	<i>Cattleya</i> sp.	Yunnan	HM581997	HM585416	HM585393	HM585403
<i>C. orchidearum</i>	CORCG3	<i>Cymbidium hookerianum</i>	Guizhou	HM581996	HM585418	HM585392	HM585402
<i>C. orchidearum</i>	CORCX11	<i>Oncidium flexuosum</i>	Yunnan	HM581998	HM585417	HM585394	HM585404
<i>Colletotrichum</i> sp.	CMM2936	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF383474	MF383473	MF383470	MF383467
<i>Colletotrichum</i> sp.	CMM2947	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF383476	MF383471	MF383468	MF383465
<i>Colletotrichum</i> sp.	CMM2949	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brazil	MF383475	MF383472	MF383469	MF383466

534 1= CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures (Netherlands), BCC=BIOTEC, (Bangkok), MFLUCC =

535 Mae Fah Luang University, IMI = CABI Genetic Resource Collection (UK), CMM = Culture Collection of

536 Phytopathogenic Fungi "Prof. Maria Menezes", Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brazil), URM =

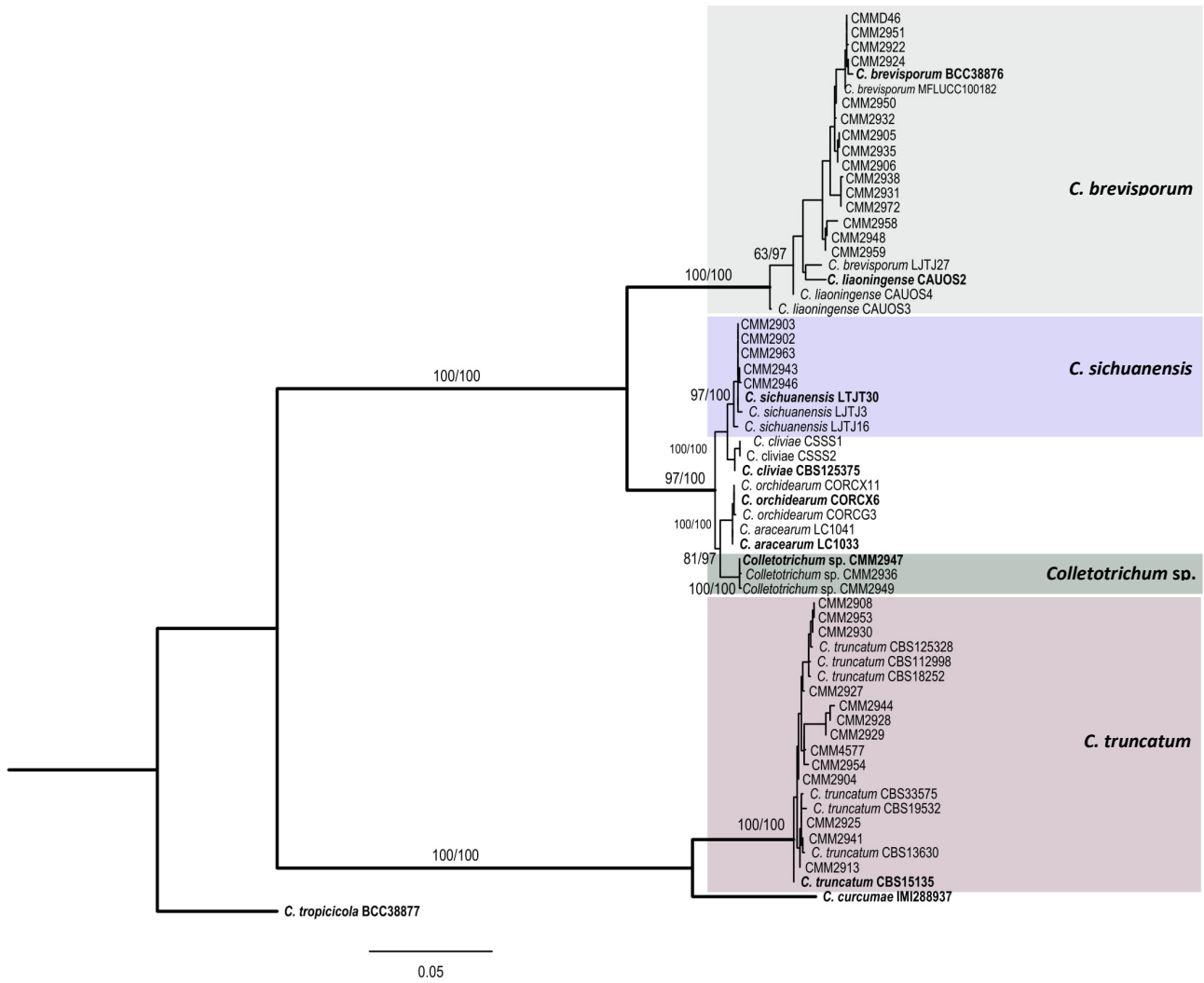
537 Culture Collection Micoteca URM, Department of Mycology, Universidade Federal de Pernambuco (Brazil).

538 "*" indicates ex-holotype or ex-epitype cultures. 2= Sequences generated in the present study are emphasized

539 in bold. "-" indicates missing data. 3= outgroup.

540

541



564 *Colletotrichum tropicicola* was used as an outgroup.

565

566

567 **Figure 2.** Maximum likelihood trees of individual gene ACT (actin). The branch
568 support values for maximum likelihood and Bayesian inference are shown above the
569 branches. The ex-type isolates are in bold font. *Colletotrichum tropicicola* was used as
570 an outgroup.

571

572 **Figure 3.** Maximum likelihood trees of individual gene GAPDH (glyceraldehyde 3-
573 phosphate dehydrogenase). The branch support values for maximum likelihood and
574 Bayesian inference are shown above the branches. The ex-type isolates are in bold font.
575 *Colletotrichum tropicicola* was used as an outgroup.

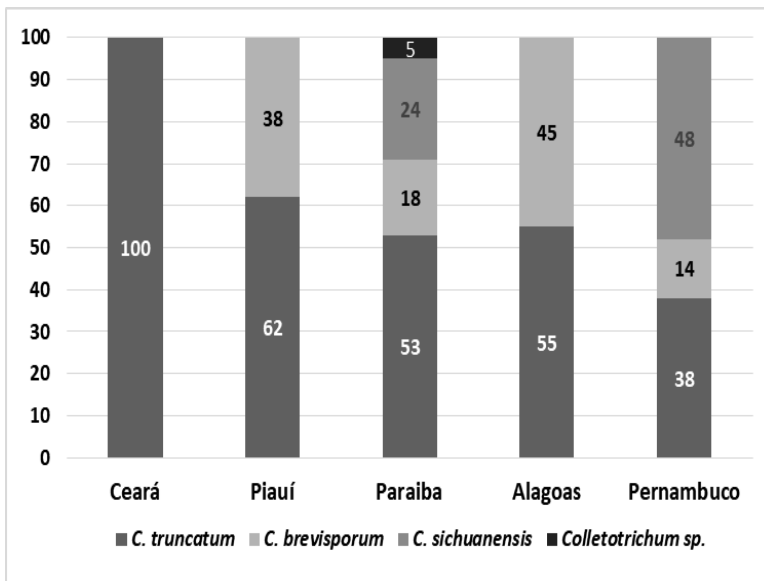
576

577 **Figure 4.** Maximum likelihood trees of individual genes: TUB2 (β -tubulin). The branch
578 support values for maximum likelihood and Bayesian inference are shown above the
579 branches. The ex-type isolates are in bold font. *Colletotrichum tropicicola* was used as
580 an outgroup. – bipartition not found in Bayesian analysis.

581

582 **Figure 5.** Maximum likelihood trees of individual gene ITS (nuclear rDNA). The
583 branch support values for maximum likelihood and Bayesian inference are shown above
584 the branches. The ex-type isolates are in bold font. *Colletotrichum tropicicola* was used
585 as an outgroup. – bipartition not found in Bayesian analysis.

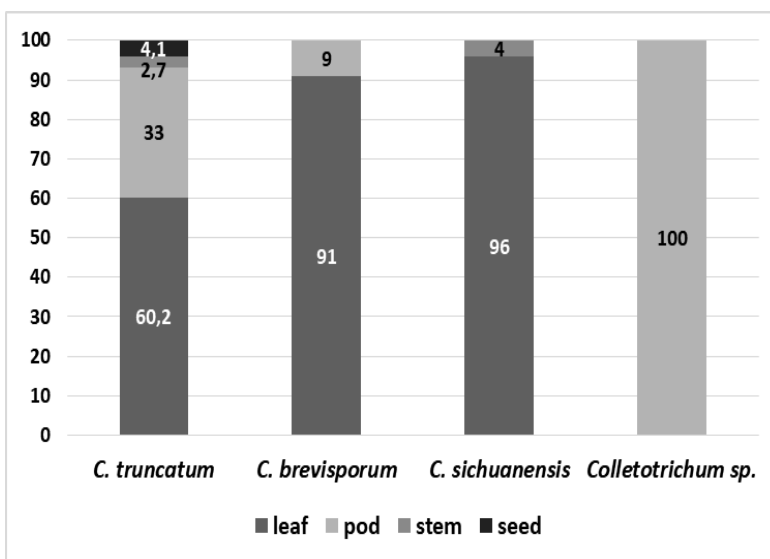
586



587

588 **Figure 6.** Isolation rate (%) of *Colletotrichum* species causing anthracnose in lima bean

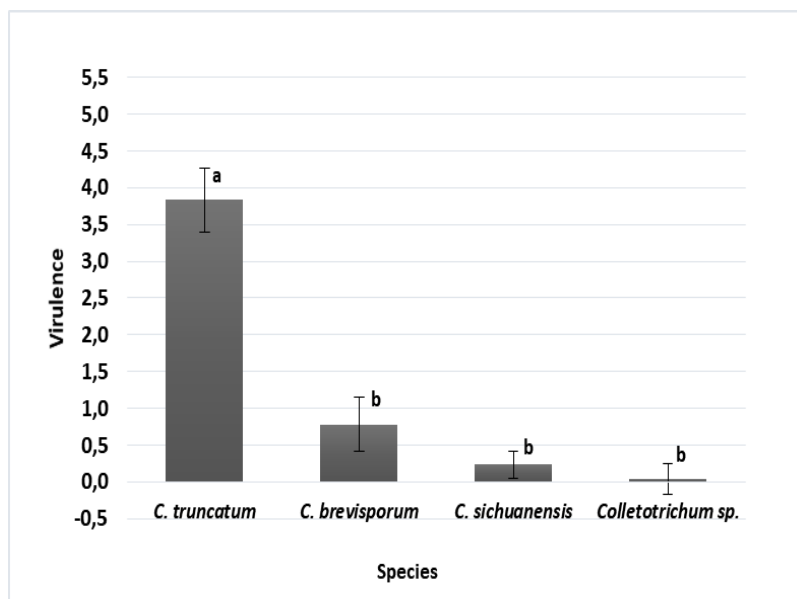
589 according to the state of origin.



590

591 **Figure 7.** Prevalence (%) of *Colletotrichum* species causing anthracnose in lima bean

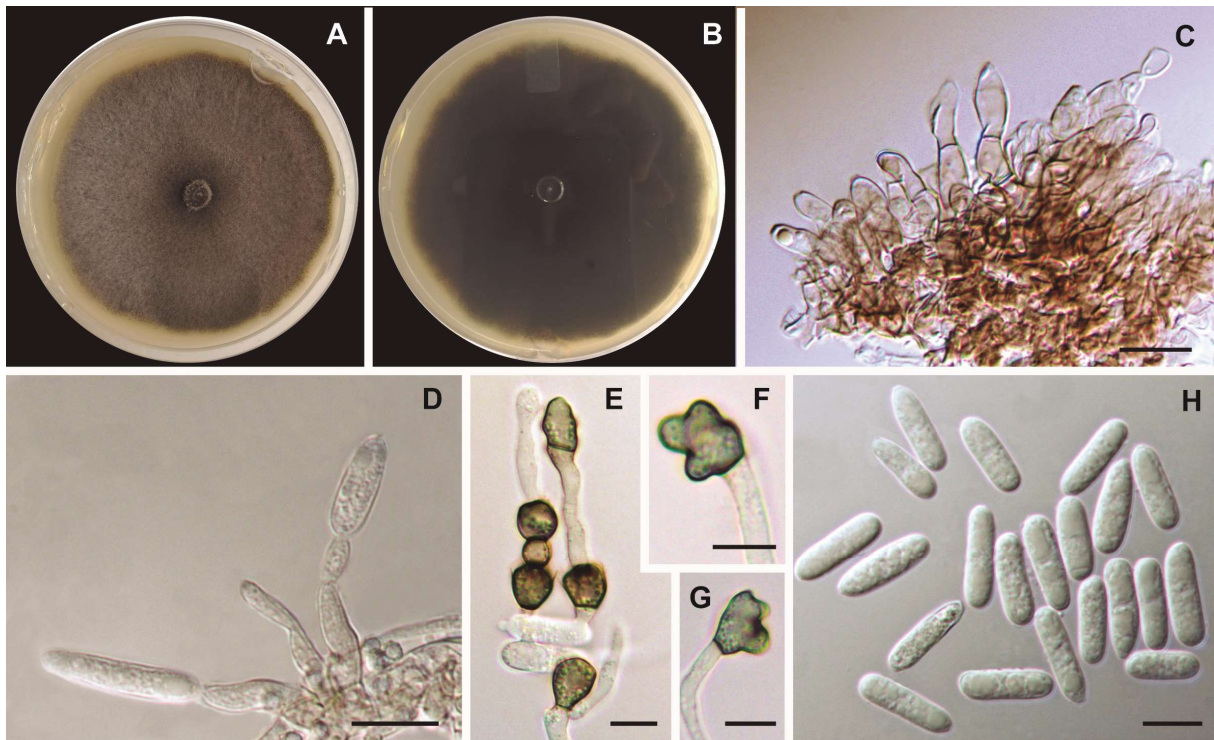
592 according to the plant organ sampled.



593

594 **Figure 8.** Virulence of *Colletotrichum* species on lima beans on the fifth day after
595 inoculation. Control represents plants not inoculated with the pathogen. Averages
596 followed by the same letter are statistically the same by the Kruskal-Wallis test at
597 0.05%.

598



599

600 **Figure 9.** *Colletotrichum* sp. (from holotype). Colonies on PDA at 7 days after
 601 inoculation (a) upper and (b) reverse, (c) Conidiophores. (d) Conidiogenous cells, (e-g)
 602 Apressoria. (h) Conidia. Scale bars=10 µm.

Capítulo III

First report of anthracnose caused by *Colletotrichum sichuanensis* on *Phaseolus lunatus* in Brazil

Plant Disease
v.102, n. 3, pg. 680, 2018.

1 **First report of Anthracnose caused by *COLLETOTRICHUM SICHUANENSIS* on *PHASEOLUS LUNATUS* in**
 2 **Brazil**

3 G.R.S. Cavalcante, W.A.S. Vieira, S.J. Michereff, Departamento de Agronomia, Universidade
 4 Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; B.M. Barguil,
 5 Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, 64078-213, Piauí,
 6 Brazil; V.P. Doyle, Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State
 7 University AgCenter, Baton Rouge, LA 70803; M.P.S. Câmara, Departamento de
 8 Agronomia, Universidade 8 Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco,
 9 Brazil.

10
 11 The lima bean (*PHASEOLUS LUNATUS*) is of cultural importance in the Northeast region of Brazil as
 12 source of income and food for the population. Among the diseases impacting lima bean
 13 production, anthracnose caused by the genus *COLLETOTRICHUM* is among the most prominent. In
 14 2015, lima-bean leaves with typical symptoms of anthracnose were collected in five states of
 15 northeastern Brazil, including Pernambuco, Paraíba, Piauí, Ceará and Alagoas. The symptoms
 16 are characterized by reddish spots on the leaf blade and along the primary and secondary veins,
 17 resulting in wrinkled leaves. On pods and stems, the lesions are depressed and reddish with
 18 developmental acervuli. Small pieces of leaf tissue from the periphery of the lesions were surface
 19 disinfested (1 min in 70% alcohol, 2 min in 1% NaOCl, and rinsed with sterile water), plated on
 20 potato dextrose agar (PDA), and incubated at 25°C for 7 days. Colonies that were
 21 morphologically similar to *COLLETOTRICHUM* spp. were transferred to PDA and preserved. In
 22 order to identify the *COLLETOTRICHUM* species, partial sequences of glyceraldehyde-3-phosphate
 23 dehydrogenase (GAPDH), internal transcribed spacer (ITS), actin (ACT), and β -tubulin
 24 (TUB2) regions were generated for five isolates and deposited in GenBank (accession nos
 25 MF279901—MF279921). Sequences representing ex-type and authentic isolates of species
 26 closely related based on the BLAST results were aligned with the aforementioned sequences
 27 and a maximum likelihood phylogenetic analysis was used to confirm the identity. The
 28 resulting maximum likelihood topology placed the isolates from lima bean in the same clade as
 29 *C. SICHUANENSIS* with 93% bootstrap support. Morphological and cultural characteristics were
 30 examined on PDA at 25°C under continuous fluorescent light for 7 days. Isolates presented
 31 white to grayish mycelium, with dark brown to dark gray reverse. Conidia on PDA were
 32 hyaline, cylindrical, aseptate, 7.8—11 μm in length, and 2.0—4.0 μm in width ($N=30$). The
 33 conidial measurements were smaller than the original description of *C. SICHUANENSIS* (Liu et al.
 34 2016) indicating morphological characteristics are variable for the species, as observed in other
 35 *COLLETOTRICHUM* species (Cai et al. 2009). However, the phylogenetic analysis confidently
 36 assigned the isolates to the species *C. SICHUANENSIS*. In order to confirm pathogenicity, five
 37 replicate 40-day-old lima bean plants, without any symptom of anthracnose, were sprayed with
 38 a conidial suspension (10^5 conidia mL^{-1}) from each isolate. Plants inoculated with sterilized
 39 distilled water were used as a control. The plants were placed in a humid chamber for 36 hours
 40 at 25°C with a photoperiod of 12 h. Typical symptoms of anthracnose were observed 5 days
 41 after inoculation and no symptoms were observed on control. The pathogen was reisolated from
 42 the lesions, fulfilling Koch's postulates. *C. SICHUANENSIS* was originally described as causing
 43 anthracnose in peppers in China's Sichuan province. To our knowledge, this is the first report of
 44 *C. SICHUANENSIS* in Brazil and causing anthracnose in lima bean.

45
 46 **REFERENCES:**

- 47 Cai, F., et al. 2009. Fungal Divers. 39:183.
 48 Liu, F., et al. 2016. Sci Rep. 6:32761.

Capítulo IV

Adaptabilidade comparativa de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em feijão-fava no Brasil

Journal of Phytopathology
JCR = 0,853

1 **Adaptabilidade comparativa de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em**
2 **feijão-fava no Brasil**

3

4 **Gerusa Rodrigues dos Santos Cavalcante¹ | Beatriz Meireles Barguil² | Tayná Mendes de**
5 **Albuquerque² | Sami Jorge Michereff¹ | Marcos Paz Saraiva Câmara¹**

6

7 ¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900

8 Recife, PE, Brasil

9 ²Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Piauí, 64003-120 Teresina, PI, Brasil

10

11 **Correspondência**

12 S. J. Michereff, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

13 52171-900 Recife, Brasil.

14 Email: sami.michereff@ufrpe.br

15

16 **Informação de financiamento**

17 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil

18 **Resumo**

19 A antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma importante doença do
20 feijão-fava no Nordeste brasileiro. Este estudo teve como objetivos comparar a adaptabilidade
21 saprofítica de quatro espécies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. sichuanensis*, *C.*
22 *truncatum* e *Colletotrichum* sp. nova) sob diferentes temperaturas, bem como comparar a
23 agressividade de *C. brevisporum* e *C. truncatum* em feijão-fava sob a influência da
24 temperatura e do período de molhamento, e analisar os componentes epidemiológicos da
25 doença induzida pelas quatro espécies do patógeno. As espécies de *Colletotrichum* diferiram
26 entre si em relação à temperatura ótima para crescimento micelial, esporulação, germinação
27 dos esporos e formação de apressórios. *Colletotrichum truncatum* requereu a maior
28 temperatura para o crescimento micelial e apresentou a menor taxa de crescimento. A
29 temperatura ótima para esporulação de *C. brevisporum* foi inferior às outras espécies,
30 enquanto a capacidade de esporulação dessa espécie foi superior às demais. As temperaturas
31 ótimas para germinação dos esporos e formação de apressórios por *Colletotrichum* sp. nova
32 foram inferiores às outras espécies. *Colletotrichum truncatum* apresentou a maior germinação
33 de esporos. Quando comparada a agressividade de *C. brevisporum* e *C. truncatum* em folhas
34 destacadas de feijão-fava, a segunda espécie evidenciou maior agressividade e a combinação
35 de 30°C com 36 horas de molhamento foliar foi a mais adequada para a expressão da máxima
36 agressividade. Plantas inoculadas com *C. truncatum* apresentaram menor período de
37 incubação e maior severidade da doença. As diferenças na adaptabilidade das espécies de
38 *Colletotrichum* devem ser consideradas no desenvolvimento de estratégias de manejo da
39 antracnose em feijão-fava.

40 **PALAVRAS-CHAVE**

41 Adaptabilidade saprofítica, adaptabilidade patogênica, *Phaseolus lunatus*, agressividade,
42 temperatura, molhamento foliar

43 Abstract

44 Anthracnose, caused by species of the genus *Colletotrichum*, is an important disease of lima
45 bean in the Brazilian Northeast. The objective of this study was to compare the saprophytic
46 fitness of four species of *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. sichuanensis*, *C. truncatum* and
47 *Colletotrichum* sp. nova) under different temperatures, as well as to compare the
48 aggressiveness of *C. brevisporum* and *C. truncatum* in lima bean under the influence of
49 temperature and wetting period, and to analyze the epidemiological components of the disease
50 induced by the four species of the pathogen. The *Colletotrichum* species differed in relation to
51 the optimal temperature for mycelial growth, sporulation, spore germination and apresso-
52 rous formation. *Colletotrichum truncatum* required the highest temperature for mycelial growth
53 and showed the lowest growth rate. The optimal temperature for sporulation of *C.*
54 *brevisporum* was lower than the other species, while the sporulation capacity of this species
55 was higher than the others. The optimal temperatures for spore germination and apresso-
56 rous formation by *Colletotrichum* sp. new were lower than the other species. *Colletotrichum*
57 *truncatum* showed the highest spore germination. When comparing the aggressiveness of *C.*
58 *brevisporum* and *C. truncatum* on leaves of lima bean, the second species showed greater
59 aggressiveness and the combination of 30°C and 36 hours of leaf wetness was the most
60 adequate for the expression of maximum aggressiveness. Plants inoculated with *C. truncatam*
61 presented a shorter incubation period and greater disease severity. Differences in the fitness of
62 *Colletotrichum* species should be considered in the development of strategies for anthracnose
63 management in lima bean.

64

65 KEYWORDS

66 Saprophytic fitness, pathogenic fitness, *Phaseolus lunatus*, aggressiveness, temperature, leaf
67 wetness

68 1 | INTRODUÇÃO

69 O feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) é uma importante fonte de proteína na alimentação humana,
70 sendo consumido como grãos verdes ou secos ou como vagens verdes (Soares et al., 2010). A
71 região Nordeste é responsável por 99% da produção brasileira dessa leguminosa, atingindo em
72 2016 uma área plantada de 20.196 ha e produção de 3.609 toneladas (Instituto Brasileiro de
73 Geografia e Estatística, 2017). Nessa região, o feijão-fava constitui excelente fonte alimento e
74 de renda para os pequenos agricultores, sendo produzida em consórcio com outras culturas
75 (Soares et al., 2010).

76 A ocorrência de doenças tem contribuído para a redução da produtividade do feijão-
77 fava no Nordeste brasileiro, com destaque para a antracnose, causada por espécies de
78 *Colletotrichum* (Carvalho et al., 2015; Cavalcante, 2018; Souza et al., 2017). Até o momento,
79 não existem informações precisas sobre as perdas de produção causadas pela antracnose em
80 feijão-fava. Essa doença é caracterizada por manchas necróticas avermelhadas nas folhas,
81 pecíolos, hipocótilo e vagens. Em estágios avançados da doença, formam-se massas de
82 esporos esbranquiçados, com numerosas setas (Carvalho et al., 2015; Paula Junior et al., 1995;
83 Souza et al., 2017).

84 No Brasil, a antracnose do feijão-fava era atribuída exclusivamente a *Colletotrichum*
85 *truncatum* (Schw.) Andrus & Moore (Carvalho et al., 2015; Paula Junior et al., 1995). No
86 entanto, estudos filogenéticos realizados recentemente com isolados de *Colletotrichum*
87 coletados no Nordeste brasileiro, baseados em análises multigênicas, revelaram que além de
88 *C. truncatum*, essa doença era causada por *C. cliviae* e *C. fruticola* (Souza et al., 2017), bem
89 como por *C. brevisporum*, *C. sichuanensis* e uma nova espécie de *Colletotrichum* (Cavalcante,
90 2018).

91 Com o registro de diversas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do
92 feijão-fava, é importante investigar se existe diferença entre estas quanto à adaptabilidade. A

93 adaptabilidade biológica de um patógeno de planta é descrita como a habilidade competitiva
94 de um organismo para persistir em um ambiente por um longo período de tempo, comparado a
95 outros indivíduos nas mesmas condições (Nelson, 1979), sendo constituída de adaptabilidade
96 saprofítica e patogênica (Harteveld et al., 2014).

97 A adaptabilidade relativa de um isolado ou espécie de patógeno de planta é
98 determinada por suas propriedades biológicas intrínsecas, pela resistência e heterogeneidade
99 da população hospedeira, pela densidade populacional e relação genética dos isolados
100 concorrentes, e pelo ambiente físico (Zhan & McDonald, 2013). Portanto, além dos aspectos
101 biológicos comparativos, a adaptabilidade pode ter importantes implicações para o manejo das
102 doenças em função das respostas às condições ambientais e do hospedeiro (Balodi et al., 2017;
103 Milgroom, 2015).

104 A capacidade competitiva pode ser inferida indiretamente por componentes de
105 adaptabilidade. Como a adaptabilidade é relativa, deve ser estimada pela mensuração de
106 caracteres que propiciam alguma vantagem adaptativa entre os indivíduos, como taxa de
107 crescimento micelial, produção de esporos, capacidade de germinação dos esporos e
108 formação de apressórios, que são componentes que avaliam a adaptabilidade saprofítica de
109 fungos fitopatogênicos, e a agressividade e os componentes epidemiológicos que possibilitam
110 a análise da adaptabilidade patogênica (Antonovics & Alexander, 1989; Harteveld et al.,
111 2014; Milgroom, 2015).

112 Até o momento, inexistem em nível mundial estudos sobre a adaptabilidade
113 comparativa de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em feijão-fava. Diante
114 disso, esse trabalho teve como objetivos comparar (a) o crescimento, esporulação, germinação
115 de esporos e formação de apressórios de quatro espécies de *Colletotrichum* sob a influência da
116 temperatura, (b) a agressividade de duas espécies de *Colletotrichum* em folhas destacadas de
117 feijão-fava sob a influência da temperatura e do período de molhamento, e (c) os componentes

118 epidemiológicos da antracnose em plantas de feijão-fava induzida por quatro espécies de
119 *Colletotrichum*.

120

121 **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

122 **2.1 | Isolados fúngicos**

123 Foram utilizados isolados de quatro espécies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C.*
124 *sichuanensis*, *C. truncatum* e *Colletotrichum* sp. nova, obtidos de plantas de feijão-fava
125 coletadas no Nordeste do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram identificados previamente por
126 análise filogenética baseada na sequência parcial dos genes gliceraldeído-3-fosfato-
127 desidrogenase (GAPDH), b-tubulina (TUB2), actina (ACT) e da região do espaço interno
128 transcrito (ITS) (Cavalcante, 2018). Os isolados foram obtidos da Coleção de Culturas de
129 Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (CMM) da Universidade Federal Rural de
130 Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil). Culturas estoque foram mantidas em tubos de
131 ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA; Acumedia, Lansing, EUA) inclinado a 5°C no
132 escuro.

133

134 **2.2 | Adaptabilidade saprofítica das espécies de *Colletotrichum* sob a influência da** 135 **temperatura**

136 As espécies de *Colletotrichum* foram avaliadas em relação à taxa de crescimento micelial,
137 produção de esporos, capacidade de germinação dos esporos e formação de apressórios, sob
138 diferentes temperaturas, considerados importantes componentes de adaptabilidade saprofítica.

139 Foram utilizados 12 isolados, sendo três isolados de cada uma das quatro espécies de
140 *Colletotrichum* (Tabela 1). Para determinar a influência da temperatura no crescimento
141 micelial e na esporulação, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) foi removido da margem
142 de uma cultura com 7 dias de idade e transferido para o centro de placa de Petri de 90 mm de

143 diâmetro contendo BDA. Cinco placas de cada isolado foram colocadas em incubadoras com
144 temperaturas controladas a 15, 20, 25, 30 e 35°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Antes do uso,
145 as incubadoras foram equilibradas nas respectivas temperaturas por no mínimo 12 horas. O
146 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 12x5, com cinco
147 repetições (placas) por combinação isolado x temperatura. O diâmetro da colônia (mm) foi
148 mensurado até o sétimo dia após a incubação em duas direções perpendiculares e obtida a
149 média, para calcular a taxa de crescimento micelial (mm/dia).

150 A esporulação foi analisada após a avaliação do crescimento micelial, pela adição de
151 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri e raspagem da superfície da
152 cultura com escova de cerdas macias. A suspensão foi peneirada em camada dupla de gaze e a
153 concentração de conídios foi estimada (conídios/mL) com o auxílio da câmara de Neubauer.
154 Foram efetuadas três contagens de conídios de cada placa (suspensão), obtendo-se a média.

155 Para a avaliação da germinação de conídios e formação de apressórios, após a
156 contagem dos conídios, a suspensão foi homogeneizada por agitação mecânica em vortex e
157 retirada uma alíquota de 200µL, que foi depositada sobre uma lâmina de vidro e coberta com
158 lamínula. O conjunto foi acondicionado em câmara úmida, constituída de bandejas com três
159 camadas de papel de filtro umedecido com água destilada e cobertas com plástico, e mantido
160 nas mesmas condições de temperatura descritas acima e no escuro. O delineamento
161 experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição
162 constituída por uma lâmina. Após 24 horas de incubação, com o auxílio de microscópio ótico
163 foi efetuada a contagem do número de conídios germinados e não germinados em cada
164 lâmina, bem como o número de conídios germinados e com a formação de apressórios. Foi
165 considerado como conídio germinado aquele que apresentava o comprimento do tubo
166 germinativo com pelo menos duas vezes o seu comprimento. Para efeito de cálculo, foi feita

167 média de 50 conídios em dois campos da lâmina por repetição, determinando-se a
168 porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios.

169

170 **2.3 | Agressividade de espécies de *Colletotrichum* em feijão-fava sob a influência da** 171 **temperatura e do período de molhamento**

172 Foram utilizados seis isolados, sendo três isolados de *C. brevisporum* e três isolados de *C.*
173 *truncatum* (Tabela 1) e o método de inoculação em folhas destacadas. Para obtenção do
174 inóculo, os isolados foram cultivados em BDA a 25°C sob alternância luminosa. Após 15 dias,
175 foram preparadas suspensões de conídios pela adição de água destilada esterilizada à
176 superfície das culturas, raspagem, filtragem em camada dupla de gaze e ajuste da
177 concentração de conídios com o auxílio de hemacitômetro. Folhas completamente expandidas
178 foram destacadas de plantas de feijão-fava (genótipo UFPI-891) com 35 dias de idade,
179 cultivadas em casa de vegetação. Em seguida, pedaços de algodão umedecidos com água
180 esterilizada foram colocados nos pecíolos e as folhas foram colocadas em bandejas plásticas
181 com o fundo coberto por uma camada de algodão sobreposta por folha papel de filtro
182 umedecida com água esterilizada (150 mL/bandeja). Para evitar o contato da folha com a
183 água, duas lâminas de vidro foram colocadas abaixo da folha. As bandejas contendo as folhas
184 foram mantidas em incubadoras com temperaturas de 20, 25 e 30°C, sob luminosidade de 12
185 horas. Posteriormente, as folhas foram inoculadas com os isolados na concentração de 1×10^5
186 conídios/mL, pela atomização da suspensão de conídios até o ponto de escorrimento. A
187 testemunha foi pulverizada com água destilada esterilizada. Após a inoculação, as bandejas
188 foram cobertas com sacos plásticos umedecidos para manter a umidade relativa elevada (\geq
189 95%) e atingir o ponto de molhamento foliar. As folhas foram submetidas a quatro períodos
190 de molhamento: 0, 12, 24 e 36 horas. No tratamento sem molhamento (= 0), as bandejas não
191 foram cobertas com sacos plásticos, enquanto nos demais os sacos plásticos, a camada de

192 algodão e a folha de papel de filtro umedecidos foram removidos ao final de cada período de
193 molhamento. Após a inoculação e colocação de câmara úmida, as bandejas foram mantidas nas
194 temperaturas iniciais de incubação. As espécies de *Colletotrichum* foram inoculadas
195 separadamente e para cada espécie o delineamento experimental foi inteiramente casualizado,
196 em arranjo fatorial 3x3x4, com nove repetições (folíolos) por combinação isolado x
197 temperatura x período de molhamento. A agressividade dos isolados de *C. truncatum* foi
198 avaliada aos três dias após a inoculação e dos isolados de *C. brevisporum* aos cinco dias, pela
199 mensuração da porcentagem da área de cada folíolo com sintomas da doença com o auxílio do
200 programa Asses 2.0 (The American Phytopathological Society, St. Paul, EUA).

201

202 **2.4 | Componentes epidemiológicos da antracnose em plantas de feijão-fava induzida por** 203 **espécies de *Colletotrichum***

204 Foram utilizados 12 isolados de *Colletotrichum*, sendo três isolados de cada uma das quatro
205 espécies (Tabela 1). O inóculo foi obtido como descrito anteriormente e a inoculação foi
206 realizada em plantas de feijão-fava (genótipo UFPI-894), cultivadas em casa de vegetação.
207 Aos 35 dias após a emergência foram selecionadas duas folhas por planta e cada folha foi
208 inoculada nas superfícies adaxial e abaxial com os isolados na concentração de 1×10^5
209 conídios/mL, pela atomização da suspensão de conídios até o ponto de escorrimento. A
210 testemunha foi pulverizada com água destilada esterilizada. Após a inoculação, as plantas
211 foram mantidas em câmara úmida por 36 horas, constituída de sacos plásticos umedecidos, e
212 em sala de incubação a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sob alternância luminosa. O delineamento experimental foi
213 inteiramente casualizado, com cinco repetições por isolado, sendo cada repetição constituída
214 por uma planta com duas folhas inoculadas.

215 Os folíolos foram avaliados diariamente após a retirada da câmara úmida em relação à
216 presença de sintomas e severidade da doença. A severidade foi estimada com o auxílio de

217 escala descritiva de 0 a 5 (0 = ausência de sintoma; 1 = traços a 10% da área foliar com
218 sintomas; 2 = de 11 a 25% da área foliar com sintomas; 3 = de 26 a 50% da área foliar com
219 sintomas, sem queda de folíolo; 4 = de 51 a 75% da área foliar com sintomas, sem ou com
220 queda de um dos folíolos; 5 = de 76 a 100% da área foliar com sintomas, sem ou com queda
221 de dois ou três folíolos) (Carvalho, 2009) e posterior cálculo do índice de severidade da
222 doença (ISD) para cada isolado em cada avaliação $ISD = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5)$
223 $\times 100 / (n^\circ \text{ total de folhas} \times \text{grau máximo da escala})$, onde n é o número de folhas em cada
224 nível da escala (Mckinney, 1923). Baseado nessas avaliações, foram determinados os
225 seguintes componentes epidemiológicos da antracnose: a) período de incubação (PI),
226 representado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença;
227 b) severidade inicial (SEVI), aos dois dias após a inoculação; c) severidade final (SEVF), aos
228 cinco dias após a inoculação; d) área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD),
229 calculada pela expressão: $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ti}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de
230 severidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações
231 (Shaner & Finney, 1977).

232

233 **2.5 | Análises estatísticas**

234 Todos os experimentos foram repetidos e os dados das duas replicações independentes foram
235 agrupados após a realização da análise de homogeneidade das variâncias usando o teste de
236 Levene e nenhuma heterogeneidade ser detectada ($P > 0,05$). Os dados obtidos foram
237 submetidos à análise de variância (ANOVA) e em todos os experimentos os isolados da
238 mesma espécie de *Colletotrichum* não diferiram significativamente ($P > 0,05$) em relação às
239 variáveis analisadas. Portanto, nas análises estatísticas foram utilizados os dados agrupados de
240 cada espécie de *Colletotrichum*. Para os experimentos de crescimento micelial, esporulação,
241 germinação de esporos e formação de apressórios sob diferentes temperaturas, os dados foram

242 submetidos às análises de regressão linear e não-linear tendo temperatura como variável
243 independente, com o auxílio do programa TableCurve™ 2D 5.01 (Systat Software Inc.,
244 Chicago, EUA). A escolha do modelo para cada experimento foi determinada pelo coeficiente
245 de determinação (R^2), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros. As significâncias
246 das regressões foram verificadas pelo teste F ($P \leq 0,05$) e de seus parâmetros pelo teste t
247 ($P \leq 0,05$). As variáveis de interesse foram estimadas utilizando os modelos de regressão e os
248 sumários numéricos fornecidos pelo programa TableCurve. Os dados das variáveis estimadas
249 por regressão nos experimentos envolvendo temperatura, bem como os dados obtidos nos
250 experimentos de agressividade em folhas destacadas e componentes epidemiológicos em
251 plantas, foram submetidos à ANOVA e as médias das espécies de *Colletotrichum* foram
252 comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ($P=0,05$). Com
253 exceção das análises de regressão, as demais análises foram realizadas com auxílio do
254 programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA).

255

256 **3 | RESULTADOS**

257 **3.1 | Crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* sob a influência da temperatura**

258 Todos as espécies de *Colletotrichum* cresceram nas temperaturas entre 15°C e 30°C, enquanto
259 nenhuma cresceu a 35°C. Os maiores crescimentos miceliais foram registrados na temperatura
260 de 30°C (Figura 1A). O modelo de regressão polinomial de terceiro grau (cúbico)
261 [$y=a+bx+cx^2+dx^3$] proporcionou excelente ajuste dos dados de crescimento micelial em
262 função da temperatura para todas as espécies de *Colletotrichum*, com valores de $R^2 \leq 0,970$
263 (Tabela 2). Nesse modelo, y representa o crescimento micelial em determinada temperatura
264 (x), enquanto a , b , c e d são parâmetros da regressão. Com a aplicação da derivada aos
265 parâmetros é possível estimar a temperatura ótima para o crescimento micelial e a taxa de
266 crescimento micelial nessa temperatura. As temperaturas influenciaram no crescimento

267 micelial das quatro espécies de *Colletotrichum*, que diferiram entre si em relação à
268 temperatura ótima para o crescimento ($P=0,002$) e à taxa de crescimento nessa temperatura
269 ($P=0,001$). *Colletotrichum truncatum* requereu a maior temperatura ótima para o crescimento
270 micelial (28,0°C) e apresentou a menor taxa de crescimento (8,5 mm/dia) comparada às outras
271 espécies, que não diferiram entre si (Tabela 2).

272

273 3.2 | Esporulação das espécies de *Colletotrichum* sob a influência da temperatura

274 Nenhuma espécie de *Colletotrichum* esporulou a 35°C e somente *Colletotrichum* sp. nova não
275 esporulou a 15°C. Todas as espécies esporularam nas temperaturas entre 20°C e 30°C. A
276 maior esporulação de *C. brevisporum* foi registrada na temperatura de 25°C, enquanto das
277 demais espécies em 30°C (Figura 1B). O modelo de regressão polinomial de sexto grau
278 [$y=a+bx^2+cx^4+dx^6$] proporcionou excelente ajuste dos dados de esporulação em função da
279 temperatura para todas as espécies de *Colletotrichum*, com valores de $R^2 \leq 0,981$ (Tabela 3).
280 Nesse modelo, y representa a esporulação em determinada temperatura (x), enquanto a , b , c e
281 d são parâmetros da regressão. Com a aplicação da derivada aos parâmetros é possível estimar
282 a temperatura ótima para a esporulação e a esporulação nessa temperatura. As temperaturas
283 influenciaram na esporulação das quatro espécies de *Colletotrichum*, que diferiram entre si em
284 relação à temperatura ótima para a esporulação ($P=0,001$) e à esporulação nessa temperatura
285 ($P=0,004$). A temperatura ótima para a esporulação de *C. brevisporum* (25,6°C) foi inferior às
286 constatadas para as outras espécies, enquanto a capacidade de esporulação dessa espécie
287 ($32,3 \times 10^4$ conídios/mL) foi superior as demais. As maiores temperaturas ótimas para
288 esporulação foram requeridas por *Colletotrichum* sp. (30,5°C) e *C. truncatum* (30,4°C), sem
289 diferiram entre si. Essa última espécie apresentou a menor capacidade de esporulação
290 ($10,6 \times 10^4$ conídios/mL) (Tabela 3).

291 3.3 | Germinação de esporos das espécies de *Colletotrichum* sob a influência da 292 temperatura

293 Todos as espécies de *Colletotrichum* germinaram os esporos nas temperaturas entre 15°C e
294 35°C. A maior germinação de *Colletotrichum* sp. nova foi registrada na temperatura de 25°C,
295 enquanto das demais espécies a 30°C (Figura 1C). O modelo de regressão não-linear
296 Lorentzian [$y = a/(1+((x-b)/c)^2$)] proporcionou excelente ajuste dos dados de germinação de
297 esporos em função da temperatura para todas as espécies de *Colletotrichum*, com valores de
298 $R^2 \leq 0,968$ (Tabela 4). Neste modelo, y representa a porcentagem de germinação de esporos em
299 determinada temperatura (x), enquanto a , b e c são parâmetros da regressão. Com o cálculo
300 das derivadas desses parâmetros é possível estimar o pico máximo de x em função de y , sendo
301 interpretado como a temperatura ótima para a germinação de esporos e o pico máximo de y
302 em função de x , sendo interpretado como a porcentagem máxima de germinação de esporos na
303 temperatura ótima. As temperaturas influenciaram na germinação dos esporos das quatro
304 espécies de *Colletotrichum*, que diferiram entre si em relação à temperatura ótima para a
305 esporulação ($P=0,002$) e à esporulação nessa temperatura ($P=0,019$). A temperatura ótima
306 para a germinação dos esporos de *Colletotrichum* sp. nova (25,6°C) foi inferior às outras
307 espécies, que não diferiram entre si. *Colletotrichum truncatum* se destacou das demais
308 espécies ao apresentar a maior germinação de esporos (95,3%), enquanto a germinação dos
309 esporos de *C. brevisporum* (58,2%) foi inferior as demais (Tabela 4).

310

311 3.4 | Formação de apressórios das espécies de *Colletotrichum* sob a influência da 312 temperatura

313 Somente *C. truncatum* formou apressórios em todas as temperaturas avaliadas (15°C a 35°C),
314 enquanto as demais espécies não formaram apressórios em 15°C e *Colletotrichum* sp. nova
315 também não formou apressórios em 35°C. A temperatura de 30°C foi a mais propícia para

316 formação de apressórios por *C. brevisporum*, *C. sichuanensis* e *C. truncatum*, enquanto
317 *Colletotrichum* sp nova. formou mais apressórios em 25°C (Figura 1D). O modelo de
318 regressão polinomial de quarto grau proporcionou excelente ajuste dos dados de formação de
319 apressórios em função da temperatura para todas as espécies de *Colletotrichum*, com valores
320 de $R^2 \leq 0,951$ (Tabela 5). Neste modelo, y representa a porcentagem de apressórios formados
321 em determinada temperatura (x), enquanto a , b e c são parâmetros da regressão. Foram
322 estimadas a temperatura ótima para a formação de apressórios e a porcentagem máxima de
323 apressórios formados nessa temperatura. As temperaturas influenciaram na formação de
324 apressórios pelas espécies de *Colletotrichum*, que diferiram entre si em relação à temperatura
325 ótima para a formação de apressórios ($P=0,001$) e à porcentagem de apressórios formados
326 nessa temperatura ($P=0,024$). A temperatura ótima para a formação de apressórios por
327 *Colletotrichum* sp. nova (24,4°C) foi inferior às outras espécies, que não diferiram entre si.
328 *Colletotrichum truncatum* e *C. sichuanensis* se destacaram das demais espécies ao
329 apresentarem maior capacidade de formação de apressórios ($>91,0$) (Tabela 5).

330

331 **3.5 | Agressividade de espécies de *Colletotrichum* em feijão-fava sob a influência da** 332 **temperatura e do período de molhamento**

333 A agressividade de *C. brevisporum* e *C. truncatum* em feijão-fava foi influenciada pela
334 temperatura e pelo período de molhamento (Tabela 6), sendo constatada interação
335 significativa ($P = 0,0004$) entre esses dois fatores. Nenhuma das espécies induziu sintomas de
336 antracnose na ausência de molhamento foliar, independentemente da temperatura.
337 *Colletotrichum brevisporum* não induziu sintomas na temperatura de 20°C, independente do
338 período de molhamento, enquanto nessa temperatura *C. truncatum* induziu sintomas a partir
339 de 24 horas de molhamento. Com 12 horas de molhamento, *C. brevisporum* induziu sintomas
340 somente em 30°C, enquanto as folhas inoculadas com *C. truncatum* apresentaram sintomas

341 nas temperaturas de 25 e 30 °C, havendo um aumento significativo da severidade da doença
342 com a elevação da temperatura. A maior agressividade das duas espécies de *Colletotrichum*
343 foi expressa quando as folhas inoculadas foram mantidas na combinação de 30°C e 36 horas
344 de molhamento foliar. No conjunto dos resultados, *C. truncatum* evidenciou maior
345 agressividade que *C. brevisporum* quando inoculado em folhas destacadas de feijão-fava
346 (Tabela 6).

347

348 **3.6 | Componentes epidemiológicos da antracnose em plantas de feijão-fava induzida por** 349 **espécies de *Colletotrichum***

350 Houve diferença significativa entre as espécies de *Colletotrichum* quando avaliados os
351 componentes epidemiológicos da antracnose em plantas de feijão-fava (Tabela 7). As plantas
352 inoculadas com *C. truncatam* apresentaram menor período de incubação da antracnose, tendo
353 sido necessário quase a metade do tempo para induzir os sintomas da doença quando
354 comparado às outras espécies. Além disso, as plantas inoculadas com essa espécie
355 expressaram maior severidade da doença em todas as avaliações, culminando com a maior
356 área abaixo da curva de progresso da doença. Por outro lado, *Colletotrichum* sp. nova e *C.*
357 *sichuanensis* tiveram comportamento similar em relação aos componentes epidemiológicos da
358 antracnose, apresentando os maiores valores de período de incubação e os menores valores de
359 severidade e área abaixo da curva de progresso da doença

360

361 **4 | DISCUSSÃO**

362 Esse estudo representa a primeira investigação sobre a adaptabilidade comparativa de espécies
363 de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em feijão-fava no Brasil. A adaptabilidade
364 saprofítica de *C. brevisporum*, *C. sichuanensis*, *C. truncatum* e *Colletotrichum* sp. nova, foi
365 comparada sob a influência da temperatura, considerando a capacidade de crescimento

366 micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios. Adicionalmente, foi
367 comparada a adaptabilidade patogênica das espécies, pela análise da agressividade de *C.*
368 *brevisporum* e *C. truncatum* em folhas destacadas feijão-fava sob a influência da temperatura
369 e do período de molhamento, bem como pela investigação dos componentes epidemiológicos
370 da antracnose em plantas de feijão-fava induzida pelas quatro espécies de *Colletotrichum*.

371 A temperatura exerceu influência significativa nos componentes de adaptabilidade
372 saprofítica das espécies de *Colletotrichum*, que diferiram entre si em relação à maioria das
373 variáveis analisadas. A incapacidade do crescimento micelial e esporulação a 35°C já foi
374 relatada previamente para várias espécies de *Colletotrichum* (Prusky et al., 2000; Sutton,
375 1992), sendo que temperaturas muito elevadas podem paralisar o metabolismo ou mesmo
376 dessecar as estruturas fúngicas (Agrios, 2005). Para a maioria dos componentes de
377 adaptabilidade analisados, a temperatura ótima foi superior a 25°C e para alguns muito
378 próximos a 30°C. Todos os isolados de *Colletotrichum* utilizados foram obtidos em regiões
379 que são caracterizadas por apresentarem temperaturas elevadas no período do cultivo de
380 feijão-fava. Portanto, isso confirma a observação de que a adaptabilidade de um indivíduo
381 pode ser influenciada não apenas pelos atributos genéticos, mas também pelo ambiente em
382 que foi encontrado (Antonovics & Alexander, 1989; Zhan & McDonald, 2013).

383 A diferença na temperatura ótima para o crescimento micelial entre as espécies de
384 *Colletotrichum* associadas ao feijão-fava no Brasil pode indicar que *C. truncatum* apresenta
385 maior adaptação em relação a este componente em temperaturas elevadas comparada às outras
386 espécies (*C. brevisporum*, *C. sichuanensis* e *Colletotrichum* sp. nova), que apresentaram
387 comportamentos similares entre si. Por outro lado, a menor taxa de crescimento micelial
388 apresentada por *C. truncatum* pode indicar uma menor capacidade de competição saprofítica
389 baseada no crescimento.

390 Ficou evidente a maior capacidade de produção de esporos por *C. brevisporum*
391 comparada a outras espécies, bem como a exigência de menor temperaturas para obter a
392 máxima esporulação. No entanto, essa espécie apresentou uma baixa eficácia na germinação
393 dos esporos e na formação dos apressórios, componentes nos quais *C. truncatum* se destacou
394 das demais espécies. Essas espécies não diferiram nas temperaturas ótimas para germinação
395 dos esporos e formação dos apressórios, indicando que as diferenças nesses componentes de
396 adaptabilidade estão relacionadas a características biológicas das espécies.

397 A incapacidade das espécies de *Colletotrichum* em induzirem sintomas nos
398 hospedeiros na ausência de molhamento foliar tem sido relatada frequentemente (Prusky et al.,
399 2000; Sutton, 1992), o que foi confirmada nesse estudo. A adaptabilidade de uma espécie
400 fúngica é consequência das alterações sofridas para adquirir uma característica vantajosa para
401 viver no ambiente (Antonovics & Alexander, 1989). Isso pode explicar o fato de *C. truncatum*
402 conseguir produzir sintomas mesmo em período de molhamento curto e em ter capacidade de
403 produzir sintomas em temperaturas mais baixas (20°C) ou ser mais agressivo em temperaturas
404 mais elevadas (30°C) que *C. brevisporum*.

405 A adaptabilidade patogênica de um fungo inclui um complexo de características como
406 agressividade, capacidade de infecção e velocidade de colonização dos tecidos do hospedeiro,
407 representados pelos componentes epidemiológicos (Antonovics & Alexander, 1989; Leach et
408 al., 2001). Nesse contexto, a vantagem adaptativa de *C. truncatum* ficou evidente sobre as
409 demais quando comparados os componentes epidemiológicos representados pelo período de
410 incubação, severidade inicial, severidade final e área abaixo da curva de progresso da doença.

411 Embora *C. brevisporum*, *C. sichuanensis* e *Colletotrichum* sp. nova tenham
412 apresentado maior crescimento micelial e esporulação que *C. truncatum*, este se destacou das
413 demais em relação à capacidade de germinação de esporos, formação de apressórios,
414 agressividade e componentes epidemiológicos. A teoria da flexibilidade de fitopatógenos em

415 explorar condições ecológicas e bióticas pelo desenvolvimento de mecanismos de
416 compensação foi apresentada por Aust et al. (1980), na qual a fraqueza de um fator importante
417 pode ser compensada com a força em outro fator. Portanto, os resultados desse estudo
418 sugerem que *C. truncatum* desenvolveu mecanismos de compensação para manter a
419 competitividade saprofítica e patogênica em relação às outras espécies, evidenciado pela
420 elevada capacidade de germinação dos esporos e produção de apressórios, associada com a
421 maior agressividade em condições ambientais adversas e favoráveis, mesmo com reduzida
422 capacidade de crescimento micelial e esporulação.

423 A maior prevalência de *C. truncatum* causando antracnose em feijão-fava no Nordeste
424 brasileiro, comparada a outras espécies de *Colletotrichum*, foi comprovada em estudo recente
425 (Cavalcante, 2018). Essa elevada prevalência pode ser explicada pelos atributos de
426 adaptabilidade da espécie observados nesse trabalho, pois espécies fúngicas com maior
427 prevalência geralmente se destacam das demais em relação à capacidade competitiva
428 saprofítica e patogênica (Harteveld et al., 2014). Nesse contexto, as diferenças na
429 adaptabilidade das espécies de *Colletotrichum* associadas feijão-fava devem ser consideradas
430 no desenvolvimento de estratégias de manejo da antracnose no Brasil.

431

432 **AGRADECIMENTOS**

433 Essa pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
434 Superior (CAPES). M. P. S. Câmara e S. J. Michereff são bolsistas de Produtividade em
435 Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os
436 pesquisadores agradecem à Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo espaço cedido para a
437 execução dos experimentos.

438 **ORCID**

439 *Sami Jorge Michereff* <http://orcid.org/0000-0002-2156-3502>

440 **REFERÊNCIAS**

- 441 Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- 442 Antonovics, J., & Alexander, H. M. (1989). The concept of fitness in plant fungal pathogen
443 systems. In K. J. Leonard, & W. E. Fry (Eds.), *Plant disease epidemiology* (pp. 185–
444 214). New York, NY, USA: McGraw-Hill.
- 445 Aust, H. J., Bashi, E., & Rotem, J. (1980). Flexibility of plant pathogens in exploiting
446 ecological and biotic conditions in the development of epidemics. In J. Palti, & J. Kranz
447 (Eds.), *Comparative epidemiology: a tool for better disease management* (pp. 46–56).
448 Wageningen, The Netherlands: Center for Agricultural Publishing and Documentation.
- 449 Balodi, R., Ghatak, L. V., Bisht, S., & Shukla, N. (2017). Reproductive fitness of fungal
450 Phytopathogens: deriving co-evolution of host–pathogen systems. In A. Ghatak, & M.
451 Ansar (Eds.), *The phytopathogen: evolution and adaptation* (pp. 41–64). Waretown, NJ,
452 USA: Apple Academic Press.
- 453 Brown, J. K. M. (2006). Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their
454 application to disease control. In B. M. Cooke, D. G. Jones, & B. Kaye (Eds.), *The
455 epidemiology of plant diseases*. 2. ed. (pp. 81–115). Dordrecht, The Netherlands:
456 Springer.
- 457 Carvalho, E. M. S., Beserra Jr., J. E. A., & Barguil, B. M. (2015). Lima bean
458 diseases. In A. S. A. Ferreira, A. C. A. Lopes, & R. L. F. Gomes (Eds.), *Phaseolus
459 lunatus: diversity, growth and production* (pp. 113–133), New York, NY, USA: Nova
460 Science Publishers.
- 461 Carvalho, E. M. S. (2009). *Antracnose em feijão-fava (Phaseolus lunatus L.): caracterização
462 do agente causal e reação de genótipos a Colletotrichum truncatum*. Jaboticabal, SP,
463 Brazil: Universidade Estadual Paulista. Dr Thesis.

- 464 Cavalcante, G. R. S. (2018). *Espécies de Colletotrichum associadas à antracnose em feijão-*
465 *fava: prevalência, filogenia e adaptabilidade comparativa*. Recife, PE, Brazil:
466 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dr Thesis.
- 467 Harteveld, O. C., Akinsanmi, O. A., Becker, M. A., & Drenth, A. (2014). Comparative fitness
468 of *Alternaria* species causing leaf blotch and fruit spot of apple in Australia.
469 *Australasian Plant Pathology*, 43, 495–450.
- 470 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola 2016*. Rio de Janeiro:
471 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- 472 Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual*
473 *Review of Phytopathology*, 50, 319-338.
- 474 Leach, J. E., Cruz, C. M. V., Bai, J. F., & Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a
475 predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*,
476 39, 187–224, 2001.
- 477 McKinney, H. H. (1923). Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat
478 seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195–
479 217.
- 480 Milgroom, M. G. (2015). *Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and*
481 *evolution*. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- 482 Nelson, R. R. (1979). The evolution of parasitic fitness. In J. G. Horsfall, & E. B. Cowling, E.
483 B. (Eds.), *Plant disease: an advanced treatise. v. 4: How pathogens induce disease* (pp.
484 23–46). New York, NY, USA: Academic Press.
- 485 Paula Júnior, T. J., Silva, M. B., & Vieira, R. F. (1995). Doenças causadas por fungos em
486 hortaliças leguminosas. *Informe Agropecuário*, 182, 63–71, 1995.
- 487 Prusky, D., Freeman, S., & Dickman, M. B. (2000), *Colletotrichum: host specificity,*
488 *pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul, MN, USA: APS Press.

- 489 Shaner, G., & Finney, R.E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of
490 slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, 70, 1183–1186.
- 491 Soares, C. A., Lopes, A. C. A., Gomes, R. L. F., & Gândara, F. C. (2010). Doenças. In A. C.
492 A. Lopes, R. L. F. Gomes, & A. S. F. Araújo (Eds.), *A cultura do feijão-fava no meio-*
493 *norte do Brasil* (pp. 239–263). Teresina, PI, Brazil: EDUFPI.
- 494 Sousa, S. S., Silva, R. A. S., Assunção, I. P., Melo, P. M., Feijó, F. M., Matos, K. S., Lima, G.
495 S. A., & Beserra Jr., E. A. B. (2017). *Colletotrichum* species causing anthracnose on
496 lima bean in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38, 329–333.
- 497 Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In J. Bailey, &
498 M. J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: biology, pathology and control* (pp. 1–26).
499 Wallingford, OX, UK: CAB International.
- 500 Zhan, J., & McDonald, B. A. (2013). Experimental measures of pathogen competition and
501 relative fitness. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 131–153.

502 **TABELA 1** Isolados de quatro espécies de *Colletotrichum* obtidos de feijão-fava com
 503 sintomas de antracnose coletadas no Nordeste brasileiro e utilizados no estudo

504

Isolado CMM ¹	Espécie de <i>Colletotrichum</i>	Município (Estado) ²	No. Acesso GenBank ³			
			ACT	TUB2	GAPDH	ITS
CMM2906	<i>C. brevisporum</i>	Passira (PE)	MG018385	MG018398	MG018416	MG018424
CMM4732	<i>C. brevisporum</i>	Araçagi (PB)	MG436775	MG436777	MG018420	MG436779
CMM2951	<i>C. brevisporum</i>	Palmeira dos Índios (AL)	MG018379	MG018393	MG018410	MG018434
CMM2936	<i>Colletotrichum</i> sp.	Araçagi (PB)	MF383474	MF383473	MF383470	MF383467
CMM2947	<i>Colletotrichum</i> sp.	Riachão do Poço (PB)	MF383476	MF383471	MF383468	MF383465
CMM2949	<i>Colletotrichum</i> sp.	Riachão do Poço (PB)	MF383475	MF383472	MF383469	MF383466
CMM2902	<i>C. sichuanensis</i>	São João (PE)	MF279921	MF279914	MF279908	MF279904
CMM2946	<i>C. sichuanensis</i>	Sobrado (PB)	MF279918	MF279916	MF279911	MF279906
CMM2963	<i>C. sichuanensis</i>	Palmeira dos Índios (AL)	MF279917	MF279915	MF279910	MF279905
CMM2908	<i>C. truncatum</i>	Passira (PE)	MF990577	MF990585	MF990595	MF990608
CMM2928	<i>C. truncatum</i>	Amarante (PI)	MF990574	MF990582	MF990598	MF990611
CMM4577	<i>C. truncatum</i>	Riachão do Poço (PB)	MF990570	MF990588	MF990602	MF990615

505

506

507

508

509

¹ CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil).

² Estado: AL = Alagoas, CE = Ceará, PA = Paraíba, PE = Pernambuco, PI = Piauí.

³ ACT = actina, GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, ITS = região do espaço interno transcrito, TUB2 = β -tubulina.

510 **TABELA 2** Efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial de quatro espécies de
 511 *Colletotrichum* patogênicas ao feijão-fava

512

Espécie	Temperatura ótima ¹ (°C)	Taxa de crescimento ² (mm/dia)
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	27,4 b ³	12,0 a
<i>Colletotrichum sichuanensis</i>	27,0 b	11,8 a
<i>Colletotrichum truncatum</i>	28,0 a	8,5 b
<i>Colletotrichum</i> sp. nova	27,3 b	11,8 a

513

514 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de terceiro grau (cúbica): $y=a+bx+cx^2+dx^3$,515 onde y = taxa de crescimento micelial; a , b , c e d são parâmetros da regressão; x = temperatura (*Colletotrichum*516 *brevisporum*: $y=62,65-9,58x+0,49x^2-0,0078x^3$, $R^2=0,994$, $P>F=0,009$; *C. sichuanensis*: $y=57,60-8,528x+0,44x^2-$ 517 $0,0070x^3$, $R^2=0,991$, $P>F=0,014$; *C. truncatum*: $y=75,22-10,47x+0,49x^2-0,0073x^3$, $R^2=0,970$, $P>F=0,032$;518 *Colletotrichum* sp. nova: $y=64,17-9,49x+0,48x^2-0,0076x^3$, $R^2=0,984$, $P>F=0,023$);519 ³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher520 ($P=0,05$).

521 **TABELA 3** Efeito da temperatura na esporulação de quatro espécies de *Colletotrichum*
 522 patogênicas ao feijão-fava

523

Espécie	Temperatura ótima ¹ (°C)	Esporulação ² (x10 ⁴ conídios/mL)
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	25,6 c ³	32,3 a
<i>Colletotrichum sichuanensis</i>	28,9 b	21,3 b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	30,4 a	10,6 c
<i>Colletotrichum</i> sp. nova	30,5 a	24,4 b

524

525 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de quarto grau: $y = a + bx^2 + cx^4 + dx^6$, onde $y =$
 526 esporulação; a , b , c e d são parâmetros da regressão; $x =$ temperatura (*Colletotrichum brevisporum*: $y = -$
 527 $49,73 + 0,28x^2 - 0,00029x^4 + (7,58e^{-8})x^6$, $R^2 = 0,981$, $P > F = 0,028$; *C. sichuanensis*: $y = -3,38 -$
 528 $0,0017x^2 + 0,00011x^4 + (8,54e^{-8})x^6$, $R^2 = 0,995$, $P > F < 0,007$; *C. truncatum*: $y = 11,16 - 0,083x^2 + 0,00018x^4 + (9,57e^{-8})x^6$,
 529 $R^2 = 0,997$, $P > F = 0,004$; *Colletotrichum* sp. nova: $y = 28,79 - 0,21x^2 + 0,00044x^4 - (2,35e^{-7})x^6$, $R^2 = 0,991$, $P > F = 0,013$).

530

531

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher
 ($P = 0,05$).

532 **TABELA 4** Efeito da temperatura na germinação dos esporos de quatro espécies de
 533 *Colletotrichum* patogênicas ao feijão-fava

534

Espécie	Temperatura ótima ¹ (°C)	Germinação de esporos ² (%)
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	30,3 a ³	58,2 d
<i>Colletotrichum sichuanensis</i>	31,1 a	89,1 b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	31,6 a	95,3 a
<i>Colletotrichum</i> sp. nova	25,6 b	83,0 c

535

536 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não-linear Lorentzian: $y = a/(1+((x-b)/c)^2)$, onde $y =$
 537 germinação de esporos; a , b e c são parâmetros da regressão; $x =$ temperatura (*Colletotrichum brevisporum*:
 538 $y=58,24/(1+((x-30,29)/5,95)^2$, $R^2=0,970$, $P>F=0,029$; *C. sichuanensis*: $y=89,13/(1+((x-31,10)/6,97)^2$, $R^2=0,968$,
 539 $P>F=0,032$; *C. truncatum*: $y=95,33/(1+((x-31,58)/11,72)^2$, $R^2=0,971$, $P>F=0,029$; *Colletotrichum* sp. nova:
 540 $y=82,98/(1+((x-25,63)/4,26)^2$, $R^2=0,977$, $P>F=0,023$).

541 ³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher
 542 ($P=0,05$).

543 **TABELA 5** Efeito da temperatura na formação de apressórios de quatro espécies de
 544 *Colletotrichum* patogênicas ao feijão-fava

545

Espécie	Temperatura ótima ¹ (°C)	Formação de apressórios ² (%)
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	30,1 a ³	53,7 b
<i>Colletotrichum sichuanensis</i>	30,0 a	91,1 a
<i>Colletotrichum truncatum</i>	29,9 a	95,5 a
<i>Colletotrichum</i> sp. nova	24,4 b	49,8 b

546

547 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de quarto grau: $y = a + bx^2 + cx^4 + dx^6$, onde $y =$
 548 número de apressórios; a , b , c e d são parâmetros da regressão; $x =$ temperatura (*Colletotrichum brevisporum*: $y =$
 549 $36,43 - 0,31x^2 + 0,0007x^4 - (4,18e^{-7})x^6$, $R^2 = 0,999$, $P > F < 0,001$; *C. sichuanensis*: $y = 48,49 - 0,44x^2 + 0,0011x^4 - (6,53e^{-7})$
 550 x^6 , $R^2 = 0,999$, $P > F < 0,001$; *C. truncatum*: $y = 50,57 - 0,42x^2 + 0,0011x^4 - (6,52e^{-7})x^6$, $R^2 = 0,994$, $P > F = 0,009$;
 551 *Colletotrichum* sp. nova: $y = -94,39 + 0,55x^2 - 0,0007x^4 + (2,26e^{-7})x^6$, $R^2 = 0,951$, $P > F = 0,049$).

552 ³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher
 553 ($P = 0,05$).

554 **TABELA 6** Efeito da temperatura e do período de molhamento na agressividade de
 555 *Colletotrichum brevisporum* e *C. truncatum* em feijão-fava

556

Espécie	Temperatura (°C)	Período de molhamento (horas) / Severidade ¹ (%)		
		12	24	36
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	20	0,0 aA	0,0 bA	0,0 bA
	25	0,0 aA	0,1 bA	0,3 bA
	30	0,1 aC	0,5 aB	1,5 aA
<i>Colletotrichum truncatum</i>	20	0,0 bB	0,1 cB	0,7 cA
	25	0,9 bC	1,5 bB	3,9 bA
	30	2,8 aC	14,1 aB	32,1 aA

557

558 ¹ Mensurada pela porcentagem da área do folíolo com sintomas da doença, com o auxílio do programa Asses 2.0.

559 ² Dados originais. Para efeito de análise os dados foram transformados em $\log(x+1)$. Dentro de cada espécie de

560 *Colletotrichum*, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si

561 pelo teste LSD de Fischer ($P=0,05$).

562

563 **TABELA 7** Período de incubação (PI), severidade inicial (SEVI), severidade final (SEVF) e
 564 área abaixo da curva de progresso (AACPD) da antracnose em feijão-fava induzida por quatro
 565 espécies de *Colletotrichum*

566

Espécie	Componentes epidemiológicos ¹			
	PI (horas)	SEVI (%)	SEVF (%)	AACPD
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	133,0 b ²	0,0 b	14,4 b	16,0 b
<i>Colletotrichum sichuanensis</i>	148,1 a	0,0 b	6,5 c	3,3 c
<i>Colletotrichum truncatum</i>	74,0 c	3,5 a	76,9 a	116,4 a
<i>Colletotrichum</i> sp. nova	150,4 a	0,0 b	6,7 c	3,3 c

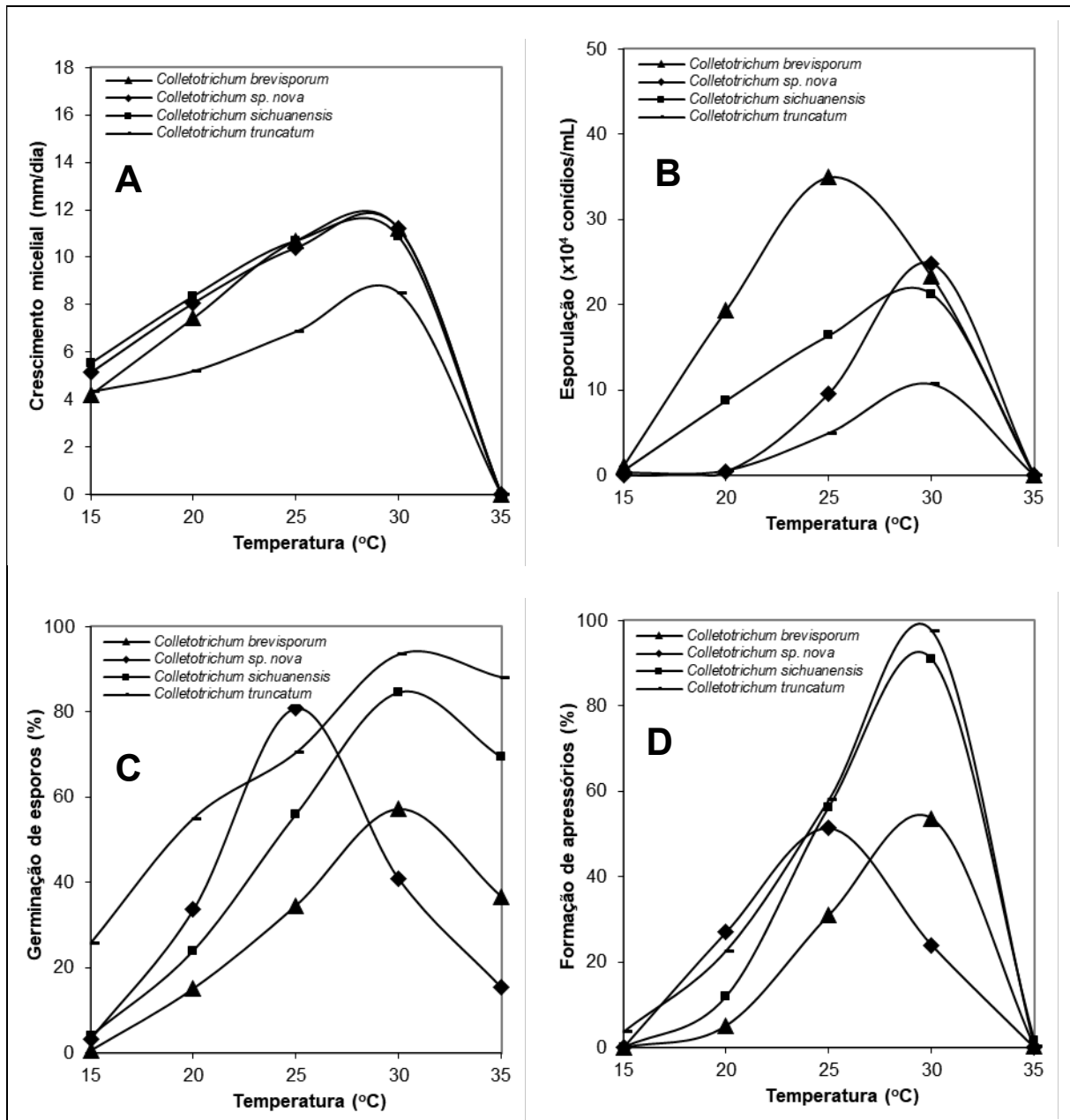
567

568 ¹ PI = número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; SEVI = severidade da doença
 569 aos dois dias após a inoculação, estimada com o auxílio de escala descritiva de 0 a 4 (Carvalho, 2009) e cálculo
 570 do índice de severidade da doença (Mckinney, 1923); SEVF = severidade da doença aos cinco dias após a
 571 inoculação; AACPD = área abaixo da curva do progresso da doença, calculada conforme Shaner & Finney
 572 (1977).

573

574 ² Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher
 (P=0,05).

575



577

578 **FIGURA 1** Efeito da temperatura no crescimento micelial (A), esporulação (B), germinação
 579 de esporos (C) e formação de apressórios (D) de quatro espécies de *Colletotrichum*
 580 patogênicas ao feijão-fava

Capítulo V

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Diferentes espécies de *Colletotrichum* estão associados à antracnose em feijão-fava no Brasil inclusive uma nova espécie;
- *C. truncatum* é a espécie prevalente e a mais agressiva que as outras espécies causadoras de antracnose em feijão-fava;
- *C. liaonigense* é sinônimo de *C. brevisporum*.
- A temperatura tem grande influência na adaptabilidade das espécies de *Colletotrichum*.
- Espécies de *Colletotrichum* diferem quanto à temperatura ótima para crescimento, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios.
- Plantas inoculadas com *C. truncatum* apresentaram menor período de incubação e maior severidade da doença.
- Apesar de possuir uma menor adaptabilidade saprofítica, *C. truncatum* possui grande adaptabilidade patogênica e é um importante patógeno para a cultura do feijão-fava;
- A diversidade, a virulência e a diferença na adaptabilidade das espécies de *Colletotrichum* devem ser considerados para desenvolver estratégias eficazes de manejo da antracnose em feijão-fava.