

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIA RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
FLORESTAL

Tales Poletto

**PATOSSISTEMA *Colletotrichum* spp. x *Carya illinoensis*,
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE**

Santa Maria, RS
2022

Tales Poletto

**PATOSSISTEMA *Colletotrichum* spp. x *Carya illinoensis*,
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Florestal**

Orientador: Prof^a Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS

2022

Poletto, Tales
PATOSSISTEMA Colletotrichum spp. x Carya
illinoensis, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE / Tales
Poletto.- 2022.
146 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2022

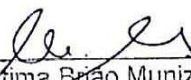
1. pecan 2. antracnose 3. diversidade genética I.
Brião Muniz, Marlove Fátima II. Título.

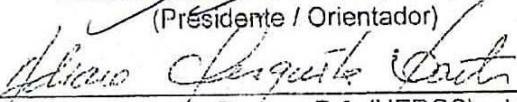
Tales Poletto


PATOSSISTEMA *Colletotrichum* spp. x *Carya illinoensis*,
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE

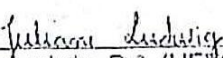
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Florestal

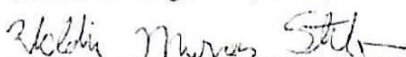
Aprovado em 17 de fevereiro de 2022:


Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente / Orientador)


Adriana Cibele de Mesquita Dantas, Dr^a. (UERGS) – Videoconferência


Caciara Gonzatto Maciel, Dr^a. (UFRGS) - Videoconferência


Juliane Ludwig, Dr^a. (UFPS) – Videoconferência


Valdir Marcos Stefenon, Dr. (UFSC) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

DEDICATÓRIA

*À minha família, pelo estímulo e
apoio e, aos amigos, que
colaboraram na
realização deste trabalho.*

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo aprendizado de forma gratuita e qualificada que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFSM, possibilitou a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade, ensinamentos, compreensão, amizade, apoio prestado e por todas as oportunidades que me viabilizou. Professora Marlove, muito obrigado!

À Professora Dr^a. Lia Rejane Reiniger, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e disponibilidade sempre que solicitada.

À banca examinadora, pelas considerações e contribuições prestadas a este trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Harakava pela ajuda na identificação molecular do Colletotrichum.

Ao professor Dr. Valdir Marcos Stefenon pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Meu agradecimento especial a meus pais Ivonir e Maria e meu irmão Igor, que sempre me apoiaram e estão sempre ao meu lado.

Ao Instituto Brasileiro de Pecanicultura (IBPECAN) e aos muitos produtores de noqueira-pecã que disponibilizaram seus pomares para estudo e trocas de experiências.

Aos amigos Luana Oliveira de Oliveira e Rafael Matielo (UNIPAMPA - Campus São Gabriel), Dalvan Carlos Beise e Caroline Bedin Zanatta (UFSC), pela ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, Alexsandra Cezimbra Quevedo, Vinícius Spolaor Fantinel, Lucas Savian, Jéssica Emília Rabuske, Janaina Sarzi, Jéssica Mengue Rolim, Clair Walker, Adriana Falcão Dutra, Vanessa Alba, Márcia Gabriel, Renata Fontana Favaretto, Laís Martello, Leonardo Couto, Laura Viera, Ricardo Mezzomo, Jaqueline Tonn Krahn e a Técnica Administrativa Maria Neves Deconto Weber pela amizade, apoio, compreensão e ajuda prestada.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

PATOSSISTEMA *Colletotrichum* spp. x *Carya illinoensis*, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE

AUTOR: TALES POLETTO

ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

LOCAL DA DEFESA E DATA: Santa Maria, 17 de fevereiro de 2022.

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) é uma importante espécie cultivada comercialmente em vários países do mundo. Há mais de 100 anos, cultivares norte americanas foram introduzidas no sul do Brasil. Desde essa introdução, os agricultores familiares realizam o cultivo, a propagação e a seleção dessas cultivares, assim como, plantas de origem seminal, baseando-se em características morfo-agronômicas. Desse processo, originaram-se vários outros genótipos, regionalmente adaptados e com potencial produtivo. Neste contexto, o recente aumento das áreas de cultivo incrementou a ocorrência de doenças, como a antracnose, demandando urgentemente por ferramentas de controle fitossanitário eficientes e seguras. O objetivo desse estudo foi caracterizar o patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã, realizar a caracterização morfométrica, química e genética de genótipos de noqueira-pecã, bem como, buscar ferramentas de controle para a doença, através de fontes de resistência genética e a seleção de agentes de biocontrole à *Colletotrichum* spp. Para a caracterização do patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã utilizou-se abordagens morfológicas, moleculares e patogênicas, para caracterizar espécies de *Colletotrichum*, com base em 68 isolados associados à frutos sintomáticos, coletados no Estado do Rio Grande do Sul. A diversidade genética das plantas de noqueira-pecã foi caracterizada por métodos morfométricos, químicos e análises genético-moleculares com base em 60 genótipos de noqueira-pecã. Os testes de sensibilidade foram realizados em 18 genótipos, por meio da inoculação de frutos e folíolos com três espécies de *Colletotrichum*, em condições controladas. Marcadores moleculares microssatélites foram utilizados para estimar a diversidade e comparar os genótipos de acordo com a resistência à *Colletotrichum* spp. O teste de biocontrole foi realizado utilizando seis espécies do antagonista *Trichoderma* spp. e cinco espécies do patógeno *Colletotrichum* spp. O potencial antagonista foi avaliado pela inibição do crescimento micelial dos patógenos. Foram identificadas seis espécies associadas à antracnose da noqueira-pecã: *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* e *C. karstii*, as quais apresentaram diferentes respostas de agressividades em frutos e folíolos de noqueira-pecã. A diversidade genética dos genótipos de noqueira-pecã foi moderada a alta, podendo servir como fonte de germoplasma para o melhoramento da cultura. No teste de sensibilidade, a antracnose se manifestou mais severamente nos frutos em relação aos folíolos. Os genótipos 63, 47, 29 e 56 apresentaram alta resistência a antracnose. Não houve correlação entre marcadores microssatélites e a resistência à *Colletotrichum* spp., porém foi observada moderada a alta diversidade genética. No teste de biocontrole, as espécies *T. virens* e *T. tomentosum* apresentaram maior potencial antagonista à *Colletotrichum* spp. Os resultados deste estudo contribuem para elucidação do patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã, bem como, trazem subsídios para o desenvolvimento de futuros estudos envolvendo melhoramento e controle da antracnose na cultura.

Palavras-chave: pecan; antracnose; diversidade genética

ABSTRACT

Doctor's Thesis
Graduate Program in Forest Engineering
Federal University of Santa Maria

PATHOSYSTEM *Colletotrichum* spp. x *Carya illinoensis*, CHARACTERIZATION AND CONTROLE

AUTHOR: TALES POLETO

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: February, 17th, 2022, Santa Maria.

Pecan (*Carya illinoensis*) is an important species cultivated commercially in several countries around the world. More than 100 years ago, North American cultivars were introduced in southern Brazil. Since this introduction, family farmers carry out the cultivation, propagation and selection of these cultivars, as well as plants of seminal origin, based on morpho-agronomic characteristics. This process gave rise to several other genotypes, regionally adapted and with productive potential. In this context, the recent increase in cultivated areas has increased the occurrence of diseases, such as anthracnose, urgently demanding efficient and safe phytosanitary control tools. The aim of this study was to characterize the *Colletotrichum* spp. x pecan, perform the morphometric, chemical and genetic characterization of pecan genotypes, as well as seek control tools for the disease, through sources of genetic resistance and the selection of biocontrol agents to *Colletotrichum* spp. For the characterization of the *Colletotrichum* spp. x pecan, morphological, molecular and pathogenic approaches were used to characterize *Colletotrichum* species, based on 68 isolates associated with symptomatic fruits, collected in the State of Rio Grande do Sul. The genetic diversity of pecan plants was characterized by morphometric and chemical methods and genetic-molecular analysis based on 60 pecan genotypes. Sensitivity tests were carried out in 18 genotypes, through the inoculation of fruits and leaflets with three species of *Colletotrichum*, under controlled conditions. Microsatellite molecular markers were used to estimate diversity and compare genotypes according to resistance to *Colletotrichum* spp. The biocontrol test was performed using six species of the antagonist *Trichoderma* spp. and five species of the pathogen *Colletotrichum* spp. The antagonist potential was evaluated by inhibiting the mycelial growth of the pathogens. Six species associated with pecan anthracnose were identified: *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* and *C. karstii*, which showed different aggressive responses in pecan fruits and leaflets. The genetic diversity of pecan genotypes was moderate to high, which could serve as a source of germplasm for crop improvement. In the sensitivity test, anthracnose manifested itself more severely in the fruits than in the leaflets. Genotypes 63, 47, 29 and 56 showed high resistance to anthracnose. There was no correlation between microsatellite markers and resistance to *Colletotrichum* spp., however moderate to high genetic diversity was observed. In the biocontrol test, the species *T. virens* and *T. tomentosum* showed the greatest potential antagonist to *Colletotrichum* spp. The results of this study contribute to the elucidation of the *Colletotrichum* spp. x pecan, as well as, provide subsidies for the development of future studies involving the improvement and control of anthracnose in the crop.

Keywords: pecan; anthracnose; genetical diversity

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1: Primeiro relato de *Colletotrichum nymphaeae* causando antracnose em *Carya illinoensis* no Brasil.

Figura 1. A e B - Sintomas de antracnose em folíolos e frutos. **C** - Lesão no folíolo, estruturas escuras são acérvulos. **D** - Acérvulos com massa de conídios alaranjados nos frutos. **E e F** - Fruto e folíolo com lesão 10 dias após a inoculação. **G e H** - Parte superior e inferior da colônia. **I** - Massa de conídios formada em BDA. **J** - Conídios.....25

3. CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. e estratégias de manejo da antracnose em noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.

Figura 1. Locais de coleta e códigos correspondentes dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) com antracnose.....30

Figura 2. Sintomas de antracnose causados por *Colletotrichum* spp. em frutos (**A**) e folhas (**B**) de *Carya illinoensis* observados em campo.....35

Figura 3. Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp.; (A) *C. nymphaeae* – SAJ2; (B) *C. fioriniae* – CDL; (C) *C. gloeosporioides* – CZA; (D) *C. siamense* – ADM3; (E) *C. kahawae* – PIB1; (F) *C. karstii* – FAR2; (I) Morfologia da colônia em BDA (face superior); (II) Morfologia da colônia em BDA (face inferior); (III) esporodóquio; (IV) Conídio..... 38

Figura 4. Dissimilaridade morfológica (%) entre os 68 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos pelo método UPGMA, baseado na matriz de distância de Mahalanobis usando as características, crescimento micelial, IVCN, CMD, esporulação, comprimento e largura de conídios. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,87.....40

Figura 5. Árvore filogenética multigênica obtida a partir das sequências dos genes parciais actina (ACT) e beta-tubulina 2 (β -tub2), de 18 isolados de *Colletotrichum* spp., associados à antracnose da noqueira-pecã, de acordo com o método estatístico “Maximum Likelihood”. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Caixa a direita do clado indica o complexo do fungo.....42

Figura 6. Resultado do teste de patogenicidade com espécies de *Colletotrichum*, 12 dias após a inoculação em folhas e frutos de noqueira-pecã. (I) Testemunha; (II) *C. nymphaeae* – JAS2;

(III) *C. fiorinia* – CDL; (IV) *C. gloeosporioides* – CZA; (V) *C. siamense* – ADM3; (VI) *C. kahawae* – PIB1; (VII) *C. karstii* – FAR2.....44

4. CAPÍTULO 3: Análise morfológica, química e genética de acessos de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) no sul do Brasil.

Figura 1. Exemplos da variabilidade na forma e tamanho das nozes de plantas de noqueira-pecã no sul do Brasil. As figuras representam nozes dos acessos 1, 2, 3, 4, 79 e 67.....59

Figura 2. Análise dos componentes principais da noqueira-pecã com base nas análises morfométrica (A), química (B) e genética molecular (C). Dois dos acessos mais diferenciados das análises morfométrica e química foram relacionados à sua posição na análise genética molecular, mostrando a ausência de correlação dos dados. Veja o texto para explicação.....66

Figura 3. Dendrograma UPGMA dos 60 acessos de noqueira-pecã com base nos 154 fragmentos de AFLP. O coeficiente cofenético entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi de 0,84.....68

5. CAPÍTULO 4: Identificação de fontes de resistência à antracnose em genótipos de noqueira-pecã no Brasil.

Figura 1. Análise de agrupamento pela distância euclidiana, de genótipos de noqueira-pecã de acordo com a sensibilidade aos patógenos *Colletotrichum nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii*. I - Frutos e II - Folíolos.....89

Figura 2. Escala de sensibilidade para frutos (I) e folíolos (II) de genótipos de noqueira-pecã inoculados com patógenos *Colletotrichum nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii*, aos 12 dias da inoculação.....90

Figura 3. Agrupamentos de genótipos de noqueira-pecã com base em marcadores microssatélites nucleares e plastídias conjugados.....91

6. CAPÍTULO 5: Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Colletotrichum* spp., agente etiológico da antracnose em noqueira-pecã.

Figura 1. Gabarito para classificação do antagonismo em teste de pareamento de culturas.....106

Figura 2. Crescimento micelial diário de <i>Colletotrichum</i> spp. no teste de pareamento de cultura com <i>Trichoderma</i> spp.....	109
Figura 3. Pareamento de cultura em placas de petri entre <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	111
Figura 4. A – Detalhe do halo de inibição formado na interação entre <i>C. kahawae</i> x <i>T. harzianum</i> , seta pontilhada indica a presença de hifas de <i>T. harzianum</i> recobertas possivelmente por metabólitos secundários. B - Hifa de <i>C. siamense</i> degradada na presença de <i>T. koningiopsis</i> (microscopia óptica, 400x). C – Hifa de <i>T. virens</i> parasitando <i>C. siamense</i> (microscopia óptica, 400x)	112
Figura 5. Pareamento de cultura em placas de petri entre <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	114

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. e estratégias de manejo da antracnose em noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela 1. Números de acesso no GenBank e no Herbário SMDB dos isolados identificados, coletados em pomares de noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.....33

Tabela 2. Características morfológicas de *Colletotrichum* spp. identificadas neste estudo.....35

Tabela 3. Diâmetro das lesões de *Colletotrichum* spp. em frutos e folhas de *Carya illinoensis*.....43

4. CAPÍTULO 3: Análise morfológica, química e genética de acessos de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) no sul do Brasil.

Tabela 1. Estimativas morfométricas e químicas obtidas para as características avaliadas na noqueira-pecã.....64

Tabela 2. Cargas da matriz de correlação. Variáveis com alta influência ($-0,65 <x> 0,65$) nos três componentes principais são destacadas em negrito.....67

5. CAPÍTULO 4: Identificação de fontes de resistência à antracnose em genótipos de noqueira-pecã no Brasil.

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. causadores da antracnose, selecionados para os testes sensibilidade em genótipos de noqueira-pecã.....83

Tabela 2. Área das lesões (cm²) em frutos inoculados com *Colletotrichum* spp. em diferentes genótipos de noqueira-pecã.....86

Tabela 3. Área das lesões (cm²) em folíolos de noqueira-pecã inoculados com *Colletotrichum* spp. em diferentes genótipos de noqueira-pecã.....87

Tabela 4: Índices de diversidade genética multilocus para marcadores SSR nucleares (nSSR) e plastidiais (cpSSR) estimados para noqueira-pecã.....91

6. CAPÍTULO 5: Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Colletotrichum* spp., agente etiológico da antracnose em noqueira-pecã.

Tabela 1. Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. causadores da antracnose, utilizados para os testes de confrontação direta com <i>Trichoderma</i> spp.....	104
Tabela 2. Porcentagem de inibição de <i>Colletotrichum</i> spp. em cultivo pareado com <i>Trichoderma</i> spp. avaliada aos sete dias.....	107
Tabela 3. Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo a <i>Colletotrichum</i> spp. segundo a escala de Rodrigues (2010)	110
Tabela 4. Efeito inibitório (%) de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. CAPÍTULO 1: Primeiro relato de <i>Colletotrichum nymphaeae</i> causando antracnose em <i>Carya illinoensis</i> no Brasil.....	23
2.1 Referências bibliográficas.....	24
3. CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e estratégias de manejo da antracnose em noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.....	26
3.1 Introdução.....	27
3.2 Material e métodos.....	29
3.2.1 Isolamento de <i>Colletotrichum</i> spp.....	29
3.2.2 Descrição dos sintomas da doença.....	31
3.2.3 Análise morfológica.....	31
3.2.4 Extração de DNA, reação da PCR e sequenciamento.....	31
3.2.5 Análise molecular e filogenética.....	32
3.2.6 Teste de patogenicidade.....	33
3.3 Resultados.....	34
3.3.1 Descrição dos sintomas da doença.....	34
3.3.2 Caracterização morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp.....	35
3.3.2.1 Análise multivariada (morfotipos).....	39
3.3.2.2 Análise filogenética.....	41
3.3.3 Análise filogenética.....	41
3.3.4 Teste de patogenicidade.....	43
3.4 Discussão.....	44
3.5 Conclusões.....	48
3.6 Referências bibliográficas.....	48
4. CAPÍTULO 3: Análise morfológica, química e genética de acessos de noqueira-pecã (<i>Carya illinoensis</i>) no sul do Brasil.....	56
4.1 Introdução.....	57
4.2 Material e métodos.....	60
4.2.1 Área de estudo e amostragem de material vegetal.....	60

4.2.2 Análises morfométricas.....	61
4.2.3 Análises químicas.....	61
4.2.4 Análises genéticas moleculares.....	61
4.3 Resultados	63
4.4 Discussão.....	67
4.4.1 Diversidade morfométrica, química e genética na noz-pecã no sul do Brasil como ferramenta para seleção e melhoramento de plantas.....	67
4.4.2 A necessidade de conservação de recursos genéticos, implantação do melhoramento genético participativo e proteção dos direitos intelectuais dos agricultores familiares no sul do Brasil.....	69
4.5 Referências bibliográficas.....	72

5. CAPÍTULO 4: Identificação de fontes de resistência à antracnose em genótipos de noqueira-pecno Brasil.....78

5.1 Introdução.....	79
5.2 Material e Métodos.....	81
5.2.1 Coleta de frutos e folíolos de genótipos de noqueira-pecã.....	81
5.2.2 Obtenção e cultivo de <i>Colletotrichum</i> spp.....	82
5.2.3 Inoculação.....	83
5.2.4 Avaliação.....	83
5.2.5 Marcadores microsatélites.....	84
5.3 Resultados.....	85
5.3.1 Sensibilidade à <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos de diferentes genótipos de noqueira-pecã.....	85
5.3.2 Sensibilidade à <i>Colletotrichum</i> spp. em folíolos de diferentes genótipos de noqueira-pecã.....	87
5.3.3 Marcadores microsatélites.....	90
5.4 Discussão.....	91
5.5 Conclusões.....	95
5.6 Referências Bibliográficas.....	95

6. CAPÍTULO 5: Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Colletotrichum* spp., agente etiológico da antracnose em noqueira-pecã.....101

6.1 Introdução.....	102
6.2 Material e métodos	104

6.2.1 Obtenção dos patógenos.....	104
6.2.2 Obtenção dos antagonistas.....	105
6.2.3 Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. à <i>Colletotrichum</i> spp. por teste de cultura pareada.....	105
6.2.4 Efeito inibitório de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento de <i>Colletotrichum</i> spp.	106
6.2.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	107
6.3 Resultados e discussão.....	107
6.3.1 Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Colletotrichum</i> spp. por teste de cultura pareada.....	107
6.3.2 Efeito inibitório de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.	112
6.4 Conclusões.....	115
6.5 Referências Bibliográficas.....	116
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	124
8. CONCLUSÕES GERIAS.....	132
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
10. APÊNDICES.....	141
10.1 Comprimento (mm), diâmetro (mm) e comprimento / largura de frutos de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.....	141
10.2 Peso total (g), peso da amêndoa (g) e número de frutos por quilograma de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.....	142
10.3 Porcentagem de amêndoas (barra preta) e de casca (barra vermelha) de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.....	143
10.4 Dificuldade de descascamento do fruto de acessos de noqueira-pecã: (preto difícil), (vermelho médio) e (verde fácil). Dados referentes as análises morfológicas do Capítulo 3.....	143
10.5 Espessura da casca de fruto de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.....	144

1. INTRODUÇÃO GERAL

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenheim) K. Koch] pertence à família *Juglandaceae* e é autóctone da América do Norte (RIVERA-RANGEL et al., 2018). Nos Estados Unidos, ocorre de forma natural, principalmente ao longo do Rio Mississippi, região compreendida entre os estados de Illinois, Iowa, Louisiana, Texas, Kansas Mississippi e Tennessee. Algumas populações isoladas também ocorrem nos estados de Ohio e Alabama. No México, ocorre naturalmente na região do extremo oeste de Chihuahua (GRAUKE, WOOD e HARRIS, 2016; PETERSON, 2018).

A espécie caracteriza-se por ser decídua, com tronco retilíneo e copa elíptica, podendo atingir 50 metros de altura. As folhas são alternas, compostas e imparipenadas, com 9 a 17 folíolos. A casca é lisa quando nova, mas com o decorrer do tempo, torna-se áspera e com fendas (MARCHIORI, 1997). A noqueira-pecã, possui sistema radicular pivotante, que cresce rapidamente e aprofunda-se por vários metros dependendo da profundidade do solo e da drenagem (SPARKS, 2005).

A planta é monóica, ou seja, possui flores unissexuais no mesmo indivíduo. Na floração, que acontece no início da estação primaveril, as flores estaminadas nascem a partir de gemas dos ramos da estação hiberna, e as pistiladas, crescem nas terminações dos ramos da estação vegetativa. Como população, as árvores são heterodícoicas, podendo ser protândrica ou protogínica. Este sistema reprodutivo assegura a fecundação cruzada, facilitando a heterozigose em indivíduos e populações (THOMPSON e ROMBERG, 1985; GRAUKE, WOOD e HARRIS, 2016). Em pomares comerciais, essas características são levadas em consideração para proporcionar um bom arranjo entre as cultivares ditas como polinizadoras e produtoras, favorecendo a fecundação cruzada.

O fruto da noqueira-pecã é uma noz envolta em uma casca deiscente (pericarpo) que se divide ao longo de suturas mais ou menos aladas (valvas) para liberar a noz de casca dura. As nozes são de cor marrom com listras pretas no ápice e manchas na base (GRAUKE, WOOD e HARRIS, 2016). O período requerido para o desenvolvimento do fruto varia de 150 a 180 dias, dependendo da cultivar (VARELA et al., 2015).

A busca por alimentos saudáveis como a noz-pecã vem aumentando mundialmente, a sua qualidade sensorial, composição nutricional e as propriedades benéficas à saúde tornam o alimento muito atrativo para os consumidores. O fruto possui em sua composição lipídios,

proteínas, fibras, carboidratos, vitaminas, minerais, como também, compostos fenólicos, os quais apresentam atividade antioxidante (USDA, 2019; ZHANG et al., 2019a). Vários estudos indicam que o seu consumo pode ajudar na prevenção e/ou tratamento de obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer e na redução de processos inflamatórios (AUNE et al., 2016; WANG et al., 2016b; ATANASOV et al., 2018).

O óleo de noz-pecã também é um produto muito apreciado na culinária por seu alto teor de ácidos oleico e linoleico, γ -tocoferol e β -sitosterol, já a casca dura da noz, que é descartada no processamento, apresenta uma grande concentração de polifenóis e é considerada um subproduto de uso potencial (ATANASOV et al., 2018). Além disso, o epicarpo das nozes (casca verde) é utilizado para produção de bebidas artesanais.

Os países líderes em produção de noz-pecã são México e Estados Unidos, os quais representam 49 e 41% da produção mundial, respectivamente (INC, 2021). A espécie também é cultivada comercialmente, em vários outros países, mas em menor escala, com na Austrália, China, norte da Índia, África do Sul, Espanha e Israel. Na América do Sul, é cultivada principalmente no Peru, Uruguai, Argentina e sul do Brasil. Em 2021, a produção mundial de nozes somou mais de 166 mil ton. (amêndoa), tornando-se o sexto fruto seco mais produzido no mundo. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de noz-pecã, totalizando 1,7 mil toneladas de nozes sem casca (INC, 2021). Porém, informações sobre a área cultivada com noqueira-pecã no Brasil ainda são limitadas.

A introdução da noqueira-pecã no Brasil deu-se a partir da década de 1870, em áreas subtropicais do sudeste e regiões do sul do país. Dezenas de cultivares foram trazidas do México e dos Estados Unidos na forma de ramos e enxertados, enquanto outras, foram trazidas como mudas enxertadas e sementes. Embora, tenha havido incentivos fiscais para o aumento do cultivo da noqueira-pecã, principalmente entre os anos 1960 e 1970, fatores como a escassez de conhecimentos sobre as práticas de manejo, equipamentos, insumos e nichos de comercialização prejudicaram o pleno desenvolvimento comercial da espécie no Brasil, havendo abandono da maioria dos pomares implantados.

Apesar disso, o cultivo da noqueira-pecã manteve-se ativo principalmente em pequenas propriedades rurais, as quais objetivavam o complemento da alimentação e a venda do excedente da produção no mercado local. Por várias décadas, esses produtores, mantenedores da pecanicultura, praticaram o cultivo, a propagação, a troca e a seleção de cultivares e também de plantas originárias de intercruzamento espontâneo. A seleção baseava-se em características como morfologia de fruto, resistência a pragas e doenças, cores, sabor de amêndoa e produção

resultando em uma enorme gama de genótipos localmente adaptados. É importante salientar que muitos desses genótipos foram identificados e são conhecidos pelo sobrenome do agricultor que os selecionou. De modo geral, a pecanicultura tornou-se tradição nas pequenas propriedades rurais no sul do Brasil, as quais agregam uma gama elevada de conhecimentos tradicionais associados ao cultivo da noqueira-pecã.

A partir da última década, a maior disponibilidade de recursos tecnológicos e científicos, a organização da cadeia produtiva, aliada ao aumento das demandas mundiais por alimentos nutracêuticos, como a noz-pecã, possibilitou novamente o desenvolvimento da cultura em grande escala, tornando-se importante comercialmente no sul do Brasil. Desde então, diversos empreendimentos ligados a atividade pecanicultora tem se desenvolvido, como a criação de indústrias e agroindústrias de beneficiamento, desenvolvimento de equipamentos para o manejo, colheita e o processamento das nozes, viveiros de mudas, a implantação de inúmeros novos pomares, bem como, o desenvolvimento de pesquisas científicas que visam o aprimoramento das técnicas de cultivo, processamento e comercialização da fruta.

No Brasil, a noqueira-pecã é cultivada em diversos sistemas de produção, dentre eles pode-se citar: pomares convencionais, os quais caracterizam-se por serem conduzidos em monocultivos, geralmente, com grandes extensões; pomares em sistemas agroflorestais, os quais, são consorciados com culturas agrícolas, como milho, mandioca, feijão e erva-mate; os sistemas silvipastoris, onde a cultura fornece sombra e propicia o cultivo de forrageiras que servem para a alimentação dos animais (bovinos e ovinos), possibilitando a diversificação da produção e a otimização do uso da propriedade; como também, pomares com princípios agroecológicos em sistema de transição (visam a recuperação do agroecossistema) e pomares orgânicos (sem utilização de insumos químicos).

Contudo, o crescente aumento da área plantada com utilização de algumas cultivares suscetíveis a doenças e sem o devido manejo fitossanitário, tem desencadeado frequentes epidemias, principalmente de doenças fúngicas. Entre as mais relevantes, diagnosticadas até o presente, destacam-se a mancha-foliar de *Cladosporium* (*Cladosporium* spp.) (WALKER et al., 2016), a mancha foliar de *Pestalotiopsis* (*Pestalotiopsis* spp.) (LAZAROTTO et al., 2012) e o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia subglobosa*, *Pseudofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum kinberleyense* (POLETTO et al., 2016, ROLIM et al., 2020a), a mancha-foliar-marrom, causada por *Ragnildiana diffusa* (POLETTO et al., 2017), podridão-de-raízes e a murcha, causada por *Fusarium oxysporum* (POLETTO et al., 2020; ROLIM et al., 2020b).

Recentemente, uma nova doença foi diagnosticada nos plantios brasileiros de noqueira-pecã. A doença acomete as folhas causando manchas durante todo o ciclo vegetativo da cultura e, nos frutos, provoca abscisão precoce, principalmente na fase de enchimento. O agente etiológico foi identificado como fungos do gênero *Colletotrichum*. De acordo com Shamim et al. (2017), a identificação precisa e a caracterização de fitopatógenos em culturas economicamente importantes é necessária para a realização da diagnose correta da doença e implementação de estratégias eficientes de manejo fitossanitário. Cai et al. (2009); Cannon et al. (2012); Hassan et al. (2018), recomendaram que, para uma correta identificação de patógenos do gênero *Colletotrichum*, é necessário realizar uma abordagem polifásica, combinando técnicas morfológicas tradicionais e ferramentas de diagnóstico molecular para obter resultados apropriados e confiáveis.

A grande maioria dos fungos do gênero *Colletotrichum* são considerados patógenos agressivos que ocasionam doenças, acarretando perdas em diversas culturas, tanto em regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo (FREEMAN, KATAN e SHABI, 1998; HYDE et al., 2009). As espécies de *Colletotrichum* estão, principalmente, relacionadas a sintomas de antracnose, que se caracterizam por lesões necróticas bem delimitadas com o centro deprimido em folhas, hastes, flores e frutos, podendo ocasionar também, podridão no coleto e haste de mudas (CANNOM et al., 2012).

A antracnose em noqueira-pecã já foi relatada nos Estados do Alabama e na Geórgia - Estados Unidos (RAND, 1914; BRENNEMAN e REILLY, 1989; LATHAM, BOWEN e CAMPBELL, 1995) na Argentina (MANTZ et al., 2010), Índia (PAWAN, 2011), China (ZHANG et al., 2019b) e, recentemente, no Brasil (POLETTTO et al., 2019). Nestes locais de ocorrência, a doença causou manchas nas folhas e frutos com posterior abscisão dos frutos, resultando em perdas na produção.

Brenneman (2010) ressalta que a doença tem relação com o aumento dos níveis pluviométrico e da temperatura, os quais favorecem o desenvolvimento do patógeno, nestas condições podem ocorrer perdas significativas na produção. Além disso, vale destacar que o uso frequente de agroquímicos, visando o controle da antracnose e de outras doenças na cultura, tende a elevar o custo de produção. Além disso, pode causar outras externalidades negativas, evidenciando a necessidade de obter ferramentas de manejo para doenças que sejam mais seguras e eficientes.

O uso intensivo de agroquímicos para combater doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como

a contaminação do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade, entre outros (BETTIOL e MORANDI, 2009). Por conseguinte, há uma crescente demanda por novas alternativas eficientes e seguras para minimizar o efeito das doenças sobre os cultivos vegetais. A utilização de cultivares resistentes e o uso de agentes de biocontrole são técnicas promissoras para o manejo de doenças de forma sustentável.

A resistência genética é apontada como uma das formas mais eficientes para o controle de doenças e, sempre que possível, deve ser priorizada por ser mais econômica, eficiente e segura, em relação ao controle químico (ASSUNÇÃO et al., 1999; CAMARGO, 2018a; LIMA et al., 2019), o qual proporciona risco de seleção de populações de patógenos resistentes a defensivos (BOCK et al., 2019). Além disso, constitui importante medida profilática, pois bloqueia o agravamento de doenças em locais onde ela já ocorre e, mesmo em áreas isentas do patógeno, proporcionará dificuldades para o estabelecimento e disseminação, caso haja sua introdução.

No Brasil, a introdução de várias cultivares de noqueira-pecã, juntamente com a propagação seminal e a seleção de cultivares por muitos anos, gerou uma grande variabilidade genética, revelada na morfologia das plantas, nos frutos, como também, pela resistência ou suscetibilidade às doenças. Para Alfenas et al. (2009), o conhecimento sobre a ampla variabilidade genética do hospedeiro, quanto à resistência à doença, possibilita a seleção e o plantio de genótipos resistentes, como também é essencial para os programas de melhoramento genético, que visam a obtenção de plantas resistentes. Contudo, necessita-se, também conhecer a variabilidade do patógeno para o qual busca-se a resistência (CONNER e STEVENSON, 2004).

Além do controle genético, o biocontrole tem sido largamente investigado, pois apresentam grande potencial para supressão de fitopatógenos na agricultura, principalmente, quando inseridos dentro do contexto do manejo integrado de doenças. Bettiol e Morandi (2009) destacam que, dentre os antagonistas, o fungo *Trichoderma* é certamente o mais utilizado no Brasil como agente de biocontrole, o qual, tem sido utilizado em larga escala para o controle de doenças.

Vários estudos vêm demonstrando o potencial do *Trichoderma* como um agente antagonista à *Colletotrichum* spp. em diversas culturas perenes acometidas pela antracnose como, por exemplo, em *Citrus* spp. (KLEIN et al., 2013), em goiaba-serrana [*Feijoa sellowiana*

(O.Berg) O.Berg] (FANTINEL et al., 2018), em bananeira (*Musa* spp.) (OLIVEIRA, VIANA e MARTINS, 2016), entre outras. Haddad et al. (2017) comentam que o *Trichoderma* tem ganhado ampla aceitação como um agente de biocontrole necessitando ampliar as investigações para seleção de novos microrganismos com ação sobre doenças de plantas.

Não há dúvidas sobre a importância que a antracnose representa para a cultura da noqueira-pecã. Diante disto, os capítulos I e II desta tese, compõem um estudo aprofundado desse patossistema, elucidando a sintomatologia associada à doença, a identificação do patógeno, suas características morfológicas, genéticas e de virulência. Os capítulos III e IV constituem um estudo sobre a variabilidade genética e avaliação de características morfo-agronômicas com potencial para uso em programas de melhoramento genético de genótipos de noqueira-pecã cultivados no sul do Brasil, bem como, suas características de resistência/suscetibilidade à antracnose, contribuindo para a seleção e o desenvolvimento de cultivares, principalmente, resistentes à doença.

Neste contexto, e, aliado à necessidade ampliar os conhecimentos sobre a variabilidade genética da espécie no Brasil, iniciou-se um estudo, o qual correspondeu as atividades do doutorado sanduíche, realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, com a utilização de marcadores microssatélites, com o objetivo de correlacionar esses marcadores com características de resistência à *Colletotrichum* spp., como também comparar geneticamente os genótipos estudados entre si, e com cultivares conhecidas, oriundas de bancos de germoplasmas.

Por fim, o capítulo V compõe o estudo do comportamento dos fitopatógenos causadores da antracnose frente a ação de agentes de biocontrole, que é de fundamental importância para seleção de controladores biológico eficientes para o controle da doença. Esses conhecimentos fornecerão subsídios para que estratégias de controle e prevenção de doenças de forma sustentável possam ser tomadas, evitando danos e/ou perdas em plantios desta espécie florestal de interesse econômico, assim como, para a seleção e desenvolvimento de novas cultivares adaptadas e resistentes a doenças para o sul do Brasil.

2. CAPÍTULO 1: Primeiro relato de *Colletotrichum nymphaeae* causando antracnose em *Carya illinoensis* no Brasil. Plant Disease, v. 103, n. 12, p. 3277-3277, 2019.

Tales Poletto^a, Marlove Fátima Brião Muniz^a, Elena Blume^a, Vinícius Spolaor Fantinel^a, Lia Rejane Silveira Reiniger^b, Paulo Sérgio Torres Brioso^c, Ricardo Harakava^d, Valdir Marcos Stefenon^e, Igor Poletto^f

^a Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil;

^b Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil; ^c Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

^d Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil;

^e Núcleo de Ecologia Molecular e Micropropagação Vegetal, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brasil e;

^f Laboratório de Proteção de Plantas e Controle Biológico, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brasil.

A produção de noz-pecã no Brasil ocorre principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná e esses Estados produzem juntos cerca de 6.700 toneladas por ano. Ela é cultivada em pequenas propriedades familiares e em pomares comerciais com áreas que variam de 0,5 a 150 ha. Desde 2014, os sintomas da antracnose são observados em pomares no município de Santa Maria (29° 41' 22" S, 53° 48' 53" W), Rio Grande do Sul. Os frutos infectados apresentavam lesões escuras, deprimidas e de formato irregular. Estas produziram abundantes acérvulos cobertos por massa de conídios de coloração alaranjadas clara. As lesões se expandiram ao longo do tempo, resultando em abscisão do fruto. A doença ocorreu de janeiro a março e se intensificou em anos com verões chuvosos, com queda de 20 a 60% nos frutos, conforme relatado pelos produtores. Nas folhas, os sintomas consistiam em lesões circulares de até 5 mm com centros claro e apresentando rachaduras, margens marrons escuras e um halo amarelado ao redor da lesão. Em fevereiro de 2019, frutos e folhas de plantas de nogueira-pecã oriundas de sementes, com sintomas da doença foram coletados e desinfestados com etanol a 70% por 30 s e hipoclorito de sódio a 1% por 5 min. Os tecidos vegetais foram lavados três vezes em água destilada estéril, colocados em câmara úmida e incubados a 25 ± 1 °C com fotoperíodo de 12 h. Após 3 dias, os conídios das lesões de folhas e frutos foram transferidos para meio batata-

dextrose-água (BDA) e crescidos por 7 dias. Posteriormente, culturas puras foram obtidas por isolamento monospórico e cultivadas em meio BDA a 25 ± 1 °C por 8 dias e fotoperíodo de 12 h, sob luz fluorescente. As colônias de folhas e frutos apresentaram características morfológicas semelhantes. A cor da superfície superior das colônias variava de branco a cinza e cinza-oliva a laranja claro na face inferior. O crescimento médio diário foi de 9 mm de diâmetro. Os conídios eram hialinos, asseptados, cilíndricos a clavados, exibindo extremidades arredondadas para agudas, com comprimento e largura variando de 12,1 a 17,6 μm (média = 14,5 μm) e 4,1 a 5,9 μm (média = 5,1 μm), respectivamente, $n = 50$. Os caracteres morfológicos foram equivalentes à descrição de *Colletotrichum nymphaeae* (DAMM et al., 2012). Para análise molecular, o fungo foi isolado do fruto e os genes parciais da actina (ACT) e calmodulina (CAL) foram amplificados e sequenciados. As sequências genéticas de ACT (MK622275) e CAL (MK622276) foram depositadas no GenBank e ambas apresentaram 100% de similaridade com *C. nymphaeae* (IDKP339276 e MH793688, respectivamente). Com base nas características morfológicas e moleculares, o fungo foi identificado como *C. nymphaeae*. O teste de patogenicidade foi realizado in vivo, em frutos e folíolos de noqueira-pecã com 20 anos de idade. Dez frutos e folíolos foram desinfestados superficialmente com etanol a 70% e inoculados com discos de 3 mm de meio BDA contendo acérvulos e conídios de *C. nymphaeae*. Os tratamentos controle receberam apenas discos de BDA. Os locais inoculados foram feridos com uma agulha estéril para facilitar a infecção. Os frutos inoculados foram embrulhados em um saco plástico contendo algodão umedecido, que foi retirado no terceiro dia. O teste foi repetido três vezes. Sintomas semelhantes às observações originais estavam nos locais inoculados com *C. nymphaeae* após 5 dias em frutos e 7 dias em folíolos. Não foram observados sintomas nos tratamentos controle. Posteriormente, o patógeno foi isolado do tecido lesionado, completando os postulados de Koch. Já foi relatado que a espécie causa antracnose em *Carya illinoensis* na China (ZHANG et al., 2019) e podridão amarga em *Malus × domestica* Bork no Brasil (VELHO et al., 2014). No entanto, este é o primeiro relato de *C. nymphaeae* causando antracnose em *C. illinoensis* no Brasil. A identificação desse patógeno permitirá o estudo de estratégias para o manejo da doença no Brasil.

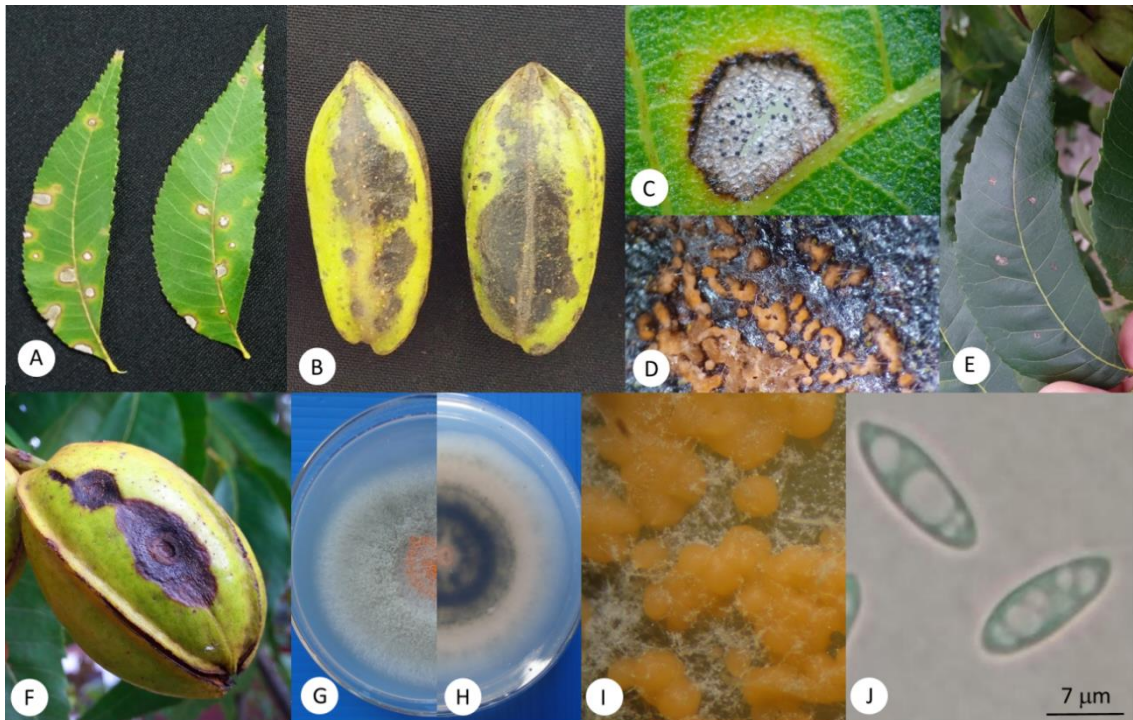
2.1 Referências bibliográficas

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012

Zhang, Y.B., Meng, K., Shu, J.P., Zhang, W., Wang, H.J. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1432, 2019.

Velho, A. C., Stadnik, M. J., Casanova, L., Mondino, P., Alaniz, S. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in southern Brazil. *Plant disease*, v. 98, n. 4, p. 567-567, 2014.

Figura 1. **A e B** - Sintomas de antracnose em folíolos e frutos. **C** - Lesão no folíolo, estruturas escuras são acérvulos. **D** - Acérvulos com massa de conídios alaranjados nos frutos. **E e F** - Fruto e folíolo com lesão 10 dias após a inoculação. **G e H** - Parte superior e inferior da colônia. **I** - Massa de conídios formada em BDA. **J** - Conídios.



3. CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. e estratégias de manejo da antracnose em noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) é um dos cultivos florestais exóticos mais importantes do sul do Brasil, sendo responsável pela geração de renda em propriedades rurais. Entretanto, doenças como a antracnose, favorecidas por condições de alta umidade e temperaturas elevadas no verão, dificultam seu cultivo causando prejuízos aos pecanicultores. Utilizando abordagens morfológicas e moleculares, buscou-se caracterizar diferentes espécies de *Colletotrichum* através da análise de isolados associados a frutos de noqueira-pecã com sintomas de antracnose no Rio Grande do Sul, Brasil. Os isolados foram agrupados, por meio das características morfológicas quantitativas, em três morfotipos distintos. Com base em análises morfológicas e filogenética dos isolados, seis espécies de *Colletotrichum* foram identificadas causando antracnose em noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul: *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* e *C. karstii*, apresentando variações na agressividade. Estes resultados fornecem bases para adoção e/ou desenvolvimento de estratégias de manejo da antracnose, em pomares de noqueira-pecã cultivados no sul do Brasil.

Palavras chave: *Carya illinoensis*, manejo de doenças, frutos

Abstract

Pecan (*Carya illinoensis*) is one of the most important exotic forest crops in southern Brazil, being responsible for generating income on rural properties. However, diseases such as anthracnose, favored by conditions of high humidity and high temperatures in summer, make its cultivation difficult, causing damage to pecan farmers. Using morphological and molecular approaches, we sought to characterize *Colletotrichum* species through the analysis of isolates associated with pecan fruits with symptoms of anthracnose in Rio Grande do Sul, Brazil. The isolates were grouped, through quantitative morphological characteristics, into three distinct morphotypes. Based on the morphological and phylogenetic analysis of the isolates, six species of *Colletotrichum* were identified causing anthracnose in pecan trees in Rio Grande do Sul: *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* and *C. karstii*, showing variations in aggressiveness. These results provide a basis for the adoption and/or development of anthracnose management strategies in pecan orchards cultivated in southern Brazil.

Keywords: *Carya illinoensis*, disease management, fruits

3.1 Introdução

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], família Juglandaceae, é uma espécie frutífera decídua, nativa da América do Norte (RIVERA-RANGEL et al., 2018). Em 2021 a produção mundial de nozes (amêndoa) somou 166,4 mil ton., tornando-se o sexto fruto seco mais produzido no mundo. O México e os Estados Unidos lideram a produção, representando 49 e 41% da produção mundial de noz-pecã, respectivamente (INC, 2021). Nesse mesmo ano, o Brasil foi o quarto maior produtor mundial, totalizando 1,7 mil toneladas de nozes sem casca (INC, 2021). A produção de noz-pecã concentra-se nas regiões sul e sudeste do País (POLETTTO et al., 2015), com destaque para o Estado do Rio Grande do Sul, o qual é o principal produtor.

No Brasil, os estudos sobre as doenças da noqueira-pecã estão sendo desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Fitopatologia Eloci Minussi, na Universidade Federal de Santa Maria), com destaque para as manchas foliares, cancro do tronco, podridão de raízes (LAZAROTTO et al., 2014a; WALKER et., 2016; POLETTTO et al., 2018; POLETTTO et al., 2020; ROLIM et al., 2020a; ROLIM et al., 2020b) e a antracnose (POLETTTO et al., 2019). Conhecer as doenças e suas características como, a sintomatologia, os agentes causais e a epidemiologia é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias de manejo para a cultura.

A antracnose, uma das principais doenças da noqueira-pecã, foi relatada pela primeira vez em 1914 nos Estados Unidos, cujo agente causal identificado foi o fungo *Glomerella cingulata* (RAND, 1914). Posteriormente, *G. cingulata* foi relatado na Georgia (BRENNEMAN e REILLY, 1989) e no Alabama (LATHAM, BOWEN e CAMPBELL, 1995), causando antracnose em folhas e frutos, resultando em perdas significativas na produção. Mantz et al. (2010) relataram antracnose em frutos de noqueira-pecã na Argentina, o agente causal foi identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* teleom. [*G. cingulata*]. Na Índia, a antracnose causada por *G. cingulata* foi observada em plantios, causando queda de frutos (PAWAN, 2011). Recentemente, a doença foi diagnosticada em pomares de noqueira-pecã na China e no Brasil, sendo o agente causal identificado como *C. nymphaeae* (ZHANG et al., 2019; POLETTTO et al., 2019).

No geral, os sintomas da antracnose em noqueira-pecã iniciam no final da fase de crescimento dos frutos, com o aparecimento de lesões no pericarpo, as quais são bem definidas,

de coloração escura e deprimidas no centro. O fungo também pode penetrar no tegumento e prejudicar a amêndoa. No final do ciclo, observa-se o apodrecimento e posterior queda dos frutos infectados (BRENNEMAN e REILLY, 1989; LATHAM, BOWEN e CAMPBELL, 1995; MANTZ et al., 2010, ZHANG et al., 2019). Nas folhas, a doença caracteriza-se pelo surgimento de manchas de coloração amarelo-claro que aumentam de tamanho e, finalmente, evoluem para sintomas característicos de antracnose, incluindo lesões de formato irregular com um halo clorótico (ZHANG et al., 2019; POLETTO et al., 2019).

O gênero *Colletotrichum* apresenta alta diversidade de espécies, incluindo patógenos importantes, os quais causam doenças em uma ampla variedade de plantas no mundo inteiro, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (CANNON et al., 2012; SHARMA e SHENOY, 2016). Algumas espécies de *Colletotrichum* apresentam especificidade quanto ao hospedeiro como por exemplo, *C. musae* (*Musa* spp.), *C. nupharicola* (*Nuphar lutea* L. Smith) e *C. lindemuthianum* (*Phaseolus vulgaris* L.) (SHARMA e SHENOY, 2016). Entretanto, vários estudos mostram que a antracnose não é, necessariamente, causada por uma única espécie de *Colletotrichum*, mas um hospedeiro pode ser infectado por várias espécies do gênero (WANG et al., 2016; HUANG et al., 2013; LIU et al., 2016). Dessa forma, amostragens abrangentes e análises cada vez mais apuradas são necessárias para efetuar a correta identificação dos agentes causais associados a essa doença.

A identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, baseada apenas em critérios morfológicos está propensa a erros, devido a plasticidade de suas características fenotípicas (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009; CANNON et al., 2012), sendo que muitas espécies foram descritas como sinônimos, como foi o caso para *C. gloeosporioides* (complexo *C. gloeosporioides*) (CAIO et al., 2011; WEIR, JOHNSTON e DAMM, 2012). A identificação baseada em critérios moleculares, com análises poligênicas (ITS, ACT, BTUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3 e CAL) (DAMM et al., 2012a), revela, com maior precisão, as espécies pertencentes à complexos de espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2011). O complexo *C. gloeosporioides*, por exemplo, compreende 22 espécies (WEIR, JOHNSTON e DAMM, 2012), e o complexo *C. acutatum* 31 espécies (DAMM et al., 2012b). Assim quando utilizado num sentido amplo, *C. gloeosporioides lato sensus* se referem ao complexo de espécies, já quando for utilizado *C. gloeosporioides stricto sensus* refere-se a espécie determinada (WEIR, JOHNSTON e DAMM, 2012).

Realizar a correta identificação dos patógenos e conhecer os sintomas da doença são fundamentais, pois fornecem subsídios para que estratégias de manejo da doença possam ser

desenvolvidas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da nogueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil, analisando características morfológicas, moleculares e a patogenicidade de isolados fúngicos. Dada a importância da antracnose nos pomares brasileiros, de forma complementar, procurou-se também discutir alguns aspectos sobre a epidemiologia da doença, buscando sua melhor compreensão.

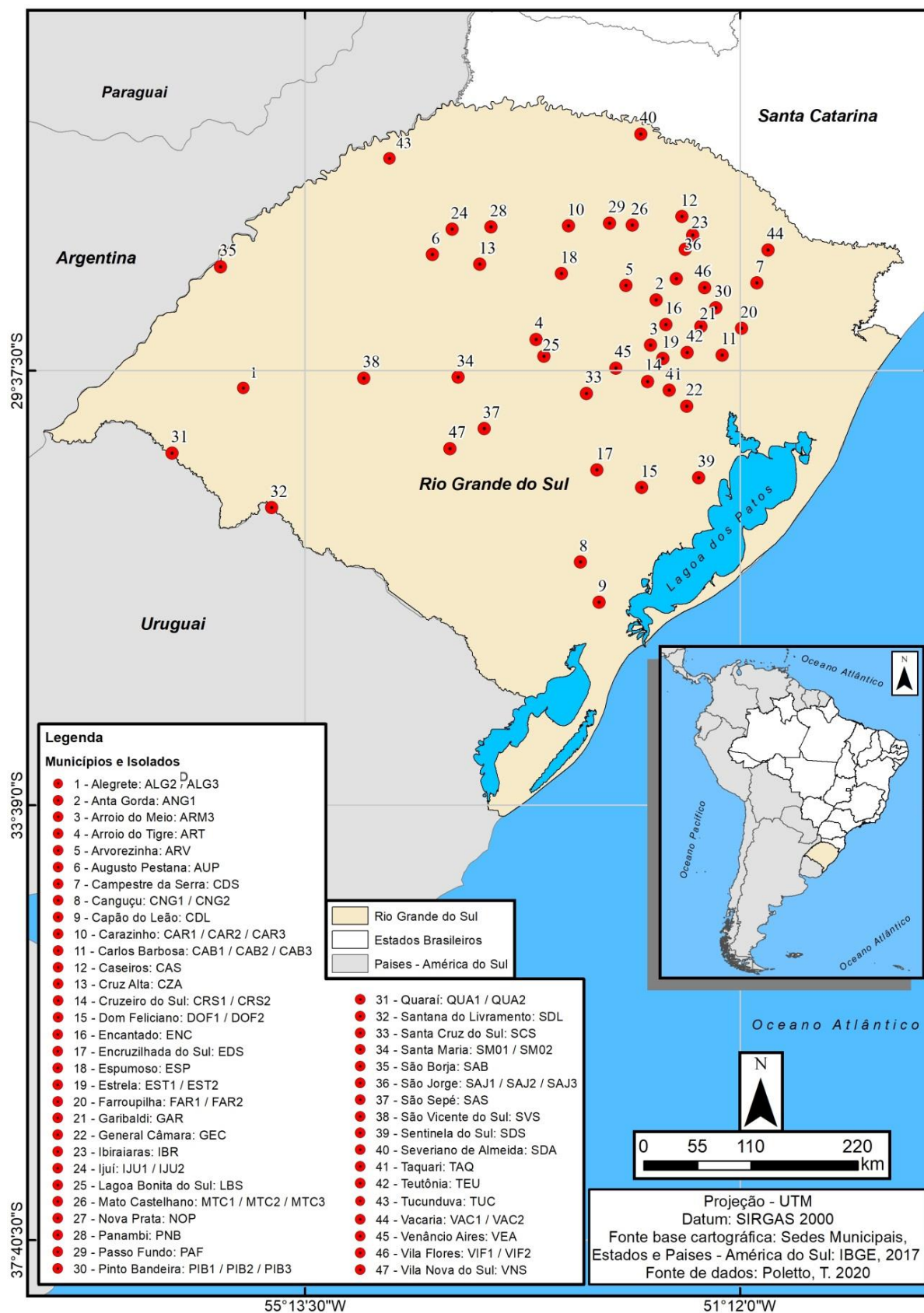
3.2 Material e métodos

3.2.1 Isolamento de *Colletotrichum* spp.

Frutos com sintomas de antracnose foram coletados entre os meses de janeiro a março de 2018, em pomares de nogueira-pecã, abrangendo diferentes regiões produtoras no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1). Os pomares amostrados apresentavam diferentes tamanhos de área (0,5 a 60 ha) e idades (6 a 40 anos) e estão localizados em climas Cfa e Cfb (KUINCHTNER e BURIOL, 2001).

Foram obtidos de um a três isolados de cada pomar amostrado. Para isso, os frutos sintomáticos coletados foram levados ao Laboratório de Fitopatologia Prof^a Elocy Minussi, desinfestados com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% por 1 min, seguido por duplo enxague com água estéril e secos sobre papel filtro esterilizado. Após, foram colocados dentro de caixas gerbox, sobre duas folhas de papel filtro umedecidas e incubados à 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 h, por cinco a sete dias. Conídios foram coletados de acérvulos formados sobre as lesões e transferidos para placas de Petri com meio BDA (batata - dextrose - ágar) e estreptomicina. Culturas puras foram obtidas pelo método de esporo único (FERNANDES, 1993) e cultivadas à 25 ± 1 °C, em BDA. Os isolados obtidos foram armazenados em eppendorfs contendo discos de BDA com estruturas do fungo, submersos em água e glicerol 15% e armazenados a 7 °C, para os estudos subsequentes.

Figura 1. Locais de coleta e códigos correspondentes dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) com antracnose.



3.2.2 Descrição dos sintomas da doença

Em campo e em laboratório foi realizada a identificação dos sintomas da doença, descrevendo nos órgãos vegetais atacados (frutos e folhas) pelo patógeno, o tamanho, o formato, a coloração e a distribuição das lesões. Apesar de a doença acometer os frutos e as folhas, o isolamento de *Colletotrichum* spp. foi realizado apenas de frutos, visto ser o problema mais grave para a cultura.

3.2.3 Análise morfológica

Discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo estruturas de *Colletotrichum* spp. foram retiradas da borda de placas com seis dias de crescimento e transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA e incubadas a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 h por sete dias. Foram montadas cinco repetições por isolado. Durante sete dias o diâmetro das colônias foi ortogonalmente mensurado. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado usando a fórmula $IVCM = \Sigma ((D-D_a)/N)$, onde: D = diâmetro médio atual da colônia e D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior, adaptada de Maguire (1962). O crescimento médio diário (CMD) foi calculado pela relação entre o diâmetro final da colônia e número de dias medidos, a esporulação foi quantificada no sétimo dia utilizando a Câmara de Neubauer.

A coloração das colônias na face inferior foi avaliada seguindo a terminologia da escala de Munsell Soil Colour Chart (Munsell Colour, Grand Rapids, MI, USA). O comprimento e a largura de 50 conídios foram mensurados, projetando as imagens dos conídios em monitor pelo sistema de vídeo/câmera, acoplado ao microscópio ótico Zeiss, primo star, onde 1 mm na imagem correspondeu a 0,595 μ m na escala real. Outras características morfológicas como presença de setores e da fase sexuada, cor da massa conidial e formato dos esporos foram avaliadas.

Os dados morfológicos quantitativos foram utilizados para agrupar isolados semelhantes (morfortipos), utilizando o método de agrupamento da distância média não ponderada (UPGMA), ajustados pela matriz de distância de Mahalanobis, utilizando o software Genes (CRUZ, 2013). Isolados representantes para cada morfortipo (totalizando 18 isolados) foram escolhidos para a análise molecular e filogenética.

3.2.4 Extração de DNA, reação da PCR e sequenciamento

O DNA genômico de cada isolado foi extraído de colônias crescidas em meio BDA com sete dias, usando o método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1991). As amostras de DNA genômico foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação da região actina (ACT), com os iniciadores ACT-512F/ACT-783R (CARBONE e KOHN, 1999) e beta-tubulina 2 (β -tub2), BT2F/BT4R (WOUDENBERG et al., 2009)

O Mix da PCR continha aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 1x, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 nM de cada oligonucleotídeos iniciadores, 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 MJ Research, sob as seguintes condições de ciclo. Desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 10 s, 54 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, e finalizado com um ciclo de 72 °C por 4 min. Os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA a 0,5 M e 4 ml de água destilada), contendo brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados por precipitação com PEG 6000 (SCHMITZ e RIESNER, 2006) e, posteriormente, sequenciados em um sequenciador ABI 3500 xL Thermo Fisher Scientific.

3.2.5 Análise molecular e filogenética

Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o software BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos dos genes parciais ACT e β -tub2 obtidas para os 18 isolados foram comparadas com as já existentes no GenBank, através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e após concatenadas utilizando o software Mesquite 3.6 (MADDISON e MADDISON, 2019).

O alinhamento das sequências foi realizado pelo algoritmo ClustalW e a análise filogenética foi conduzida adotando-se o método “Maximum Likelihood”, pelo modelo Kimura 2-parâmetros, com 1000 replicatas pelo software MEGA versão 10 (KUMAR et al., 2018). Os 18 isolados identificados foram liofilizados e depositados no Herbário do Departamento de Biologia (SMDB) da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, sendo devidamente cadastrados no SISGEN (Cadastro n. ACCDFA6), e as sequências genéticas obtidas depositadas no GenBank (Tabela 1).

Tabela 1. Números de acesso no GenBank e no Herbário SMDB dos isolados identificados, coletados em pomares de noqueira-pecã no Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécie	Isolado	Acesso GenBank		SMDB
		ACT	β -tub2	
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	SAJ2	MT981210	MT981219	19519
	SDL	MT981211	MT981220	19520
	SM01	MK622275	MT981221	19521
	ALG3	MT981212	MT981222	19522
	AUP	MT981213	MT981223	19523
	SDS	MT981214	MT981224	19524
	TAQ	MT981215	MT981225	19525
	GEC	MT981216	MT981226	19526
	SDA	MT981217	MT981227	19527
	CDS	MT981218	MT981228	19528
<i>C. fioriniae</i>	SAS	MT981231	MT981229	19529
	CDL	MT981232	MT981230	19530
<i>C. gloeosporioides</i>	SAB	MT981239	MT981242	19531
	MTC2	MT981240	MT981243	19532
	CZA	MT981241	MT981244	19533
<i>C. siamense</i>	ADM3	MT981235	MT981236	19534
<i>C. kahawae</i>	PIB1	MT981237	MT981238	19535
<i>C. karstii</i>	FAR2	MT981233	MT981234	19536

3.2.6 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi adaptado de Huang et al. (2013). Frutos sadios e em fase de enchimento foram coletados de uma árvore de noqueira-pecã originária de semente, e levados para o Laboratório de Fitopatologia Prof^a Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria. Os frutos foram superficialmente desinfestados mergulhando-os em uma solução com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% por 1 min, seguido por duplo enxague com água esterilizada. Após secos, os frutos foram acomodados em bandejas plásticas transparentes com duas folhas de papel filtro estéreis umedecidas.

Um isolado representativo de cada espécie identificada foi selecionado para o teste de patogenicidade. Foi produzido, com um bastão de vidro estéril com ponta cônica, em dois locais no pericarpo dos frutos, um pequeno ferimento de 1 mm de profundidade. Um disco de meio BDA de 5 mm, contendo estruturas de *Colletotrichum* spp. com sete dias de crescimento, foi depositado em cada ferimento. No tratamento controle, os frutos foram inoculados apenas com discos de meio BDA. Para a formação da câmara úmida, as bandejas foram fechadas com sacos plásticos e incubadas a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 h, e os frutos analisados diariamente para visualização dos sintomas. O teste foi realizado em delineamento experimental

inteiramente casualizado. Foram utilizadas dez replicatas por isolado e, cada uma representada por dois frutos. A avaliação ocorreu até o décimo segundo dia pós-inoculação. O local inoculado foi mensurado ortogonalmente para obtenção do diâmetro das lesões (mm) e considerado infectado quando as manchas necróticas foram significativamente maiores do que o controle. A incidência de infecção foi calculada pela fórmula [Incidência (%) = (locais infectados / locais inoculados) × 100]. O teste de patogenicidade em folíolos (coletados no período de enchimento dos frutos, aproximadamente aos 120 dias após a brotação) seguiu a mesma metodologia dos frutos com uma modificação, a inoculação foi realizada em seis locais do tecido foliar, primeiramente foi provocado um ferimento (leve punção com um bastão de vidro estéril com ponta cônica) em cada um dos locais, e após, inoculado um disco de meio BDA de 5 mm, contendo estruturas de *Colletotrichum* spp.

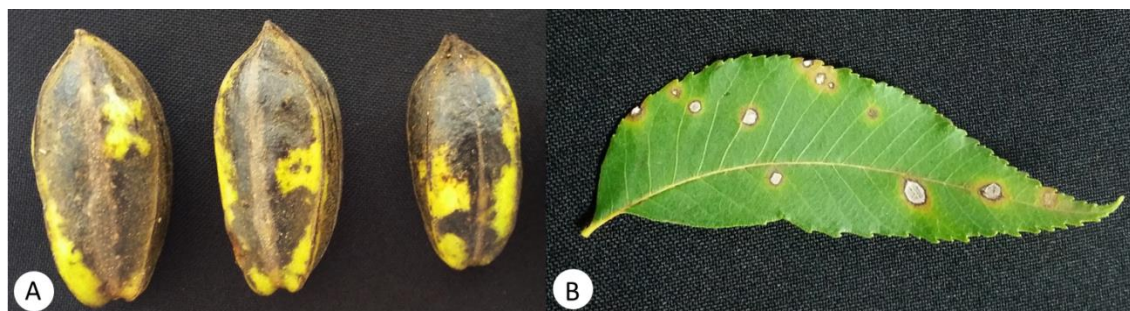
3.3 Resultados

3.3.1 Descrição dos sintomas da doença

Os sintomas da antracnose encontrados em frutos e folhas em pomares do Rio Grande do Sul foram semelhantes aos descritos na literatura para outros hospedeiros. Nos frutos, especialmente no pericarpo, a doença causa lesões escurecidas com formato irregular e deprimidas no centro, levando a abscisão dos mesmos (Figura 2 A). Os sintomas da antracnose iniciam, principalmente, na fase de enchimento dos frutos (janeiro/fevereiro) seguindo até o final do ciclo vegetativo.

Nas folhas, os sintomas são lesões arredondadas de até 5 mm de diâmetro, com centro claro, geralmente apresentam rachaduras centrais, margem marrom-escura e um halo amarelado, geralmente não coalescem e não causam abscisão foliar, entretanto aparecem em grande quantidade sobre o tecido foliar (Figura 2 B). Os sintomas surgem no início do período vegetativo e perduram até a fase senil da cultura.

Figura 2. Sintomas de antracnose causados por *Colletotrichum* spp. em frutos (A) e folhas (B) de *Carya illinoensis* observados em campo.



3.3.2 Caracterização morfológica de *Colletotrichum* spp.

No total, foram obtidos 68 isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos sintomáticos, coletados em pomares de noqueira-pecã, em 47 municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1). Os isolados apresentaram características morfológicas quantitativas e qualitativas distintas entre si, como cor da colônia, formato e tamanho dos conídios.

As características morfológicas das espécies de *Colletotrichum* spp. identificadas neste estudo foram descritas na sequência e agrupadas de acordo com o complexo a que pertencem. Alguns isolados, mesmo pertencendo a mesma espécie, apresentaram algumas variações nas características qualitativas e quantitativas, entretanto a descrição foi baseada no aspecto predominante das culturas para a espécie (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Características morfológicas de *Colletotrichum* spp. identificadas neste estudo.

Espécie	Isolado	Crescimento (mm)	CMD (mm dia ⁻¹)	IVCM	Conídios (µm)		Esporulação (esporos ml ⁻¹)
					Comprimento	Largura	
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	SAJ2 ^x	58,7	8,4	15,8	12,5 (14,6 - 11,1)	3,8 (4,7 - 3,1)	4,9x10 ⁶
	SDL ^x	60,8	8,7	16,2	10,9 (12,7 - 9,4)	3,6 (4,1 - 3,2)	5,6x10 ⁶
	SM01 ^x	60,3	8,6	17,1	12,0 (15,0 - 9,8)	3,6 (4,7 - 2,4)	6,2x10 ⁶
	ALG3 ^x	61,1	8,7	15,8	11,3 (13,2 - 8,7)	3,8 (4,9 - 3,2)	4,5x10 ⁶
	AUP ^x	57,1	8,2	14,6	11,8 (14,2 - 9,7)	4,1 (4,8 - 3,3)	5,2x10 ⁶
	SDS ^x	60,0	8,6	15,2	11,9 (14,4 - 9,8)	3,7 (4,5 - 3,3)	7,9x10 ⁶
	TAQ ^x	61,4	8,8	14,5	12,5 (16,7 - 12,7)	4,0 (4,9 - 3,3)	1,3x10 ⁶
	GEC ^x	61,0	8,7	16,2	12,5 (17,1 - 10,2)	3,9 (4,6 - 3,3)	4,8x10 ⁶
	SDA ^x	59,0	8,3	14,3	10,7 (13,9 - 8,7)	3,8 (4,9 - 3,1)	7,4x10 ⁶
	CDS ^x	56,1	8,0	15,4	11,0 (14,3 - 9,1)	4,4 (4,9 - 3,3)	5,5x10 ⁶
	Média	59,5 e*	8,5 d	15,5 d	11,9 c	3,8 e	5,3x10⁶ a
<i>C. fioriniae</i>	SAS ^x	64,8	9,3	17,2	12,2 (14,2 - 10,3)	3,8 (4,4 - 3,3)	3,7x10 ⁶
	CDL ^x	58,1	8,3	14,3	11,3 (13,8 - 9,2)	4,8 (5,7 - 4,1)	5,1x10 ⁶
	Média	61,5 e	8,8 d	15,8 d	11,7 c	4,3 d	4,4x10⁶ a
<i>C. gloeosporioides</i>	SAB ^y	84,7	12,1	21,6	14,9 (17,5 - 12,9)	4,8 (5,7 - 4,0)	1,9x10 ⁶
	MTC2 ^y	81,0	11,6	21,3	14,1 (16,2 - 12,3)	4,9 (5,7 - 4,1)	3,4x10 ⁶
	CZA ^y	83,1	11,9	22,1	14,5 (17,9 - 12,9)	5,0 (5,9 - 4,1)	4,2x10 ⁶
	Média	82,9 c	11,8 c	21,7 c	14,5 a	4,9 c	3,2x10⁶ a
<i>C. siamense</i>	ADM3 ^y	86,4	12,3	24,7	14,5 (17,0 - 11,4)	4,8 (5,4 - 4,1)	3,4x10 ⁶
	Média	86,4 b	12,3 b	24,7 b	14,5 a	4,8 c	3,4x10⁶ a

<i>C. kahawae</i>	PIB1 ^y	90,0	12,9	26,5	14,7 (16,5 - 12,6)	5,5 (7,4 - 4,5)	7,0x10 ⁵
	Média	90,0 a*	12,9 a	26,5 a	14,7 a	5,5 b	7,0x10⁵ b
<i>C. karstii</i>	FAR2 ^z	64,4	9,2	15,8	12,9 (15,4 - 10,9)	5,9 (6,9 - 5,0)	7,4x10 ⁴
	Média	64,3 d	9,2 c	15,8 d	12,9 b	5,9 a	7,4x10⁴ b
	CV (%)	3,4	3,4	6,0	10,5	10,2	59,1

*Medidas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade de erro com base no teste t por Scott-Knott. CMD: Crescimento médio diário; IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial; ^x Morfotipo 1; ^y Morfotipo 2; ^z Morfotipo 3.

Complexo *Colletotrichum acutatum* - *C. nymphaeae* (isolados SAJ2, SDL, SM01, ALG3, AUP, SDS, TAQ, GEC, SDA e CDS): em meio BDA, a cor das colônias na superfície superior variou de cinza-claro a cinza-escuro e na parte inferior cinza-escuro. O crescimento total médio no sétimo dia variou entre os isolados, de 57,1 a 61,4 mm (med. 59,5 mm), o crescimento médio diário (CMD) variou de 8,0 a 8,8 mm/dia (med. 8,5 mm/dia) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi de 14,3 a 17,1 (med. 15,5) (Figura 3A).

Os conídios formaram-se em acérvulos abundantes de cor laranja-claro e não foi observada a presença de setas. Os conídios eram hialinos, unicelulares, com formato cilíndrico a cilíndrico-clavado, retos, exibindo extremidades arredondadas a agudas, com comprimento e largura variando de 10,7 a 12,5 µm (med. 11,9 µm) e 3,6 a 4,4 µm (med. 3,8 µm), respectivamente. A esporulação variou de 1,3x10⁶ a 7,9x10⁶ conídios ml⁻¹ (med. 5,3 x 10⁶ conídios ml⁻¹).

Colletotrichum fioriniae (isolados SAS e CDL): as colônias apresentaram coloração branca a cinza-claro no lado superior e roxa acastanhado com manchas cinza-escuras no reverso. O crescimento micelial total médio foi de 61,5 mm, entre os dois isolados, o CMD médio foi de 8,8 mm/dia e o IVCM foi 15,8 (Figura 3B).

Os conídios eram formados em acérvulos dispersos de cor laranja, apresentavam formato fusiforme, com as extremidades afiladas, hialinos, unicelulares e de paredes finas. O comprimento médio variou de 11,3 a 12,2 µm (med. 11,7 µm) e a largura variou de 3,8 a 4,8 µm (med. 4,3 µm). A esporulação média foi de 4,4x10⁶ conídios ml⁻¹.

Complexo *Colletotrichum gloeosporioides* - *C. gloeosporioides* (isolados SAB, MTC2 e CZA): as culturas apresentaram micélio aéreo esparso, de coloração branca a cinza-claro, com formação abundante de acérvulos de coloração alaranjado escuro, produzidos em anéis concêntricos, com presença de setas. Na face inferior as colônias apresentaram coloração alaranjada clara e pontos escuros. No sétimo dia o crescimento micelial dos isolados variou de

81,0 a 84,7 μm (med. 82,9 μm), o CMD variou de 11,6 a 12,1 mm/dia (med. 11,8 mm/dia) e o IVCM variou de 21,3 a 21,6 (med. 21,7) (Figura 3C).

Os conídios eram hialinos, unicelulares, com formato cilíndrico, com extremidades obtusas e gutulados, apresentando comprimento médio de 14,1 a 14,9 μm (med. 14,5 μm) e 4,8 a 5,0 μm (med. 4,9 μm) de largura e esporulação média de $3,2 \times 10^6$.

Colletotrichum siamense (isolado ADM3): a colônia apresentou coloração na face superior branca a cinza-claro e, na face inferior, coloração laranja clara para cinza oliváceo. Foi observada a formação de acérvulos de coloração laranja claro em anéis concêntricos. O crescimento médio total ao sétimo dia foi de 86,4 mm, o CMD foi de 12,3 mm e o IVCM 24,7 (Figura 3D).

Os conídios eram hialinos, unicelulares, cilíndricos de extremidades obtusas, paredes lisas, gutulados, medindo 11,4 a 17,0 μm (med. 14,5 μm) de comprimento e 4,1 a 5,4 (med. 4,8 μm). A esporulação média foi de $3,4 \times 10^6$.

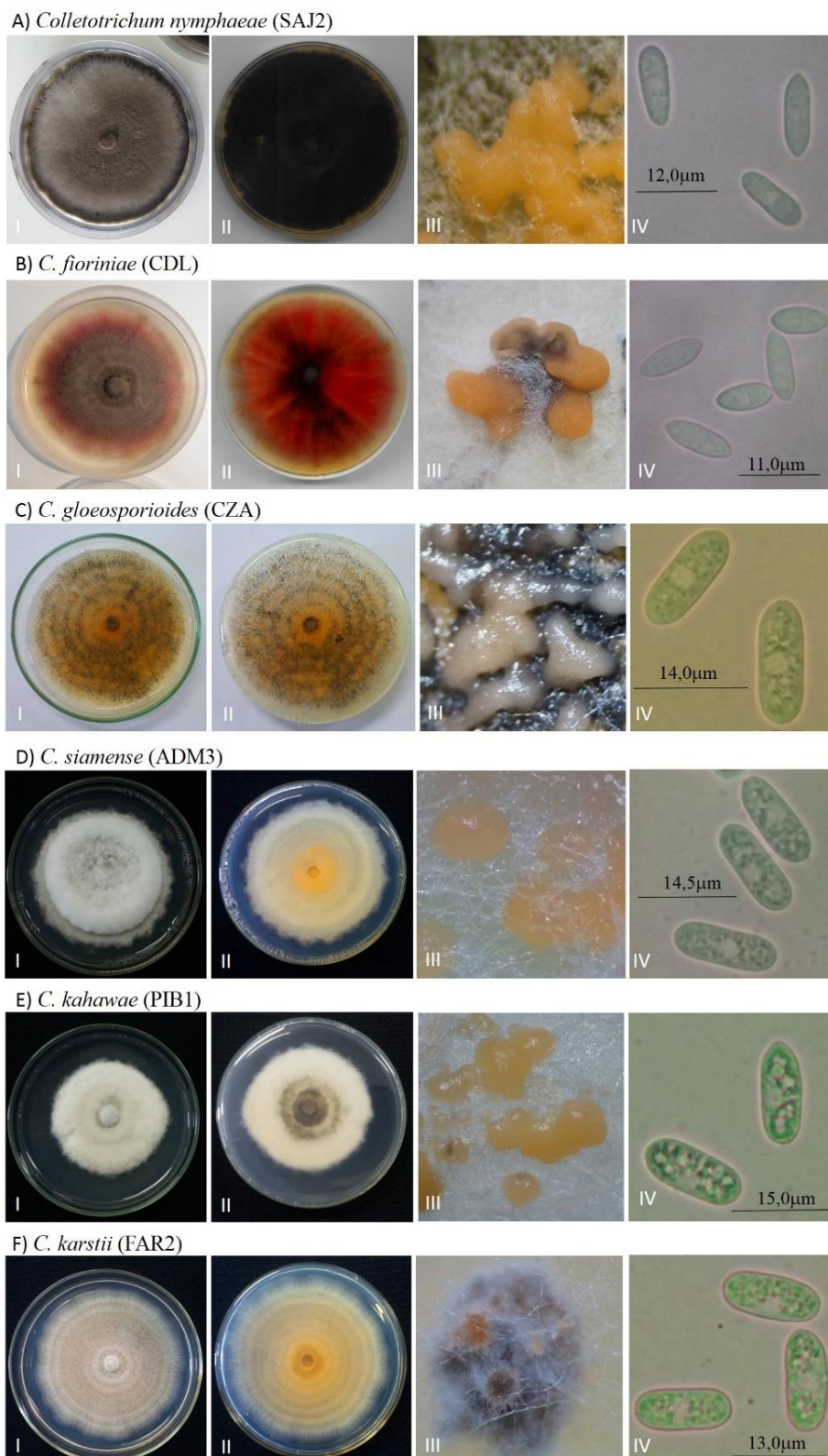
Colletotrichum kahawae (isolado PIB1): o isolado apresentou coloração da face superior da colônia branca a bege e na face inferior, bege para cinza escura. O isolado formou acérvulos como massa de conídios de coloração laranja claro. A colônia apresentou crescimento total médio ao sétimo dia de 90,0 mm e o CMD foi de 12,9 mm, com IVCM de 26,5, apresentando o maior desenvolvimento entre todos os isolados (Figura 3E).

A formação de conídios foi pouco abundante, apresentou esporulação total de $7,0 \times 10^5$, os conídios eram hialinos, lisos, unicelulares, cilíndricos com extremidades obtusas e gutulados, mediam 16,5 a 12,6 μm (med. 14,7 μm) de comprimento e 7,4 a 4,5 (med. 5,5 μm).

Complexo *Colletotrichum boninense* - *Colletotrichum karstii* (isolado FAR2): a colônia apresentou coloração esbranquiçada na face superior e amarelo claro a bege no reverso. Os acérvulos apareciam sobre o meio de cultura, principalmente agrupados, com coloração laranja pálido. A colônia apresentou crescimento total médio, ao sétimo dia 62,6 a 65,3 mm (med. 64,4 mm), o CMD variou de 9,2 mm e o IVCM foi de 15,8 (Figura 3F).

Os conídios eram hialinos, lisos, unicelulares, cilíndricos, com extremidades obtusas e gutulados, mediando 10,9 a 15,4 μm (med. 12,9 μm) de comprimento e 5,0 a 6,9 (med. 5,9 μm). A esporulação média foi de $7,4 \times 10^4$.

Figura 3. Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp.; (A) *C. nymphaeae* – SAJ2; (B) *C. fiorinae* – CDL; (C) *C. gloeosporioides* – CZA; (D) *C. siamense* – ADM3; (E) *C. kahawae* – PIB1; (F) *C. karstii* – FAR2; (I) Morfologia da colônia em BDA (face superior); (II) Morfologia da colônia em BDA (face inferior); (III) Acérvulos; (IV) Conídio.

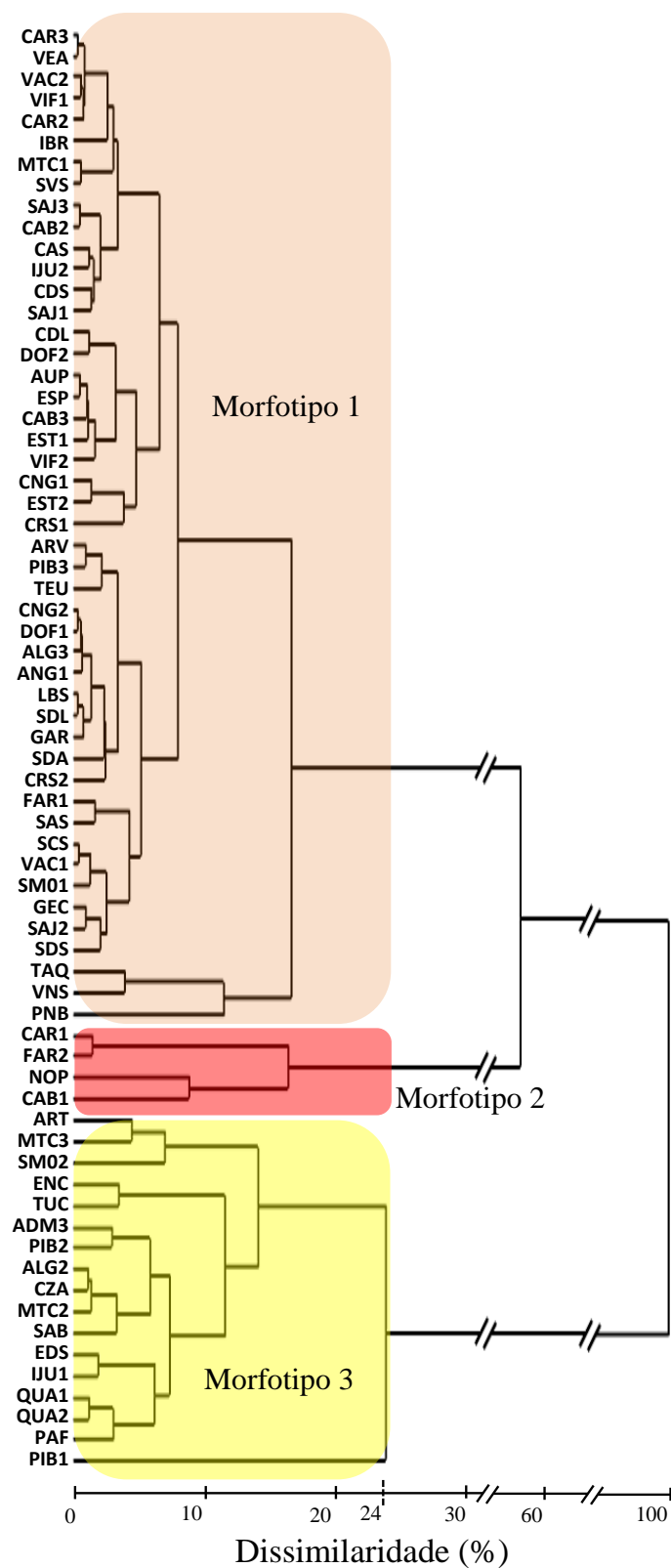


3.3.2.1 Análise multivariada (morfortipos)

Baseado nas características morfológicas quantitativas, a análise de agrupamento gerou um dendrograma de dissimilaridade com três grupos distintos (morfortipos “1”, “2” e “3”), os quais foram separados a corte de 24% de dissimilaridade (Figura 4). A contribuição relativa dos caracteres morfológicos quantitativos para divergência dos isolados foi: crescimento médio diário (50,1%), crescimento total (42,2%) e largura dos conídios (3,2%), outros (4,5%). Dos 68 isolados obtidos, 47 isolados (69%), pertenceram ao morfortipo “1”, quatro isolados (6%), pertenceram ao morfortipo “2” e 17 isolados (25%) pertenceram ao morfortipo “3” (Figura 4).

Dezoito isolados representativos foram selecionados para realização da análise molecular, sendo 12 para o morfortipo “1”, um para o morfortipo “2”, e cinco para o morfortipo “3”. Os isolados representantes de cada morfortipo foram selecionados abrangendo diferentes regiões geográficas do Rio Grande do Sul.

Figura 4. Dissimilaridade morfológica (%) entre os 68 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos pelo método UPGMA, baseado na matriz de distância de Mahalanobis usando as características, crescimento micelial, IVCN, CMD, esporulação, comprimento e largura de conídios. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,87.

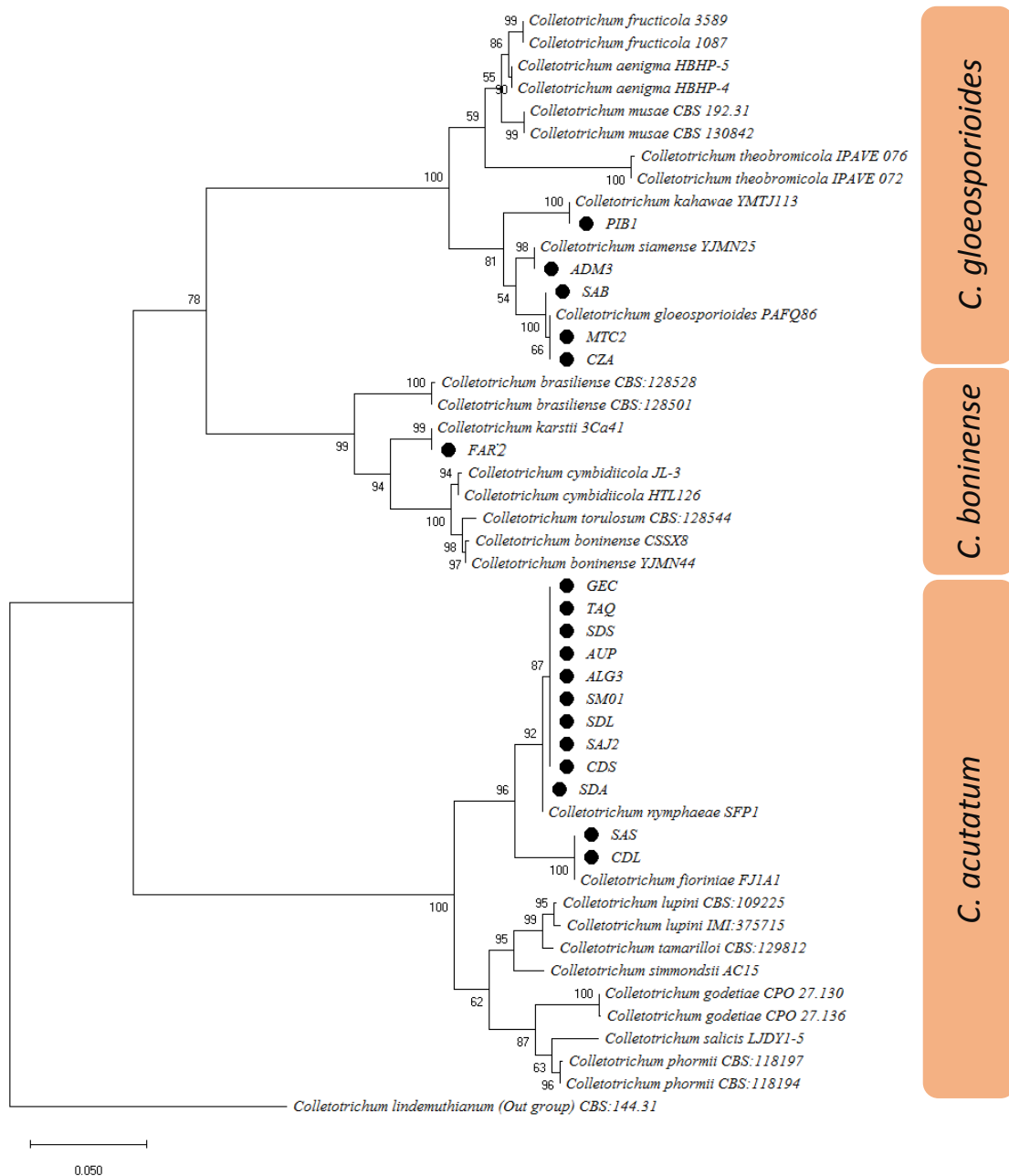


3.3.3 Análise filogenética

Os fragmentos de DNA obtidos para os genes parciais da ACT e β -tub2, dos 18 isolados selecionados geraram sequências com, aproximadamente, 240 e 500 pb, respectivamente. A análise filogenética multigênica agrupou os isolados SAJ2, SDL, SM01, ALG3, AUP, SDS, TAQ, GEC, SDA, CDS num mesmo clado, juntamente com outra sequência de referência de *C. nymphaeae*, o suporte estatístico bootstrap para esse clado foi de 92 %, (Figura 4). As sequências dos isolados SAS e CDL foram agrupadas no mesmo clado, juntamente com a sequência de *C. fioriniae* com suporte de bootstrap de 100%. A análise filogenética demonstrou que todos os 12 isolados selecionados, correspondentes ao morfotipo “1” pertencem ao complexo de espécies de *C. acutatum* (Figura 5).

O isolado FAR2, representante do morfotipo “2”, foi identificado como *C. karstii*, o qual foi agrupado juntamente com a sequência referência de *C. karstii*, o qual pertence ao complexo de espécies *C. boninense*. O suporte de bootstrap para o clado foi de 99%. Os isolados SAB, MTC2 e CZA foram identificados como *C. gloeosporioides stricto sensu*, o isolado ADM3 foi identificado como *C. siamense* e o isolado PIB1 como *C. kahawae*, o suporte de bootstrap para cada clado foi de 100, 98 e 100%, respectivamente. Esses cinco isolados, representantes do morfotipo “3”, pertencem ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*.

Figura 5. Árvore filogenética multigênica obtida a partir das sequências dos genes parciais actina (ACT) e beta-tubulina 2 (β -tub2), de 18 isolados de *Colletotrichum* spp., associados à antracnose da noqueira-pecã, de acordo com o método estatístico “Maximum Likelihood”. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Caixa a direita do clado indica o complexo do fungo.



3.3.4 Teste de patogenicidade

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. testados foram patogênicos, causando lesões típicas de antracnose nos frutos e nas folhas de nogueira-pecã inoculadas (Tabela 3 e Figura 6). Os sintomas iniciaram no quarto dia após a inoculação nos frutos e nas folhas. Não houve aparecimento de sintomas nos tratamentos controle em frutos e folhas.

Tabela 3. Diâmetro das lesões de *Colletotrichum* spp. em frutos e folhas de *Carya illinoensis*.

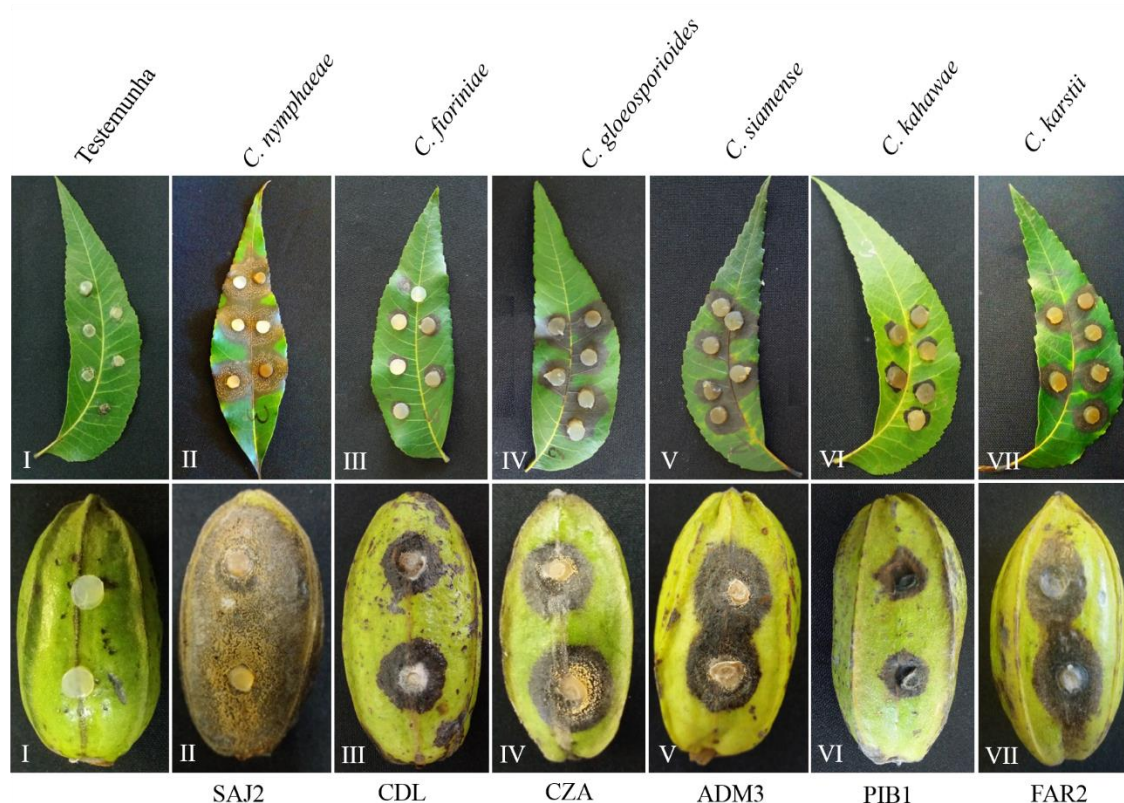
Espécie	Diâmetro das lesões em frutos (mm)	Diâmetro das lesões em folhas (mm)
<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (SAJ2)	20,3 a*	14,8 a
<i>C. fiorinae</i> (CDL)	13,2 c	10,6 b
<i>C. gloeosporioides</i> (CZA)	17,0 b	13,7 a
<i>C. siamense</i> (ADM3)	15,7 b	9,6 bc
<i>C. kahawae</i> (PIB1)	9,8 d	8,4 c
<i>C. karstii</i> (FAR2)	15,1 bc	10,1 bc
CV (%)	5,9	10,6

*Medidas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade de erro com base no teste t por Tukey.

Todos os isolados proporcionaram 100% de incidência da doença, ou seja, causaram lesões em todos os pontos de inoculação, tanto em frutos como em folhas, entretanto houve variações no tamanho das lesões dependendo da espécie de *Colletotrichum*. Nos frutos, o isolado de *C. nymphaeae* (SAJ2) produziu lesões com maior diâmetro (20,3 mm), diferindo estatisticamente dos demais. Vale salientar que, em observação visual, este isolado produziu grande quantidade de acérvulos sobre as lesões tanto nos frutos como nas folhas, o que não foi tão expressivo nos outros isolados. Por outro lado, o isolado de *C. kahawae* (PIB1) produziu o menor tamanho de lesão nos frutos (9,8 mm), os demais isolados produziram lesões de tamanho intermediário.

Nas folhas, o isolado de *C. nymphaeae* (SAJ2) e de *C. gloeosporioides* (CZA), produziram lesões significativamente maiores que os demais, 14,8 e 13,7 mm, respectivamente e o isolado de *C. kahawae* a menor (8,4 mm), mesmo que não diferiu significativamente dos isolados *C. siamense* (ADM) e de *C. karstii* (FAR2). Para completar os postulados de Koch, foi realizado o reisolamento dos patógenos para meio BDA a partir das lesões produzidas nos frutos e folhas inoculadas.

Figura 6. Resultado do teste de patogenicidade com espécies de *Colletotrichum*, 12 dias após a inoculação em folhas e frutos de noqueira-pecã. (I) Testemunha; (II) *C. nymphaeae* – SAJ2; (III) *C. fioriniae* – CDL; (IV) *C. gloeosporioides* – CZA; (V) *C. siamense* – ADM3; (VI) *C. kahawae* – PIB1; (VII) *C. karstii* – FAR2.



3.4 Discussão

Este estudo revelou que os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de noqueira-pecã com sintomas de antracnose pertencem a seis espécies: *C. nymphaeae* e *C. fioriniae*, pertencentes ao complexo *C. acutatum*; *C. gloeosporioides*, *C. siamense* e *C. kahawae* pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* e *C. karstii*, pertencente ao complexo *C. boninense*.

Até o momento haviam sido relatadas somente duas espécies causando antracnose em noqueira-pecã, *C. gloeosporioides* teleom. [*G. cingulata*] na Argentina (MANTZ et al., 2010), Índia (PAWAN, 2011) e Estados Unidos (LATHAM, BOWEN e CAMPBELL, 1995), como também, *C. nymphaeae* na China (ZHANG, et al., 2019) e no Brasil (POLETTO et al., 2019). O presente estudo identificou quatro espécies adicionais de *Colletotrichum* causando antracnose em noqueira-pecã no Brasil, sendo elas, *C. fioriniae*, *C. siamense*, *C. kahawae* e *C. karstii*.

C. nymphaeae foi a espécie dominante, causadora de antracnose em noqueira-pecã no Estado de Rio Grande do Sul, o que ratifica estudos anteriores que apontaram que a antracnose pode ser causada por várias espécies de *Colletotrichum* em um mesmo hospedeiro, havendo, dentre elas, geralmente, prevalência de algumas espécies. Wang et al. (2016), identificaram 11 espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em Chá-da-índia [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] na China, sendo que *C. fructicola* e *C. camelliae* foram as espécies dominantes, ocorrendo em 30,2 e 31,1% dos 106 isolados, respectivamente.

No teste de patogenicidade, os seis isolados, empregando-se um representante de cada espécie, foram patogênicos tanto para frutos, quanto para folhas de noqueira-pecã. Entretanto, houve variação quanto à agressividade dos isolados. *C. nymphaeae* foi o mais agressivo, resultando nas maiores lesões, tanto em frutos como em folhas. Apesar de não ter sido quantificada, visualmente foi observada uma elevada produção de acérvulos de *C. nymphaeae* sobre as lesões, muito superior às demais espécies inoculadas. Munir et al. (2016), estudando podridão-amarga da maçã (*Malus domestica* Borkh) em Kentucky, EUA, afirmaram maior prevalência geográfica de *C. fioriniae* podendo estar relacionada à fecundidade da referida espécie. Possivelmente, a maior capacidade reprodutiva de *C. nymphaeae* também esteja relacionada com a maior dominância em pomares de noqueira-pecã do Rio Grande do Sul.

Em contrapartida, a agressividade de *C. kahawae* foi a mais baixa. *C. kahawae* é um importante patógeno em outras culturas como em café (*Coffea arabica* L.) causando antracnose nos frutos (WALLER et al., 1993) e mancha-foliar em rúcula (*Eruca sativa* Miller) na Itália (GARIBALDI et al., 2016). *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. fioriniae* e *C. karstii*, apresentaram agressividade intermediária no teste de patogenicidade. Essas espécies também são importantes patógenos, já relatados causando antracnose em diversas culturas (RIOS et al., 2015; VELHO et al., 2014; FANTINEL et al., 2017; RABUSKE et al., 2018; VARJAS et al., 2019).

As características morfológicas das espécies que foram identificadas e descritas neste estudo foram condizentes com estudos registrados na literatura (WEIR, JOHNSTON e DAMM, 2012; DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; MUNIR et al., 2016). Salienta-se que, no presente estudo, *C. fioriniae* expressou uma coloração roxa da colônia, muito diferente das demais espécies. Esses resultados estão de acordo com Munir et al. (2016) e Shivas et al. (2009), os quais relataram que *C. fioriniae* produziu uma peculiar pigmentação roxa em meio BDA, diferenciando-se das demais espécies, servindo como uma importante característica para identificação.

A análise multivariada, baseada nas características morfológicas quantitativas de forma conjunta, agrupou os isolados em três morfotipos. Para os 18 isolados identificados molecularmente todos apresentaram-se coincidentes entre o morfotipo e o seu respectivo complexo de espécies, indicando que a análise multivariada pode ser uma ferramenta útil para fornecer uma diferenciação preliminar de isolados de *Colletotrichum* em nível de complexos de espécies.

A análise multivariada foi também utilizada para diferenciação inicial de isolados de *Neopestalotiopsis* spp., (LAZAROTTO et al., 2014 a), *Fusarium* spp. (LAZAROTTO et al., 2014 b) e *Cladosporium* spp. (WALKER et al., 2016) patogênicos à noqueira-pecã, como também para *Fusarium* spp., patogênicos a erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), os quais foram posteriormente identificados pela análise molecular (MEZZOMO et al., 2019). Segundo Guginski-Piva et al. (2018), os complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* são convencionalmente identificados usando-se caracteres morfológicos.

Apesar das características morfológicas terem sido importantes para diferenciação inicial de *Colletotrichum* spp. neste estudo, Hu, Grabke e Schnabel, (2015) e Weir, Johnston e Damm (2012) destacaram que critérios morfológicos isoladamente não são suficientes para identificar *Colletotrichum* spp., devido a variações nos fenótipos de espécies sob diferentes condições ambientais, além de haver sobreposição de caracteres entre espécies. Cai et al. (2009); Cannon et al. (2012); Hassan et al. (2018), recomendaram a realização de uma abordagem polifásica, combinando técnicas morfológicas tradicionais e ferramentas de diagnóstico molecular para obter resultados apropriados e confiáveis.

No presente estudo a análise multigênica, com os genes ACT e β -tub2, foi informativa para identificação das espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da noqueira-pecã. Cai et al. (2009) salientaram que dados filogenéticos multigênicos fornecem uma compreensão muito melhor do relacionamento dentro de complexos de espécies de *Colletotrichum* e devem ser empregados sempre que possível. Munir et al. (2016) utilizaram o gene β -tub2 e a região gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), para a identificação de cinco espécies de *Colletotrichum* causadoras de podridão amarga da maçã em Kentucky. Alaniz et al. (2019) identificaram *C. fructicola* e *C. karstii* associadas à mancha foliar de glomerella em maçã no Uruguai utilizando os genes GAPDH, β -tub2 e ACT. Noor et al. (2018) identificaram cinco espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em pimentão (*Capsicum* spp.) na Malásia com os genes ACT e GAPDH. A identificação precisa das espécies é fundamental para entender a epidemiologia e desenvolver estratégias de controle efetivo dessa doença (CAI et al., 2009).

Dentre as doenças já diagnosticadas em pomares de noqueira-pecã no Brasil, a antracnose é uma das doenças mais destrutivas e de difícil controle. A doença pode comprometer 60% da produção pela queda de frutos, quando favorecida por condições de altas temperaturas associadas a altas precipitações pluviométricas (POLETTTO et al., 2019). Rovani e Wollmann (2018) mostraram que no Rio Grande do Sul, no período de 1998 a 2013, a temperatura média do ar no verão variou entre 17 e 27 °C, a precipitação pluviométrica variou de 1.651 a 2.000 mm e a umidade relativa média do ar anual variou de 73 a 84%. Silva e Michereff (2013) afirmam que a antracnose atinge maior intensidade quando a temperatura varia entre 24 a 28 °C e na presença de alta umidade relativa. As condições meteorológicas encontradas no Estado do Rio Grande do Sul podem favorecer o desenvolvimento da antracnose em noqueira-pecã.

O ciclo da antracnose em noqueira-pecã não é conhecido, entretanto, infere-se que as primeiras infecções (ciclo primário) ocorram por esporos sexuais (ascósporos) originários de restos culturais do próprio pomar ou de áreas adjacentes, dispersos pelo vento, respingos de chuva ou outros vetores bióticos. As infecções podem ocorrer diretamente pelas flores ou frutos em desenvolvimento, permanecendo quiescente (infecção latente) até o período de enchimento dos frutos, onde ocorre a manifestação da doença. Além disso, o fungo pode infectar as folhas, colonizar e se reproduzir, os esporos assexuais podem ser transmitidos para os frutos, secundariamente (ciclo secundário).

Silva e Michereff (2013) ressaltaram que a antracnose pode ocasionar infecções quiescentes que ocorrem no florescimento ou no desenvolvimento dos frutos, entretanto a expressão da doença é destacada posteriormente, com o amadurecimento do fruto. Os mesmos autores ressaltam que as infecções inativas são uma resposta a condições adversas do hospedeiro ao patógeno, relaciona-se com falta de nutrientes e enzimas importantes para o patógeno, ou compostos antifúngicos nos períodos iniciais de desenvolvimento de fruto.

A principal estratégia de manejo da antracnose em pomares brasileiros vem sendo realizada pelo manejo integrado de doenças, com a implantação dos pomares em áreas adequadas, utilizando espaçamentos que permitam a insolação e arejamento das plantas, podas, adubações equilibradas e principalmente manejando o inóculo inicial, no período hibernal da cultura, por meio da utilização de calda bordalesa ou sulfocálcica e do cultivo de plantas para cobertura de solo. Esforços estão sendo tomados na busca de cultivares resistentes, bem como de agentes de biocontrole para antracnose.

Este estudo buscou trazer informações sobre a antracnose em noqueira-pecã no Brasil, pois conhecer os patógenos causadores, seus sintomas na planta, e a epidemiologia da doença é fundamental para que estratégias de manejo da doença possam ser adotadas, bem como para o embasamento de trabalhos futuros.

3.5 Conclusões

Este estudo identificou, pela análise morfológica e filogenética, seis espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em frutos de noqueira-pecã, que foram *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahavae* e *C. karstii*.

A espécie *C. nymphaeae* apresentou a maior agressividade no teste de patogenicidade, tanto em frutos como em folhas, sugerindo que esta seja a espécie preponderante associada à antracnose em noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Salienta-se a necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia desta doença em pomares de noqueira-pecã no sul do Brasil, sendo que as condições climáticas poderão favorecer o desenvolvimento do patógeno, bem como estratégias de manejo para esta doença, principalmente através de cultivares resistentes.

3.6 Referências bibliográficas

ALANIZ, S., CUOZZO, V., MARTÍNEZ, V., STADNIK, M.J., MONDINO, P. Ascospore infection and *Colletotrichum* species causing glomerella leaf spot of apple in Uruguay. **The Plant Pathology Journal**, v. 35, n. 2, p. 100-111, 2019.

BRENNEMAN, T.B., REILLY, C.C. Recent occurrence of pecan anthracnose caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Disease**, v. 73, n. 9, 1989.

CAI, L., GIRAUD, T., ZHANG, N., BEGEROW, D., CAI, G., SHIVAS, R.G. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 121, 2011.

CAI, L., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W.J., WEIR, B.S., WALLER, J.M., 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**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CANNON, P.F., DAMM, U., JOHNSTON, P.R., WEIR, B.S. *Colletotrichum*—current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CARBONE, I., KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

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

DAMM, U., CANNON, P.F., WOUDEBERG, J.H.C., JOHNSTON, P.R., WEIR, B.S., TAN, Y.P., SHIVAS, R.G., CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2012a.

DAMM, U., CANNON, P.F., WOUDEBERG, J.H.C., CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012b.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39-40, 1990.

FANTINEL, V.S., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., ARAÚJO, M.M., POLETTO, T., DA SILVA, T.T., DUTRA, A.F., MACIEL, C.G., HARAKAVA, R. First Report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose on *Acca sellowiana* fruits in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 1035-1035, 2017.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, p. 128. 1993.

GARIBALDI, A., GILARDI, G., PUGLISI, I., CACCIOLA, S.O., GULLINO, M.L. First report of leaf spot caused by *Colletotrichum kahawae* on cultivated rocket (*Eruca sativa*) in Italy. **Plant Disease**, v. 100 n. 6, p.1240-1240, 2016.

GUGINSKI-PIVA, C.A., BOGO, A., GOMES, B.R., MENON, J.K., NODARI, R.O., WELTER, L.J. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *C. fructicola* associated with anthracnose symptoms of grape in Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 4, p. 405-413, 2018.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41 p. 95-98, 1999.

HASSAN, O., JEON, J.Y., CHANG, T., SHIN, J.S., OH, N.K., LEE, Y.S. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1015-1024, 2018.

HU, M.J., GRABKE, A., SCHNABEL, G. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 797-805, 2015.

HUANG, F., CHEN, G.Q., HOU, X., FU, Y.S., CAI, L., HYDE, K.D., LI, H.Y. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 61-74, 2013.

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**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT (INC). **Nuts & Dried fruits statistical yearbook 2020 / 2021** (International Nut and Dried Fruit, Reus, Spain), 2021.

KUINCHTNER, A., BURIOL, G.A., The climate of Rio Grande do Sul state according to Köppen and Thornthwaite classification. **Disciplinarum Scientia**. v. 2, n. 1, p. 171-182, 2001.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p.1547-1549, 2018.

LATHAM, A.J., BOWEN, K.L., CAMPBELL, H.L. Occurrence of *Glomerella cingulata* in pecan nut shucks and its association with fungal leaf scorch. **Plant Disease**, v. 79, n. 2, p. 182-185, 1995.

LAZAROTTO, M., MILANESI, P.M., MUNIZ, M.F.B., REINIGER, L.R.S., BELTRAME, R., HARAKAVA, R., BLUME, E. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9390-9402, 2014 a.

LAZAROTTO, M., BOVOLINI, M.P., MUNIZ, M.F.B., HARAKAWA, R., REINIGER, L.R.S., SANTOS, Á.F.D. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 6, p.440-448, 2014 b.

LIU, F., TANG, G., ZHENG, X., LI, Y., SUN, X., QI, X., ZHOU, Y., XU, J., CHEN, H., CHANG,X., ZHANG, S., ZHANG, S. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32761, 2016.

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

MANTZ, G., MINHOT, R., MORRELLI, G., MAIALE, S. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing pecan anthracnose in Argentina. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, 2010.

MADDISON, W.P., MADDISON D.R. Mesquite: um sistema modular para análise evolutiva. Versão 3.61 (<http://www.mesquiteproject.org>). 2019.

MEZZOMO, R., ROLIM, J.M., POLETO, T., ROSENTHAL, V.C., SAVIAN, L.G., REINIGER, L.R.S., MUNIZ, M.F.B. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to *Ilex paraguariensis*. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 209-218, 2018.

MUNSELL SOIL COLOR COMPANY. **Munsell soil-color charts**, 2009.

MUNIR, M. MUNIR, M., AMSDEN, B., DIXON, E., VAILLANCOURT, L., GAUTHIER, N. W. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease**, v. 100, n. 11, p. 2194-2203, 2016.

NOOR, N.M., ZAKARIA, L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. associated with chili anthracnose in peninsular Malaysia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 4, p. 961-973, 2018.

PAWAN, K. Studies on anthracnose of pecan nut caused by *Glomerella cingulata*. **Doctoral thesis**. UHF, NAUNI, SOLAN. 2011.

POLETO, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., FANTINEL, S.V., REINIGER, L.R.S., STEFENON, V.M., HARAKAVA, R., BRIOSO, P.S.T., POLETO, I. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3277-3277, 2019.

POLETO, T., MUNIZ, M.F.B., POLETO, I., BAGGIOTTO, C. Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.

POLETO, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., MEZZOMO, R., BRAUN, U., VIDEIRA, S.I.R., HARAKAVA, R., Poletto, I. First report of *Sirosporium diffusum* causing brown leaf spot on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 2, p. 381, 2017.

POLETO, T., GONZATTO C. M., MUNIZ, M., BLUME, E., POLETO, I., BRIOSO, P. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 1016, 2016.

POLETO, T., MUNIZ, M.F.B., FANTINEL, V.S., HARAKAVA, R., ROLIM, J.M. Characterization and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* associated with *Carya illinoensis* seedlings. **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 2, e20171089, 2020.

RABUSKE, J.E., MUNIZ, M.F.B., POLETO, T., WALKER, C., BLUME, E., KRAHN, J.R.T., BRUN, T., HARAKAVA, R. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose spot on *Cassia fistula* in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 6, p. 1172, 2018.

RAND, F.V. Some disease of pecans. **Journal of Agricultural Research**. v. 1, p. 303, 1914.

RIOS, J.A., PINHO, D.B., MOREIRA, W.R., PEREIRA, O.L., RODRIGUES, F.A. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on blueberry leaves in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, n. 1, p. 157-157, 2015.

RIVERA-RANGEL, L.R., AGUILERA-CAMPOS, K.I., GARCÍA-TRIANA, A., AYALA-SOTO, J.G., CHAVEZ-FLORES, D., HERNÁNDEZ-OCHOA, L. Comparison of oil content and fatty acids profile of western schley, wichita, and native pecan nuts cultured in Chihuahua, Mexico. **Journal of lipids**, v. 2018, ID 4781345, 2018.

ROLIM, J.M., SAVIAN, L.G., WALKER, C., BLUME, E., MUNIZ, M.F.B., POLETO, T., M. DE M. SILVA, E.L. DA SILVA, J.E. RABUSKE, SARZI, J.S. First report of fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on pecan in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 6, p. 1870, 2020a.

ROLIM, J.M., SAVIAN, L.G., WALKER, C., RABUSKE, J.E., SARZI, J.S., MUNIZ, M.F.B., DA SILVA, J.C.P. First Report of Stem Canker Caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3067, 2020b.

ROVANI, F.F.M., WOLLMANN, C.A. Análise sazonal e anual dos requisitos climáticos do cultivo da noqueira pecã (*Carya illinoensis*) no Rio Grande do Sul. **GEOUSP Espaço e Tempo (Online)**, v. 22, n. 1, p. 191-209, 2018.

SCHMITZ, A., RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.

SHARMA, G., SHENOY, B.D. *Colletotrichum* systematics: Past, present and prospects. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1093–1102, 2016.

SHIVAS, R.G., YU, Y.P.A. Taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 111, e122, 2009.

SILVA, C.B.F.B.D., MICHEREFF, S.J. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 130 – 138, 2013.

VARJAS, V., KOVÁCS, C., LAKATOS, T., TÓTH, T., BUJDOSÓ, G. First report of walnut anthracnose caused by *Colletotrichum fioriniae* on english (Persian) walnut fruits in Hungary. **Plant Disease**, v. 103, n. 11, p. 2964-2964, 2019.

VELHO, A.C., STADNIK, M.J., CASANOVA, L., MONDINO, P., ALANIZ, S. First report of *Colletotrichum karstii* causing Glomerella leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 157-157, 2014.

WALLER, J.M., BRIDGE, P.D., BLACK, R., HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, v. 97, n. 8, p. 989-994, 1993.

WANG, Y.C., HAO, X.Y., WANG, L., XIAO, B., WANG, X.C., YANG, Y.J. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35287, 2016.

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

WOUDENBERG, J.H., AVESKAMP, M.M., DE GRUYTER, J., SPIERS, A.G., CROUS, P.W. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. **Persoonia**, v. 22, p. 56-62, 2009.

WALKER, C., MUNIZ, M.F.B., ROLIM, J.M., MARTINS, R.R.O., ROSENTHAL, V.C., MACIEL, C. G., MEZZOMO, R., REINIGER, L.R. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

ZHANG, Y.B., MENG, K., SHU, J.P., ZHANG, W., WANG, H.J. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1432, 2019.

4. CAPÍTULO 3: Análise morfológica, química e genética de acessos de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) no sul do Brasil. Scientia Horticulturae, v. 261, p. 108863, 2020.

Tales Poletto^a, Igor Poletto^b, Laisa Maria Moraes Silva^b, Marlove Fátima Brião Muniz^a, Lia Rejane Silveira Reiniger^c, Neila Richards^d, Valdir Marcos Stefenon^e, Rafael Plá Matielo^e

^a Departamento de Proteção Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97015-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Laboratório de Proteção de Plantas e Controle Biológico, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Av. Antônio Trilha 1847, 97300-162, São Gabriel, RS, Brasil.

^c Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97015-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^d Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97015-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^e Núcleo de Ecologia Molecular e Micropropagação Vegetal, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Av. Antônio Trilha 1847, 97300-162, São Gabriel, RS, Brasil.

Resumo

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) é uma importante espécie cultivada comercialmente em vários países do mundo, incluindo regiões temperadas, tropicais e subtropicais. Foram utilizados métodos morfométricos, químicos e análises genéticas para caracterizar 60 acessos de noqueira-pecã do sul do Brasil. Verificou-se que um grande espectro de características morfológicas é conservado nas árvores cultivadas pelos agricultores locais. Por outro lado, a composição química dos acessos não diferiu significativamente. Além disso, foi observada uma diversidade genética moderada a alta nessas plantas. Com base nesses resultados, sugere-se o uso do Melhoramento Participativo de Plantas como estratégia de conservação dos recursos genéticos da noqueira-pecã e melhoria da produção e comercialização de nozes. Além disso, a propriedade intelectual dos agricultores responsáveis pelo melhoramento genético da noqueira-pecã deve ser reconhecida e protegida, uma vez que é o fator chave nesse processo.

Palavras-chave: nozes, nutracêutico, melhoramento genético, marcadores AFLP

Abstract

Pecan (*Carya illinoensis*) is an important commercially cultivated nut tree grown in several countries around the world, including temperate, tropical and subtropical regions. We employed morphometric, chemical and genetic analyses to characterize 60 pecan accessions from Southern Brazil. Here we show that a large spectrum of morphological traits is conserved in the trees cultivated by local farmers. On the other hand, chemical composition of the accessions did not diverge significantly. In addition, moderate to high genetic diversity is observed in these plants. Based on these results, we suggest the use of Participatory Plant Breeding as strategy for conservation of the genetic resources of pecan and improvement of nut production and commercialization. Moreover, the intellectual property of the farmers responsible for the genetic improvement of pecan have to be recognized and protected, since it is the key factor in this process.

Keywords: nuts, nutraceutical, genetic improvement, AFLP markers

4.1 Introdução

Nativa do sul dos Estados Unidos e do México (POLETTO et al., 2015), a noqueira-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, Juglandaceae) é uma espécie arbórea cultivada em vários países do mundo, incluindo regiões temperadas, tropicais e subtropicais. A noqueira-pecã foi introduzida no Brasil na década de 1870, nas áreas subtropicais do sudeste e regiões do sul do país, informações mais precisas sobre esta introdução são limitadas. Algumas cultivares foram trazidas do México e dos Estados Unidos na forma de ramos e enxertados no Brasil, enquanto outras foram trazidas como sementes. Embora numerosas cultivares tenham sido cultivadas no país, algumas não se adaptaram e foram eliminadas dos pomares. Por várias décadas, as plantas de noqueira-pecã foram selecionadas pelos agricultores, baseando-se principalmente em aspectos morfológicos. Como resultado dessa seleção, uma gama muito grande de formas e tamanhos de nozes (Fig. 1) é encontrada em toda a área cultivada com esta espécie arbórea no sul do Brasil. Além disso, aspectos químicos e genéticos também são selecionados objetivando atender às demandas do mercado, bem como, resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos.

As medidas morfológicas são ferramentas bastante úteis usadas em vários estudos, incluindo análise taxonômica (PISANO et al., 2019), identificação de cultivares (JENA et al., 2016; IGBARI et al., 2019; KOUBOURIS et al., 2019) ou como indicadores de interações pré-históricas homem-planta (LEPOFSKY, KIRCH e LERTZMAN, 1998). Complementarmente, análises químicas também permitem inferências taxonômicas relacionadas a cultivares em

espécies vegetais (POLJAK et al., 2016). Por sua vez, marcadores genéticos moleculares universais têm sido amplamente utilizados em estudos taxonômicos de espécies arbóreas (STEFENON, GAILING e FINKELDEY, 2006) e para a confirmação da morfologia baseada na classificação de cultivares (SUJII et al., 2013).

Considerando que a morfologia e composição química das nozes tendem a ser características genéticas estáveis e de grande valor em taxonomia vegetal e pesquisas genéticas, foram empregados métodos morfométricos, químicos e análises genéticas moleculares para caracterizar 60 acessos de noqueira-pecã coletados em propriedades familiares no sul do Brasil. Os acessos amostrados foram destinados a avaliar a diversidade fenotípica existente na região, ainda não explorada. Como a área cultivada com essa espécie está se expandindo no Brasil, também discutiu-se a conservação de seus recursos genéticos, bem como a proteção dos direitos intelectuais dos agricultores familiares responsáveis pelo melhoramento genético da noqueira-pecã.

Figura 1. Exemplos da variabilidade na forma e tamanho das nozes de plantas de nogueira-pecã no sul do Brasil. As figuras representam nozes dos acessos 1, 2, 3, 4, 79 e 67.



4.2 Material e métodos

4.2.1 Área de estudo e amostragem de material vegetal

Os acessos de noqueira-pecã amostrados para este estudo são cultivados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Seguindo a classificação de Köppen, o clima desta região é Cfa (subtropical úmido com o mês mais frio acima de 0 °C, pelo menos um mês com temperatura média acima de 22 °C, nenhuma diferença significativa de precipitação entre as estações e nenhum mês seco no verão) nas terras altas e Cfb (oceânico temperado com a média do mês mais frio acima de 0 °C, todos os meses com temperaturas médias abaixo de 22 °C e nenhuma diferença significativa de precipitação entre as estações) nas outras regiões (KUNINCHNER e BURRIOL, 2001). De acordo com a classificação brasileira do solo (EMBRAPA, 2018), os solos desta região são classificados como argissolos, chernossolos e neossolos.

Os acessos amostrados para este estudo foram escolhidos com base em informações obtidas de produtores, levando em consideração características morfológicas, relacionadas principalmente ao tamanho e formato das nozes, pois é a principal característica que difere entre elas. A maioria das árvores foi enxertada com plantas locais e algumas foram originárias de sementes.

No entanto, todas as amostras são árvores com mais de 50 anos, mantidas em pomares ou nos jardins ao redor das casas dos pecanicultores. Nenhuma planta foi irrigada, pois essa prática não é comum na região. Para cada planta selecionada, as nozes foram amostradas no outono (maio / junho no sul do Brasil) dos anos de 2016 ou 2017. Para 10 árvores, foi possível coletar nozes nos dois anos. Essas amostras foram empregadas para avaliar a presença de variação significativa entre os anos nas características morfométricas avaliadas, utilizando o teste pareado de duas amostras de Wilcoxon ($\alpha = 0,05$), realizado no software PAST 3.04 (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001). De cada árvore, nozes maduras foram amostradas para as análises morfométricas e químicas, e folhas saudáveis foram amostradas para a análise genética. Para evitar variações no tamanho e formato das nozes devido à sua localização na árvore, as nozes foram colhidas em todas as faces e partes da árvore. As nozes amostradas de cada árvore foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos, transportadas para o laboratório e mantidas em temperatura ambiente por 15 dias. Dados morfométricos, químicos e moleculares genéticos confiáveis foram obtidos para 60 das 84 árvores amostradas que foram avaliadas neste estudo.

4.2.2 Análises morfométricas

O comprimento, o diâmetro longitudinal e lateral, a relação comprimento / diâmetro lateral, peso total, peso da amêndoa e da casca, a razão entre o peso da amêndoa e casca (amêndoa / casca), % de amêndoa, % de casca, espessura da casca, dureza da casca e número de frutos por kg (n. frutos kg^{-1}) foram medidos amostrando aleatoriamente 20 frutos de cada árvore coletada (CARGNELUTTI FILHO et al., 2014). As medidas das massas foram realizadas em balança digital (0,001 g) e o comprimento, diâmetro e espessura foram obtidos utilizando um paquímetro (0,01 mm). A dureza da casca foi determinada como a facilidade de quebrar a casca como, 1 (macio), 2 (médio) ou 3 (duro). Essa classificação foi realizada por três pessoas diferentes. As nozes danificadas foram excluídas das análises.

Uma análise de componentes principais (PCA), baseada na distância euclidiana, foi empregada para visualizar a correlação entre acessos. A média, a mediana e o coeficiente de variação (%) foram calculados para cada característica avaliada. Essas análises foram realizadas usando o software PAST 3.04 (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

4.2.3 Análises químicas

O teor de proteína foi quantificado com base na determinação de nitrogênio pelo processo de digestão de Kjeldahl. As gramas de nitrogênio mensuradas foram transformadas em gramas de proteína, usando o fator 5.30 (IAL, 2008). O extrato etéreo foi determinado a frio pelo método de Bligh-Dyer, usando clorofórmio, metanol e sulfato de sódio anidro como reagentes (BLIGH e DYER, 1959). A medição do extrato etéreo determina a porcentagem mínima de lipídios (galactolipídios, triglicerídeos e fosfolipídios) na amêndoa. A determinação da massa seca foi realizada aquecendo as amostras por seis horas a 70 °C sob pressão reduzida (abaixo de 100 mm de mercúrio), em um forno a vácuo (AOAC, 1996).

O software PAST 3.04 (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001) foi utilizado para determinar a relação entre os acessos de noqueira-pecã pelas proteínas, extrato etéreo e massa seca das nozes através de uma PCA baseado na distância euclidiana. Além disso, a média, a mediana e o coeficiente de variação (%) foram calculados para cada característica medida.

4.2.4 Análises genéticas moleculares

O DNA genômico total foi isolado das amostras de folhas de cada acesso usando o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987). A qualidade e quantidade de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed® e visualizado em um

transiluminador sob luz UV. Um espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) também foi empregado para avaliar a qualidade do DNA isolado em relação à presença de contaminantes fenólicos, polissacarídicos e proteicos.

As reações de AFLP (VOS et al., 1995) foram realizadas utilizando o protocolo convencional baseado na restrição do DNA total com duas endonucleases, ligação de adaptadores, amplificação por PCR e separação eletroforética dos fragmentos amplificados. Para a reação de restrição / ligação, cerca de 100 ng de DNA genômico total foram incubados com as enzimas de restrição PstI e MseI e os adaptadores correspondentes a 37 °C por 15 h seguidos por 72 °C por 15 min em uma única reação (2,5× tampão de reação da T4 DNA ligase, 2,5 U MseI, 2,5 U PstI, 2,5 µg de BSA, 25 pmol de adaptador Mse, 25 pmol de adaptador Pst, 1,0 U T4-DNA ligase). A mistura de reação foi diluída em quatro vezes e usada como padrão para a amplificação seletiva de PCR com a combinação de primers Pst-GAG / Mse-GAA (4 µl de DNA padrão, 25 pmol de iniciador Pst fluorescente, 25 pmol de iniciador Mse, 1.0U Taq DNA polimerase, 2 × tampão de PCR, 0,25 mM de cada dNTP).

O iniciador Pst-GAG foi marcado com fluorescência com AlexaFluor® 680nm (Invitrogen). As condições da PCR para a reação seletiva foram, um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido por 26 ciclos a 95, 56 e 72 °C por 1min cada e um passo final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

Todas as reações de PCR foram realizadas em um BioRad C1000 Touch™ ThermoCycler. Os fragmentos de AFLP foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida usando um sequenciador de DNA automatizado Li-Cor 4300S (Li-Cor Inc.), marcado automaticamente como presença ou ausência de cada fragmento e analisado no SagaGT Software®. Foi feita uma verificação visual adicional de cada gel para corrigir possíveis bandas com marcas erradas. A presença / ausência de fragmentos de AFLP foi codificada em binário (1, 0) para análises posteriores.

A análise completa do AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado) foi repetida duas vezes para seis amostras escolhidas aleatoriamente, selecionando apenas fragmentos repetíveis e confiáveis para as análises. Bandas não repetíveis através de execuções foram excluídas das análises finais.

A diversidade genética do conjunto de dados avaliado foi estimada através da heterozigosidade média multilocus não viesada esperada como, $H = (2N/(2N - 1)) \times H_e$, com $H = 2 \times p \times q$, onde p e q são a frequência de presença e ausência de fragmentos de AFLP,

respectivamente e N é o tamanho da amostra. Embora AFLPs sejam marcadores dominantes e nenhum heterozigoto real possa ser genotipado, a natureza dióica da noqueira-pecã permite estimar a heterozigosidade esperada de um grupo, considerando que eles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e a existência de apenas dois alelos em cada locus (presença ou ausência, binário codificado como 1 ou 0). Para marcadores dominantes, as estimativas de heterozigosidade esperadas variam de $H = 0,0$ (fixação de um alelo no local) a $H = 0,5$ (a mesma frequência para ambos os alelos). Além disso, o índice de diversidade de Shannon foi estimado como, $I = -\sum[(p \times \ln(p)) \times (q \times \ln(q))]$, onde p e q são as frequências de 1 e 0, respectivamente. Esse índice varia de $I = 0,0$ (fixação de um alelo no locus) a $I = 1,0$ (a mesma frequência para ambos os alelos) e é independente do princípio de Hardy-Weinberg. Os parâmetros de diversidade genética foram calculados usando GENALEX 6.501 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). Uma análise de coordenadas principais (PCoA é uma extensão conceitual da técnica PCA que funciona com diferentes índices de similaridade / distância) com base no índice de similaridade de Jaccard (que não é afetado pelo número de valores nulos entre amostras como a distância euclidiana) foi empregada para visualizar a correlação entre árvores, fundamentada na presença ou ausência dos fragmentos de AFLP. O índice de Jaccard foi calculado como, $J_{AB} = (M_{11}/M_{11} + M_{10} + M_{01})$, se M11 é o número de fragmentos de AFLP presentes em A e B, M10 é o número de fragmentos de AFLP presentes em A e ausentes em B, e M01 é o número de fragmentos de AFLP ausentes em A e presentes em B. A PCoA foi realizada usando o software PAST 3.04 (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001). O mesmo software foi empregado para construir um dendrograma UPGMA com base no índice de similaridade de Jaccard.

4.3 Resultados

A comparação das características morfométricas das nozes amostradas de 10 árvores em dois anos consecutivos (2016 e 2017) não revelou diferença significativa nas médias ($p > 0,05$) para todas as características medidas. Esse resultado confere confiança ao estudo, pois a variação observada é um efeito primário dos genótipos (um fator constante ao longo dos anos) e não devido às condições climáticas (um fator que flutua ao longo dos anos).

As características morfométricas e químicas apresentaram uma grande variação para as características medidas (Tabela 1), variando de 3,6% para a massa seca (mínimo = 69,4%, máximo = 97,3%) e 50,2% para o número de nozes por kg (mínimo = 80, máximo = 608).

Tabela 1. Estimativas morfométricas e químicas obtidas para as características avaliadas na noqueira-pecã.

Característica	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	CV%
Comprimento (mm)	20,8	41,0	40,7	58,9	19,0
Diâmetro lateral (mm)	14,2	21,7	21,9	26,6	11,2
Diâmetro longitudinal (mm)	14,6	20,8	20,6	25,4	12,1
Comprimento/Diam. lateral	1,3	1,9	2,1	2,8	18,2
Peso total (g)	1,7	7,4	7,3	12,8	30,8
Peso da amêndoa (g)	0,8	3,9	3,8	6,9	32,4
Peso da casca (g)	0,9	3,5	3,6	5,9	31,1
% amêndoa	41,1	52,1	52,5	62,3	7,6
% casca	38,0	47,9	47,0	59,0	8,2
Espessura da casca (mm)	0,6	0,9	0,8	1,6	22,2
Dureza da casca	1,0	0,9	2,0	3,0	41,9
Amêndoa/casca	0,7	1,1	1,1	1,7	16,2
# frutos kg ⁻¹	80	156,3	139	608	50,2
Proteínas %	6,9	10,1	9,9	17,4	14,9
Massa seca %	69,4	95,6	96,2	97,3	3,6
Extrato etéreo %	62,6	70,3	69,9	96,4	5,8

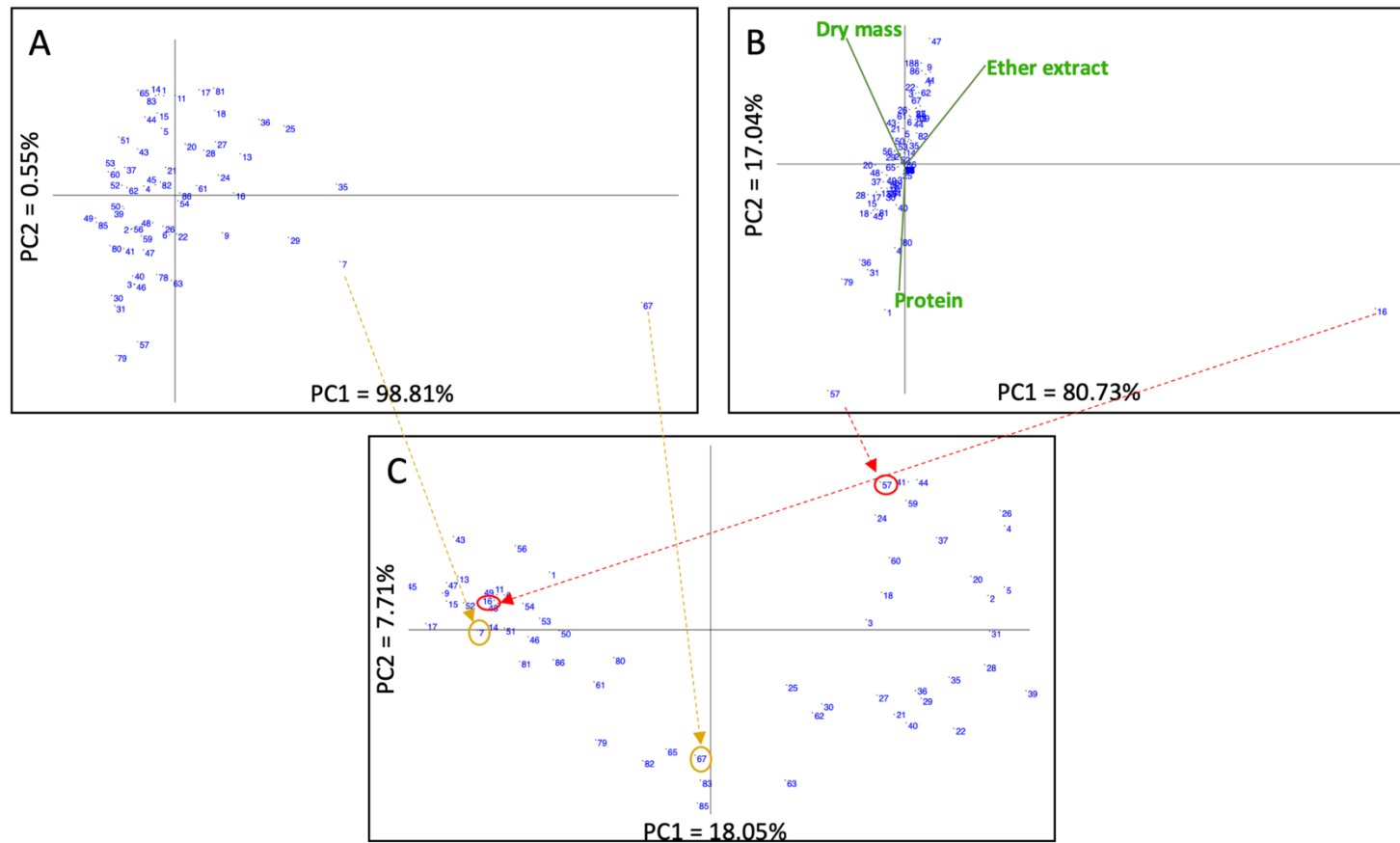
Neste estudo, a principal ferramenta de análise empregada foram as análises de ordenação PCA e PCoA. O objetivo dessas análises é decompor um conjunto de dados de várias variáveis com medidas correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, resumindo os resultados plotando às projeções das unidades nos componentes. As cargas das variáveis representam o grau de influência da variável em cada componente. A análise do componente principal para dados morfométricos (Fig. 2A) resumiu 98,88% da variação total no primeiro componente (PC1, Fig. 2A). A variável mais importante que influenciou o agrupamento de frutos de noqueira-pecã no PCA foi o número de nozes por kg (carga de 0,99 no PC1, tabela 2), enquanto o comprimento da noz foi a principal característica para determinar o segundo componente (carga de 0,95, tabela 2). A exclusão da variável número de frutos por kg da análise PCA, leva o comprimento do fruto como a principal variável do PC1 com uma carga de 0,92 (dados não mostrados), sugerindo o comprimento do fruto como a principal característica que diferencia as árvores. O acesso 67 foi o mais diferente de todos, apresentando 608 nozes / kg e 20,8 mm de comprimento, enquanto os acessos médios totais para essas características foram 156,3 frutos / kg (S.E. 10,05; mediana = 139; Tabela 1) e 41,0 mm (S.E. 0,99; mediana = 40,7 mm; Tabela 1). O terceiro componente (PC3) foi altamente influenciado pela porcentagem de casca e pela porcentagem de amêndoa, que apresentaram tendências

opostas (cargas de 0,68 e -0,68, respectivamente), com a mesma intensidade de influência (Tabela 2). Uma representação gráfica abrangente com os resultados individuais das características morfométricas medidas é apresentada como arquivo suplementar (Anexo 1).

Em contraste com os dados morfométricos, as análises químicas revelaram relativa homogeneidade entre os acessos avaliados (Tabela 1), com variação moderada (CV = 14,9%) para o teor de proteínas (Tabela 1), mais baixa para o extrato etéreo (CV = 5,8%) e massa seca (CV = 3,6). Consequentemente, a variância observada no PCA (97,78% da variação total resumida em PC1 e PC2, Fig. 2B) foi, de certa forma, igualmente distribuída entre as três medidas (Fig. 2B): extrato etéreo (carga de 0,78 no PC1, tabela 2), massa seca (carga de 0,67 no PC2, tabela 2) e teor de proteínas (carga de 0,82 no PC3, tabela 2).

Na análise genética molecular, foram avaliados 375 fragmentos de AFLP com comprimento variando de 75 a 450 pares de bases, resultando em 154 fragmentos polimórficos confiáveis e reproduzíveis. Nenhuma planta clone foi observada na amostra total, com base nesses 154 fragmentos de AFLP e uma alta diferenciação entre indivíduos foi observada no dendrograma UPGMA com base no índice de similaridade de Jaccard (Fig. 3). A semelhança pareada entre acessos variou de 0,15 a 0,781 (dados não mostrados) e o coeficiente cofenético entre a matriz de similaridade e o dendrograma UPGMA foi de 0,84.

Figura 2. Análise dos componentes principais da noqueira-pecã com base nas análises morfométrica (A), química (B) e genética molecular (C). Dois dos acessos mais diferenciados das análises morfométrica e química foram relacionados à sua posição na análise genética molecular, mostrando a ausência de correlação dos dados. Veja o texto para explicação.



Um nível moderado de diversidade genética multilocus média foi estimado para este conjunto de dados, para heterozigiosidade esperada $H = 0,37$ (S.E. = 0,09) e para o índice de diversidade de Shannon $I = 0,54$ (S.E. = 0,01). A abordagem de ordenação (Fig. 2C) permite caracterizar grupos dispersos de plantas com base na presença / ausência de fragmentos de AFLP. No entanto, não há correlação entre esses grupos e características morfológicas ou químicas. Por exemplo, o acesso 67, a mais diferenciada na análise morfométrica foi agrupado próximo aos acessos 63 e 85 na análise genética (Fig. 2C). Da mesma forma, o acesso 16, a mais diferenciada na análise química, foi agrupada dentro de um grande grupo de plantas em PCoA de base genética (Fig. 2C).

Tabela 2. Cargas da matriz de correlação. Variáveis com alta influência ($-0,65 <x> 0,65$) nos três componentes principais são destacadas em negrito.

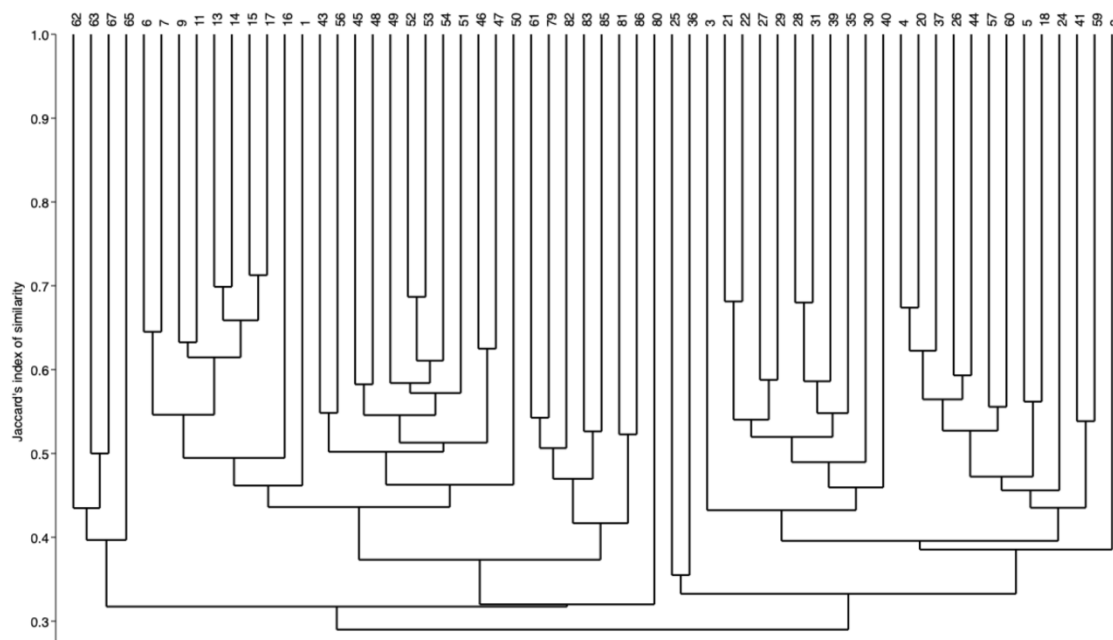
Características morfométricas			
Variável	PC 1	PC 2	PC 3
Espessura da casca	-0,0008	-0,0040	0,0196
Dureza da casca	-0,0006	-0,0376	0,0448
Comprimento	-0,0674	0,9511	0,2285
Diâmetro lateral	-0,0248	-0,0589	-0,0594
Diâmetro longitudinal	-0,0223	-0,1147	-0,0534
Peso da casca	-0,0112	0,0345	0,0569
Peso da amêndoa	-0,0129	0,0618	-0,0325
Peso total	-0,0241	0,0963	0,0266
% casca	0,0072	-0,1678	0,6823
% amêndoa	-0,0073	0,1669	-0,6836
Amêndoa/casca	0,0003	0,0076	-0,0305
# frutos kg⁻¹	0,9967	0,0663	0,0037
Largura/diâmetro	-0,0012	0,0513	0,0162
Características químicas			
Variável	PC 1	PC 2	PC 3
Proteína	- 0,0574	- 0,5617	0,8254
Massa seca	- 0,6168	0,6700	0,4131
Etéreo extrato	0,7850	0,4854	0,3849

4.4 Discussão

4.4.1 Diversidade morfométrica, química e genética na noqueira-pecã no sul do Brasil como ferramenta para seleção e melhoramento de plantas

Este estudo enfocou a análise de três conjuntos distintos de características para avaliar vários acessos de noqueira-pecã cultivados no sul do Brasil. Dados morfométricos, químicos e genéticos podem ser usados isolados ou combinados para determinar padrões de diversidade, caracterizar cultivares e identificar plantas com potencial comercial, farmacêutico ou nutricional. Por exemplo, uma diferença significativa foi observada para a largura das sementes, comprimento e largura dos frutos e massa seca dos frutos de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha-do-pará), mostrando correlação direta com a classificação popular em cultivares vermelhas e brancas (SUJII et al., 2013). Por outro lado, os marcadores moleculares não realizaram a separação genética entre essas cultivares (SUJII et al., 2013). Medidas morfométricas e químicas de nozes de *Castanea sativa* Mill. (castanha-doce) foram empregadas para a comparação da cultivar 'Lovran Marron' com árvores de ocorrência natural não selecionadas na Croácia (POLJAK et al., 2016). As análises demonstraram que esta cultivar antiga possui características desejáveis para fins comerciais e os resultados do estudo foram utilizados para justificar a preservação dos recursos genéticos dessa cultivar através da conservação por uso.

Figura 3. Dendrograma UPGMA dos 60 acessos de noqueira-pecã com base nos 154 fragmentos de AFLP. O coeficiente cofenético entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi de 0,84.



Este estudo demonstrou que as noqueiras-pecã cultivadas no sul do Brasil apresentam maior variação para todas as características morfométricas, em comparação com *Juglans regia* L. (walnut) cultivadas nas montanhas da China (HOU et al., 2014). Dezenove cultivares norte-

americanas de noqueira-pecã estudadas por Wells e Conner (2015) também apresentaram menor variância para características morfométricas das nozes, embora os valores médios das medidas sejam semelhantes aos obtidos no presente estudo. Medidas semelhantes relacionadas à porcentagem e peso de amêndoas também foram relatadas para 46 cultivares de noqueira-pecã avaliadas por Sparks (1991) e para 22 cultivares estudadas por Reid e Hunt (2000).

Embora se deseje uma alta homogeneidade morfométrica em espécies de culturas comerciais, essas diferenças representam uma fonte importante de variação genética na noqueira-pecã e podem ser exploradas para melhorar o seu cultivo. Diferentes formas e tamanhos das nozes podem ser úteis para diferentes fins na indústria, dependendo de sua composição química, relacionados a demandas comerciais, farmacêuticas ou nutricionais.

As nozes são ricas em tocoferol (GONG et al., 2017) e seu consumo foi proposto como estratégia para reduzir a proporção de ácidos graxos insaturados / saturados dos produtos tradicionais de carne emulsionada (OROZCO et al., 2019), como antioxidante e antimicrobiano (VILLASANTE et al., 2019) e diminuição dos riscos cardiovasculares (TAVARES da SILVA et al., 2019), entre outros benefícios. Em relação aos teores de proteínas e extratos etéreos / lipídios, os acessos avaliados de noqueira-pecã apresentaram valores que justificam o seu cultivo visando atingir o mercado nutracêutico. Os acessos de noqueira-pecã avaliados neste estudo revelaram uma porcentagem de extrato etéreo (62,6%) superior à encontrada em castanha de caju (36,7%, AREMU et al., 2006), pistache (56,1-62,6%, SATIL et al., 2003), avelãs (49,2%), macadâmia (59,2%), pinhões (58,8%), amendoim (37,9%), noz europeia (50,8%) e amêndoa (40,8%, MAGUIRE et al., 2004). Os lipídios são uma fração muito importante da composição dos alimentos como fonte de energia e, no caso das nozes, também diminuindo o colesterol LDL e, conseqüentemente, o risco de doença cardíaca coronária (RYAN et al., 2006). Por outro lado, o teor de proteína dos acessos de nozes (6,9%) é menor do que o relatado para a castanha de caju (25,3%, AREMU et al., 2006), pistache (30%, LABAVITCH et al., 1982), noz africana (11,6%, ACHINEWU et al., 1995) e de tiger nut (8,5%, CODINA-TORRELLA et al., 2015).

As nozes são comercializadas como fonte de óleos saudáveis e nosso estudo mostra que todos os acessos estudados aqui podem ser cultivados com esse objetivo. Considerando a alta variabilidade no tamanho e formato das nozes, a estratégia mais indicada seria selecionar fenótipos que combinem características químicas e morfométricas favoráveis. As características morfológicas, por sua vez, devem estar ligadas à colheita, transporte e industrialização de nozes, incluindo características das máquinas empregadas.

A análise genética molecular das árvores de noqueira-pecã baseadas em marcadores de AFLP não se correlacionou com as características morfológicas ou químicas avaliadas. No entanto, marcadores AFLP podem ser encontrados ligados a genes de interesse agrônomo. Populações e plantações naturais de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* Bert. (O. Kuntze)) formaram grupos fundamentados na origem geográfica das sementes / plantas quando avaliados com marcadores de microssatélites nucleares. No entanto, um grupo de plantações e um grupo de populações naturais foram gerados quando a análise foi baseada em marcadores da AFLP (STEFENON et al, 2008). Os autores sugeriram que alguns marcadores AFLP estavam ligados a genes que controlam características morfológicas selecionadas durante o desenvolvimento das plantações comerciais, enquanto as populações naturais não foram submetidas a essa seleção.

Wang et al. (2009) utilizaram a técnica AFLP para identificar marcadores ligados ao gene N para resistência a nematóides do nó radicular em pimenta (*Capsicum annuum* L.). Marcadores de AFLP ligados ao locus de sementes amarelas em *Brassica juncea* L. foram identificados por Huang et al. (2012). Para *C. annuum* e *B. juncea*, os fragmentos de AFLP foram convertidos em marcadores SCAR (região amplificada de sequência caracterizada). Na presente análise genética, é possível que alguns marcadores de AFLP estejam ligados a genes sob pressão seletiva, mas não a genes relacionados às características morfológicas e químicas aqui avaliadas. De qualquer forma, a análise da AFLP revelou um nível moderado a alto de diversidade genética nas árvores estudadas. Como a diversidade genética é crucial para a realização do aprimoramento genético, esse resultado apoia o potencial de avançar nessa questão, usando acessos selecionados de pomares de nozes atualmente em crescimento no sul do Brasil como fonte de germoplasma.

4.4.2 A necessidade de conservação de recursos genéticos, implantação do melhoramento genético participativo e proteção dos direitos intelectuais dos agricultores familiares no sul do Brasil

A conservação por uso é uma importante abordagem atualmente sugerida para a preservação dos recursos genéticos das árvores nativas (REIS et al., 2018). Embora a noqueira-pecã seja uma espécie exótica no Brasil, as áreas cultivadas com essas espécies foram expandidas na região sul do país, assim como em outros países subtropicais. Desta forma, a necessidade de cultivares com características superiores de interesse comercial apoia a conservação de um amplo espectro de variabilidade morfológica, química e genética da espécie.

A diversidade genética usada para iniciar os pomares de noqueira-pecã no Brasil durante a introdução da espécie foi provavelmente baseada em um pequeno número de cultivares e plantas. No entanto, durante mais de um século cultivando noqueira-pecã no sul do Brasil, os agricultores selecionaram, propagaram e preservaram os indivíduos mais promissores, produtivos e resistentes / tolerantes que crescem sob as condições climáticas e edáficas da região. Como esses indivíduos são resultado de cruzamento direcionado ou espontâneo entre diferentes cultivares, surgiram novos. Tais novas cultivares, no entanto, não foram registradas e a propriedade intelectual dos agricultores responsáveis por esse importante trabalho não foi reconhecida ou garantida.

Embora as características químicas avaliadas em nosso estudo tenham revelado quase homogeneidade entre as 60 plantas estudadas, foi encontrada uma gama muito grande de diversidade morfométrica e molecular genética. Este resultado mostra que a seleção realizada pelos agricultores foi eficaz na combinação genética e variabilidade morfológica nas plantas de noqueira-pecã mantidas. Também, abre a possibilidade de que este trabalho seja reconhecido como propriedade intelectual. Além disso, o estabelecimento de grupos de pesquisa multidisciplinares para o melhoramento genético da noqueira-pecã pode ser uma estratégia valiosa para melhorar a produção e comercialização de nozes. Esse processo pode avançar significativamente no aprimoramento do uso de conhecimento técnico e local para a conservação e uso de espécies arbóreas frutíferas (SANTOS et al., 2017), promovendo a conservação da diversidade genética local e das características negligenciadas por programas formais e centralizados de melhoramento (CECCARELLI e GRANDO, 2007).

A colaboração entre produtores locais de noqueira-pecã e pesquisadores, por meio de um Programa de Melhoramento Participativo, pode ser uma forma importante para promover a resiliência agrícola através do uso dos recursos genéticos existentes e da avaliação apropriada do conhecimento local (CLEVELAND, SOLERI e SMITH, 2000; CLEVELAND e SOLERI, 2007). O conhecimento local, nesse contexto, é entendido como o conjunto de conhecimentos, práticas e crenças em desenvolvimento elaborados através de gerações sobre as interações entre os seres humanos e seu ambiente (BERKES e FOLKE, 1998).

Apêndice A. Dados Suplementares

O material suplementar relacionado a este artigo pode ser encontrado, na versão on-line, em doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108863>.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Brasil) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES / Brasil, código financeiro 001) pelo apoio financeiro, bolsas de estudo e subsídios concedidos à V.M.S. (Processo 302501 / 2017-7), M.F.B.M., L.R.S.R. e N.R.

4.5 Referências bibliográficas

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Arlington.1996.

AREMU, M.O., OLONISAKIN, A., BAKO, D.A., MADU, P.C. Compositional studies and physicochemical characteristics of cashew nut (*Anarcadium accidentale*) flour. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 328–333, 2006.

BERKES, F., FOLKE, C., Linking ecological and social systems for resilience and sustainability. In: BERKES, F., FOLKE, C. (Eds.), **Linking Ecological and Social Systems: Management Practices and Social Mechanisms for Building Resilience**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–26, 1998.

BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CARGNELUTTI FILHO, A., POLETTTO, T., MUNIZ, M. F. B., BAGGIOTTO, C., POLETTTO, I., FRONZA, D. Sample size for evaluating the height and diameter of seedlings pecan. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, p. 2151-2156, 2014.

CECCARELLI, S., GRANDO, S. Decentralized-participatory plant breeding: an example of demand driven research. **Euphytica**, v. 155, n. 3, p. 349-360, 2007.

CLEVELAND, D.A., SOLERI, D. Extending Darwin's analogy: bridging differences in concepts of selection between farmers, biologists, and plant breeders. **Economic botany**, v. 61, n. 2, p. 121, 2007.

CLEVELAND, D.A., SOLERI, D., SMITH, S.E. A biological framework for understanding farmers' plant breeding. **Economic Botany**, v. 54, n. 3, p. 377-394, 2000.

CODINA-TORRELLA, I., GUAMIS, B., TRUJILLO, A.J. Characterization and comparison of tiger nuts (*Cyperus esculentus* L.) from different geographical origin: physico-chemical characteristics and protein fractionation. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 406-414, 2015.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), **Sistema Brasileiro De Classificação De Solos**. 5th ed. Brasília. 2018.

GONG, Y., PEGG, R.B., CARR, E.C., PARRISH, D.R., KELLETT, M.E., KERRIHARD, A.L. Chemical and nutritive characteristics of tree nut oils available in the U.S. Market. **European journal of lipid science and technology**, v. 119, n. 8, p. 1600520, 2017.

HAMMER, Ø., HARPER, D., RYAN, P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HOU, L.Q., SHI, Y., ZHAO, D.C., HAN, C.M., LIU, B.H., Analysis of the morphology and structural characteristics of 'Jizhaomian' walnut nut. **Acta horticulturae**, v. 1050, p. 75-80, 2013.

HUANG, Z., BAN, Y.Y., YANG, L., ZHANG, Y., LI, H.Q., XIAO, E.S., XU, A.X., ZHANG, D.H. Fine mapping of the yellow seed locus in *Brassica juncea* L. **Genome**, v. 55, n. 1, p. 8-14, 2011.

IAL (Instituto Adolfo Lutz), **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4th ed. São Paulo. 2008.

IGBARI, A.D., NODZA, G.I., ADEUSI, A.D., OGUNDIPE, O.T. Morphological characterization of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars from south-west Nigeria. **Ife Journal of Science**, v. 21, n. 1, p. 155-163, 2019.

JENA, R.C., SAMAL, K.C., PAL, A., DAS, B.K., CHAND, P.K. Genetic diversity among some promising Indian local selections and hybrids of cashew nut based on morphometric and molecular markers. **International Journal of Fruit Science**, v. 16, n. 1, p. 69-93, 2016.

KOUBOURIS, G.C., AVRAMIDOU, E.V., METZIDAKIS, I.T., PETRAKIS, P.V., SERGENTANI, C.K., DOULIS, A.G. Phylogenetic and evolutionary applications of analyzing endocarp morphological characters by classification binary tree and leaves by SSR markers for the characterization of olive germplasm. **Tree Genetics & Genomes**, v. 15, n. 2, p. 26, 2019.

KUINCHTNER, A., BURIOL, G.A., The climate of Rio Grande do Sul state according to Köppen and Thornthwaite classification. **Disciplinarum Scientia**, v. 2, n. 1, p. 171–182, 2001.

LABAVITCH, J.M., HEINTZ, C.M., RAE, H.L., KADER, A.A. Physiological and compositional changes associated with maturation of ‘Kerman’ pistachio nuts. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 107, n. 4, p. 688-692, 1982

LEPOFSKY, D., KIRCH, P.V., LERTZMAN, K.P. Metric analyses of prehistoric morphological change in cultivated fruits and nuts: an example from Island Melanesia. **Journal of Archaeological Science**, v. 25, n. 10, p.1001-1014,1998.

MAGUIRE, L.S., O’SULLIVAN, S.M., GALVIN, K., O’CONNOR, T.P., O’BRIEN, N.M., Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 3, p.171-178,2004.

OROZCO, D., ALARCON-ROJO, A.D., CHAVEZ-MENDOZA, C., LUNA, L., CARRILLO-LOPEZ, L., RONQUILLO, O. Frankfurters formulated with pecan nut paste and oregano

essential oil as functional components: proximate composition, lipid oxidation, and fatty acid profile. **Journal of Food Processing and Preservation**, e14016, 2019.

PEAKALL, R., SMOUSE, P.E. Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PisANO, A.R., MORÉ, M., CISTERNAS, M.A., RAGUSO, R.A., BENITEZ-VIEYRA, S. Breakdown of species boundaries in *Mandevilla*: floral morphological intermediacy, novel fragrances and asymmetric pollen flow. **Plant Biology**, v. 21, n. 2, p. 206–215, 2019.

POLETO, T., MUNIZ, M.F.B., POLETO, I., BAGGIOTTO, C. Methods for overcome dormancy of pecan *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch seeds. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.

POLJAK, I., VAHČIĆ, N., GAČIĆ, M., IDŽOJTIĆ, M. Morphology and chemical composition of ‘Lovran Marron’. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 189-199, 2016.

RYAN, E., GALVIN, K., O’CONNOR, T.P., MAGUIRE, A.R., O’BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 3-4, p. 219-228, 2006.

REID, W., HUNT, K.L., Pecan production in the Northern United States. **Hort Technology**, v. 10, n. 2, p. 298-301, 2000.

REIS, M.S., MONTAGNA, T., MATTOS, A.G., FILIPPON, S., LADIO, A.H., MARQUES, A.C., ZECHINI, A.A., PERONI, N., MANTOVANI, A. Domesticated landscapes in *Araucaria* forests, Southern Brazil: a multispecies local conservation-by-use system. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 11, 2018.

SANTOS, K.L., DONAZZOLO, J., GURIES, R.P., PERONI, N., NODARI, R.O. Participatory research with *Acca sellowiana*: stimulating the breeding process for a native fruit species. **Agroecology and Sustainable Food Systems**. v. 42, n. 4, p. 432-447, 2017.

SATIL, F., AZCAN, N., BASER, K.H.C. Fatty acid composition of pistachio nuts in turkey. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 4, p. 322-324, 2003.

SPARKS, D.A. Geographical origin of pecan cultivars influences time required for fruit development and nut size. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, n. 4, p. 627-631, 1991.

STEFENON, V.M., GAILING, O., FINKELDEY, R. Phylogenetic relationship within genus *Araucaria* (Araucariaceae) assessed by means of AFLP fingerprints. **Silvae Genetica**, v. 55, n. 1-6, p. 45-52, 2006.

STEFENON, V.M., GAILING, O., FINKELDEY, R. Genetic structure of plantations and the conservation of genetic resources of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 7, p. 2718-2725, 2008.

SUJII, P.S., FERNANDES, E.T.M.B., AZEVEDO, V.C.R., CIAMPI, A.Y., MARTINS, K., WADT, L.H.O. Morphological and molecular characteristics do not confirm popular classification of the Brazil nut tree in Acre. Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 4018-4027, 2013.

TAVARES DA SILVA, A.C., CARDOZO, L.F.M.F., CRUZ, B.O., MAFRA, D., STOCKLER-PINTO, M.B. Nuts and cardiovascular diseases: focus on Brazil nuts. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 32, n. 3, p. 274-282, 2019.

VILLASANTE, J., GIRBAL, M., METÓN, I., ALMAJANO, M.P. Effects of pecan nut (*Carya illinoensis*) and Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa*) as antioxidant and antimicrobial agents for sardines (*Sardina pilchardus*). **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 85, 2019.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VANDELEE, T., HORNES, M., FRITJERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, L.H., GU, X.H., HUA, M.Y., MAO, S.L., ZHANG, Z.H., PENG, D.L., YUN, X.F., ZHANG, B.X. A SCAR marker linked to the N gene for resistance to root knot nematodes

(*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 2, p. 318-322, 2009.

WELLS, L., CONNER, P. Pecan Varieties for Georgia Orchards. **University of Georgia Cooperative Extension Service**, Circular. 898, 2015.

5. CAPÍTULO 4: Identificação de fontes de resistência à antracnose em genótipos de noqueira-pecã no Brasil.

Resumo

Há mais de 100 anos cultivares norte americanas de noqueira-pecã são cultivadas no sul do Brasil. Desde essa introdução, agricultores familiares realizam a sua propagação (seminal ou enxertia) e seleção, observando características como sanidade, produção e morfologia e esse processo originou vários genótipos regionalmente adaptados. Contudo, o recente aumento da área de cultivo comercial de noqueira-pecã incrementou a ocorrência de doenças, como a antracnose, exigindo um manejo fitossanitário eficiente. O objetivo deste estudo foi identificar fontes de resistência à antracnose causada por *Colletotrichum* spp., bem como, caracterizar a diversidade genética e identificar possíveis correlações entre marcadores moleculares e a resistência à *Colletotrichum* spp. em genótipos de noqueira-pecã. Para isso, 18 genótipos de noqueira-pecã cultivados no sul do Brasil, selecionados com base em marcadores genético-moleculares AFLP foram testados quanto à sensibilidade a três espécies de *Colletotrichum*, em frutos e em folíolos. Os testes foram conduzidos em laboratório pelo método da inoculação em frutos/folíolos destacados. A avaliação foi realizada até o décimo segundo dia após a inoculação, a sensibilidade de cada genótipo foi determinada pela área das lesões nos pontos de inoculação. Marcadores moleculares microssatélites nucleares e plastidiais foram utilizados para avaliar a diversidade dos genótipos e a correlação genética entre os marcadores e as classes de sensibilidade a *Colletotrichum* spp. A antracnose foi influenciada tanto por características do hospedeiro quanto do patógeno associado e se manifestou mais severamente nos frutos em relação aos folíolos. Os genótipos 63, 47, 29 e 56 apresentaram alta resistência a antracnose nos frutos e folíolos. Os marcadores microssatélites nucleares e plastidiais não agruparam os genótipos de acordo com sua sensibilidade a *Colletotrichum* spp. e não houve correlação entre as características de sensibilidade com nenhum marcador microssatélite específico. Contudo, os índices de diversidade estimados demonstram moderada a alta variabilidade genética no grupo de genótipos avaliados.

Palavras chave: resistência genética, antracnose, *Carya illinoensis*

Abstract

For over 100 years, North American pecan cultivars have been cultivated in southern Brazil. Since this introduction, family farmers have carried out their propagation (seminal or grafting)

and selection, observing characteristics such as health, production and morphology, and this process has given rise to several regionally adapted genotypes. However, the recent increase in the commercial cultivation area of pecan trees has increased the occurrence of diseases such as anthracnose, requiring efficient phytosanitary management. The aim of this study was to identify sources of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., as well as characterize the genetic diversity and identify possible correlations between molecular markers and anthracnose resistance in pecan genotypes. For this, 18 pecan genotypes cultivated in southern Brazil, selected based on AFLP molecular genetic markers, were tested for sensitivity to three *Colletotrichum* species, in fruits and in leaflets. The tests were carried out in the laboratory using the inoculation method on detached fruits/leaves. The evaluation was carried out until the twelfth day after inoculation, the sensitivity of each genotype was determined by the area of lesions at the inoculation points. Species-specific microsatellite markers were used to test the variability and the correlation between the sensitivity classes of the genotypes. Anthracnose was influenced by both host and associated pathogen characteristics and manifested itself more severely in fruits than in leaflets. Genotypes 63, 47, 29 and 56 showed high resistance to anthracnose in fruits and leaflets. Nuclear and plastid microsatellite markers did not group the genotypes according to their sensitivity to *Colletotrichum* spp. and there was no correlation between sensitivity characteristics with any specific microsatellite marker. However, the estimated diversity indexes show high genetic variability in the evaluated group of genotypes.

Keywords: genetic resistance, anthracnose, *Carya illinoensis*

5.1 Introdução

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] pertence à família Juglandaceae e é uma espécie arbórea autóctone do sul dos Estados Unidos e do norte do México (GRAUKE, WOOD e HARRIS, 2016; MEDINA-JUÁREZ et al., 2018). As nozes tem propriedades nutracêuticas, o que a torna comercialmente importante (ZHANG et al., 2019; POLETTO et al., 2020; de OLIVEIRA et al., 2021), ocupando o sexto lugar em importância na produção mundial de nozes (INC, 2021). Em ordem, México, Estados Unidos, África do Sul, Brasil e Austrália lideram a produção mundial de noz-pecã (INC, 2021).

No Brasil, a noqueira-pecã foi introduzida por volta de 1870, nas regiões sul e sudeste do país, a partir de cultivares norte americanas (POLETTO et al., 2020). A muitas décadas é

cultivada em pequenas propriedades rurais, objetivando a alimentação e a comercialização do excedente da produção. Paralelamente ao seu cultivo, os agricultores realizaram a seleção e propagação de materiais genéticos, incluindo plantas com origem seminal, baseando-se em características como, qualidade de frutos, produtividade, sanidade, entre outras, resultando em plantas com características distintas e regionalmente adaptadas, entretanto esses materiais não são propagados comercialmente. Poletto et al. (2020), baseando-se em marcadores AFLP, observaram que a diversidade genética de genótipos sem cultivar definida e mantidos em pomares do Rio Grande do Sul é de moderada a alta, indicando a importância da conservação e inclusão desta diversidade genética em estudos visando o desenvolvimento de cultivares adaptadas para o país.

Atualmente, mais de 40 cultivares são comercialmente plantadas em grandes áreas do sul do Brasil (NAGEL et al., 2020) e como algumas dessas mostram-se suscetíveis às doenças, a questão fitossanitária torna-se mais significativa para o sistema de produção. A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é uma das doenças mais importantes na cultura da nogueira-pecã, tanto em pomares comerciais tecnificados como em pomares domésticos. A doença pode causar manchas foliares em todo o ciclo vegetativo, entretanto os maiores danos são observados nos frutos, ocasionando queda prematura, principalmente na fase de enchimento. Brenneman (2010) e Poletto et al. (2019) ressaltaram que a doença tem relação com o aumento dos níveis pluviométricos e de temperatura, os quais favorecem o desenvolvimento do patógeno e nestas condições podem ocorrer perdas significativas na produção.

Não há, até o momento, fungicidas químicos registrados para a cultura no Brasil, portanto as principais estratégias adotadas para redução da doença são através do manejo integrado como adubação equilibrada, incorporação de restos culturais, aplicações de calda sulfocálcica ou bordalesa em período hibernar, promoção da insolação e arejamento dos pomares, como também, pela seleção e plantio de cultivares resistentes. Portanto, frente a essas condições (hospedeiros suscetíveis, condições climáticas favoráveis à doença e a ausência de controle químico) o manejo de doenças na cultura da nogueira-pecã torna-se um grande desafio.

Dentre as estratégias de manejo fitossanitário, a resistência genética é apontada como uma das formas mais eficientes para o controle de doenças e, sempre que possível, deve ser priorizada (LIMA et al., 2019) por ser mais econômica, eficiente e segura, em relação ao controle químico (ASSUNÇÃO et al., 1999), o qual proporciona risco de seleção de populações de patógenos resistentes a defensivos (BOCK et al., 2019). Maringoni et al. (1995) menciona que cultivares com resistência genética a doenças atenuam o desenvolvimento de epidemias,

mesmo sob condições ambientais favoráveis ao crescimento de patógenos. Como exemplo, temos o desenvolvimento e/ou seleção de cultivares com maior resistência à sarna (*Venturia effusa*) em noqueira-pecã nos Estados Unidos (CONNER, 2018). De acordo com Thompson e Grauke (1994) a produção de noz-pecã nas áreas quentes e úmidas dos Estados Unidos não seria possível sem a obtenção de plantas geneticamente resistentes a doenças.

A primeira etapa básica em qualquer programa de obtenção e utilização de cultivares resistentes a doenças é identificar as fontes de resistência (THOMPSON e GRAUKE, 1994; CAMARGO e BERGAMIN FILHO, 1995; MICHEREFF, 2001). A partir da utilização de marcadores genéticos, como os marcadores microssatélites SSR (repetições de sequência simples), é possível identificar genes putativamente ligados à resistência, comparando plantas suscetíveis e resistentes.

Além da identificação, a caracterização e conservação da variabilidade genética em bancos de germoplasma é muito importante para garantir que genes de interesse presentes nos diferentes genótipos não sejam perdidos e possam ser utilizados para desenvolvimento de cultivares com rendimentos mais elevados, adaptadas às condições ecológicas e resistentes a pragas e doenças (BESPALHOK, GUERRA e OLIVEIRA, 2007; SOUZA et al., 2009). Até o presente momento, não existem no Brasil, estudos sobre resistência a doenças em noqueira-pecã e diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar fontes de resistência à antracnose causada por *Colletotrichum* spp., em genótipos de noqueira-pecã cultivados no Brasil, além de caracterizar a diversidade genética desses genótipos utilizando marcadores nucleares e plastidiais e identificar possíveis correlações entre marcadores moleculares e a resistência à *Colletotrichum* spp.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Coleta de frutos e folíolos de genótipos de noqueira-pecã

O estudo foi realizado utilizando 18 genótipos de noqueira-pecã cultivados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Estes genótipos foram selecionados com base no estudo realizado por Poletto et al. (2020), onde analisaram a variabilidade genética de 60 genótipos de noqueira-pecã, utilizando marcadores AFLP, os quais foram agrupados pelo índice de similaridade de Jaccard. Procurou-se escolher plantas representantes de cada clado, por apresentarem características genéticas distintas.

Para os testes de sensibilidade foram coletados frutos e folíolos sadios de cada planta de noqueira-pecã selecionada. A coleta foi realizada no período de enchimento dos frutos, aproximadamente aos 120 dias após a polinização. Os frutos e folíolos coletados foram acondicionados em caixas térmicas e imediatamente conduzidos ao Laboratório de Fitopatologia Eloci Minussi na Universidade Federal de Santa Maria.

Em seguida, frutos e folíolos foram submetidos à assepsia superficial primeiramente com álcool 70% (v/v) por 30 segundos, depois com hipoclorito de sódio 1% (v/v) também por 30 segundos. Após, foram banhados três vezes em água destilada esterilizada e acomodados em caixas plásticas previamente desinfestadas. Ao fundo de cada caixa, foram colocadas duas folhas de papel filtro estéreis e umedecidas, a fim de manter a umidade, e após, lâminas de vidro esterilizadas para evitar o contato do fruto/folíolo diretamente com o papel umedecido.

5.2.2 Obtenção e cultivo de *Colletotrichum* spp.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados neste estudo são provenientes de estudos anteriores (Capítulo 2) (Tabela 1), o qual consistiu da coleta de frutos de noqueira-pecã com sintomas de antracnose em pomares do Estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. A obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp. foi realizada pelo método direto, transferindo conídios de *Colletotrichum* spp. para meio de cultura BDA (19 g por litro de água de extrato comercial de BDA - Himedia®). Após a purificação monospórica, os isolados foram identificados molecularmente, pelo sequenciamento dos genes parciais actina (ACT) e beta-tubulina 2 (β -tub2). Por fim, foram testados quanto aos postulados de Koch, em frutos e folíolos de noqueira-pecã, para comprovação da patogenicidade. Os isolados encontram-se armazenados em glicerol 15%, refrigerados a 7 ± 1 °C, na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria e estão devidamente registrados no SISGEN (Cadastro n. ACCDFA6).

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. causadores da antracnose, selecionados para os testes de sensibilidade em genótipos de noqueira-pecã.

Isolado	Número de acesso no Genbank		Espécie	Data da Coleta	Local de coleta	Coordenadas Geográficas
	ACT*	β -TUB2				
SAJ2	MT981210	MT981219	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Fev. 2018	São Jorge/RS	28° 57' 31" S 51° 59' 45" O
CZA	MT981241	MT981244	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fev. 2018	Cruz Alta/RS	28° 38' 22" S 53° 36' 22" O
FAR2	MT981233	MT981234	<i>Colletotrichum karstii</i>	Mar. 2018	Farroupilha/RS	29° 13' 29" S 51° 21' 04" O

* Genes parciais actina (ACT) e beta-tubulina 2 (β -TUB2), utilizados para identificação das espécies de *Colletotrichum* spp.

Para a obtenção do inóculo, os isolados de *Colletotrichum* spp. foram cultivados em meio BDA, em temperatura de 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Após esse período, discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, com 5 mm de diâmetro, foram obtidos das bordas das colônias onde o crescimento era jovem.

5.2.3 Inoculação

O teste foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial, constituído por 18 genótipos de noqueira-pecã e três espécies de *Colletotrichum*, cada tratamento foi composto por dez replicatas, e estas, constituídas por um fruto/folíolo cada. Com um bastão de vidro estéril com ponta cônica, foi produzido um pequeno ferimento, em dois locais, no pericarpo ainda verde e em seis locais nos folíolos. Um disco de meio BDA de 5 mm, contendo estruturas de *Colletotrichum* spp. foi depositado em cada ferimento. No tratamento controle, os frutos/folíolos foram inoculados apenas com discos de BDA. Para a confecção de câmara úmida, as bandejas foram fechadas com sacos plásticos e incubadas à 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 h.

5.2.4 Avaliação

A avaliação da sensibilidade ocorreu diariamente até o décimo segundo dia após a inoculação, para isso, os diâmetros das lesões nos locais inoculados foram mensurados ortogonalmente com paquímetro digital. A partir do diâmetro das lesões, foi obtida a área média das lesões de cada tratamento e, finalmente, subtraída a área correspondente ao disco de inoculação. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro - Wilk, no software BioEstat 5.0, em seguida, transformados em raiz ($x+0,5$) e submetidos à análise de

variância e, por fim, foi aplicada a análise de comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. O software estatístico utilizado foi o Sisvar 5.3.

A partir dos resultados da interação *Colletotrichum* spp. x genótipos de noqueira-pecã, os genótipos foram classificados em grupos de sensibilidade a *Colletotrichum* spp., de acordo com a área média das lesões nos frutos e folíolos. Nos frutos, os grupos de genótipos foram classificados como: A- alta resistência (lesões médias $\leq 1,45 \text{ cm}^2$), B - média resistência (lesões médias entre $1,46 \text{ cm}^2 - 2,53 \text{ cm}^2$); C - baixa resistência (lesões médias entre $2,54 \text{ cm}^2 - 3,34 \text{ cm}^2$) e D - suscetível (lesões médias $\geq 3,35 \text{ cm}^2$). Nos folíolos, os grupos de genótipos foram classificados como: A- alta resistência (lesões médias $\leq 0,35 \text{ cm}^2$), B - média resistência (lesões médias entre $0,36 \text{ cm}^2 - 0,66 \text{ cm}^2$); C - baixa resistência (lesões médias entre $0,67 \text{ cm}^2 - 1,36 \text{ cm}^2$) e D - suscetível (lesões médias $\geq 1,37 \text{ cm}^2$). O método utilizado foi o da distância euclidiana e o software utilizado foi o Past4.01.

5.2.5 Marcadores Microsatélites

As análises de marcadores microsatélites foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Para isso, folíolos jovens dos 18 genótipos estudados foram coletados e armazenados em tubos Falcon com solução de PVP a 1% e mantidos congelados até o momento da extração do DNA, que foi extraído utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987). A qualidade e a quantidade de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed® e visualizado sob luz ultravioleta. Um espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) foi usado para avaliar a qualidade do DNA em relação à presença de contaminantes fenólicos, polissacarídeos e proteínas. O DNA isolado foi diluído em 100 µl de água ultra pura e armazenado a -20 °C até o uso.

Para as reações de PCR, foram utilizados marcadores microsatélites nucleares (nSSRs): PM-GA41, PM-CA10, PM-CIN22, PM-CIN20, PM-CIN13, PM-CIN4, PM-GA38, PM-GA39 e PM-CIN23 (GRAUKE et al., 2003) e plastidiais (cpSSRs): CCMP2 (WEISING e GARDNER, 1999), NTCP40 e NTCP9 (BRYAN et al., 1999), CPCIL1, CPCIL2, CPCIL4, CPCIL5, CPCIL6, CPCIL7, CPCIL8, CPCIL9, CPCIL10, CPCIL12 (desenvolvidos a partir do genoma plastidial da noqueira-pecã, cultivar Imperial, por nosso grupo).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 15 µl contendo 1,5 µL de tampão de PCR (10X), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,9 µL de dNTPs (10 mM), 1,2 µL de BSA (10

mg/mL)), 0,2 µL de Taq DNA-polimerase (5 U/ µL), 1,0 µL de cada iniciador (10 pmol) e 2,0 µL de DNA total. O ciclo de PCR foi realizado em um termociclador Veriti® e constou de uma etapa a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C, 60 °C e 72 °C por 30 segundos cada, oito ciclos a 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, finalizando com uma etapa a 72 °C por 7 minutos.

A separação dos produtos da amplificação foi feita por eletroforese horizontal submersa em gel de agarose 2% por 60 minutos com potência constante de 100 V. Os fragmentos foram corados com GelRed® e visualizados em um transiluminador de luz UVvis. Cada gel foi analisado no software Totallab TL120 1D v 2009 para obtenção do tamanho de cada fragmento amplificado, a partir da comparação com um marcador de peso molecular padrão de 100pb.

Após a obtenção dos dados genotípicos (para os nSSRs) e haplotípicos (para os cpSSRs), o software GenAlEx (2012) foi utilizado para estimar os índices de diversidade genética multilocus número total de alelos (A), número efetivo de alelos (Ae), índice de diversidade de Shannon (I) e diversidade genética (H). Os dados genotípicos e haplotípicos foram empregados conjuntamente para a construção de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA baseado em uma matriz de distância Euclidiana par-a-par, e a correlação entre a resistência dos genótipos a *Colletotrichum* spp. e os marcador molecular SSR utilizados foi realizada pela análise de correlação simples, com auxílio do software Past4.01.

5.3 Resultados

5.3.1 Sensibilidade à *Colletotrichum* spp. em frutos de diferentes genótipos de noqueira-pecã

Houve interação significativa entre os genótipos de noqueira-pecã e as espécies de *Colletotrichum* testadas, demonstrando que a antracnose foi influenciada pelos dois fatores integrados, ou seja, a doença foi determinada tanto pelas características do hospedeiro quanto do patógeno associado (Tabela 2). A comparação entre os tratamentos controles (não inoculados) e os inoculados (três patógenos), mostrou que a sensibilidade da maioria dos genótipos diferenciou-se significativamente do seu respectivo tratamento controle, ou seja, apresentaram algum nível de sintomas da doença. Entretanto, os genótipos 63, 29 e 56 não apresentaram diferença significativa de sensibilidade em relação ao tratamento controle para os três patógenos inoculados. Já os genótipos 47 e 30, não diferenciaram do controle apenas para *C. nymphaeae* e *C. karstii*. Nesses genótipos, praticamente não houve sintomas da doença.

A maioria dos genótipos manifestaram sensibilidade similar para as três espécies de *Colletotrichum* inoculadas, enquanto que, os genótipos 47, 30 e 31, apresentaram sensibilidade variável entre os três patógenos.

Tabela 2. Área das lesões (cm²) em frutos inoculados com *Colletotrichum* spp. em diferentes genótipos de noqueira-pecã.

Genótipo	Controle	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum karstii</i>
63	0,1 aA	0,70 aA	0,91 aA	0,75 aA
47	0,1 aA	0,99 aA	2,07 bB	0,99 aA
29	0,2 aA	1,06 aA	0,81 aA	0,98 aA
56	0,1 aA	1,14 aA	0,95 aA	1,01 aA
30	0,2 aA	1,42 aA	2,04 bB	0,89 aA
82	0,1 aA	1,76 bB	2,30 bB	2,03 bB
79	0,1 aA	1,84 bB	1,85 bB	2,72 bB
62	0,2 aA	2,11 bB	2,20 bB	2,30 bB
49	0,1 aA	2,30 bB	2,61 cB	2,68 bB
61	0,2 aA	2,33 bB	2,01 bB	2,43 bB
83	0,1 aA	2,34 bB	1,92 bB	2,11 bB
60	0,2 aA	2,57 bB	2,89 cB	3,12 bB
65	0,2 aA	2,99 cB	3,27 cB	3,47 bB
6	0,1 aA	3,20 cB	2,19 bB	1,91 bB
31	0,3 aA	3,24 cB	2,78 cB	7,12 dC
39	0,2 aA	3,37 cB	2,67 cB	2,02 bB
57	0,1 aA	3,57 cB	3,49 cB	4,33 cB
80	0,2 aA	4,92 dB	4,37 dB	4,49 cB

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: 18,9%.

A tonalidade das células corresponde à sensibilidade aos patógenos, sendo mais clara nos mais sensíveis (maior área lesionada) e mais escura nos menos sensíveis (menor área lesionada).

A partir da análise de agrupamento, foi possível verificar a sensibilidade dos genótipos de noqueira-pecã, para as três espécies de *Colletotrichum* de forma conjunta, havendo a formação de quatro grupos (A- alta resistência, B - média resistência; C - baixa resistência; D - suscetível). No grupo A, os genótipos apresentaram área média das lesões entre 0,79 a 1,45 cm² (dados não mostrados), sendo considerados menos sensíveis, evidenciando alta resistência à *Colletotrichum* spp. Neste grupo, as lesões caracterizaram-se por serem pouco desenvolvidas, com baixa ou nenhuma produção de estruturas reprodutivas (acérvulos) (Figura 1-I; Figura 2).

No grupo B, as lesões apresentaram coloração escura com formato arredondado, com área de lesão entre 2,03 a 2,53 cm², mostrando uma resistência média à *Colletotrichum* spp. Além disso, foi observada baixa quantidade de acérvulos presentes nas lesões (Figura 1-I;

Figura 2). No grupo C, as lesões foram proeminentes, de coloração escura, arredondadas e com grande quantidade de acérvulos dispostos em anéis concêntricos de coloração alaranjada. As lesões apresentaram área entre 2,69 e 3,24 cm², esses genótipos apresentaram baixa resistência aos patógenos (Figura 1-I; Figura 2).

No grupo D, os genótipos foram classificados como suscetíveis aos patógenos testados. As áreas das lesões foram as maiores entre todos os genótipos, medindo de 3,80 a 4,59 cm², as quais cobriam toda a superfície do fruto e apresentavam formação abundante de acérvulos com massas de conídios de coloração alaranjada por todo o tecido necrosado (Figura 1-I; Figura 2).

5.3.2 Sensibilidade à *Colletotrichum* spp. em folíolos de diferentes genótipos de noqueira-pecã

Em folíolos, a interação entre os genótipos de noqueira-pecã e as espécies de *Colletotrichum* testadas também foi significativa. A área das lesões variou de acordo com o patógeno inoculado e o genótipo de noqueira-pecã (Tabela 3). Dentre os 18 genótipos testados, sete deles (63, 47, 29, 82, 49, 31, 39) não apresentaram diferença significativa ao tratamento controle, para as três espécies de *Colletotrichum* testadas. Dentre os genótipos que diferenciaram-se significativamente do tratamento controle, o genótipo 80 e 83 apresentaram sensibilidade similar aos três patógenos inoculados, entretanto que para o restante dos genótipos, 56, 30, 79, 62, 61, 60, 65, 6 e 57, a sensibilidade variou entre as três espécies de *Colletotrichum*.

Tabela 3. Área das lesões (cm²) em folíolos de noqueira-pecã inoculados com *Colletotrichum* spp. em diferentes genótipos de noqueira-pecã.

Genótipo	Controle	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum karstii</i>
63	0 aA	0,40 aA	0,21 aA	0,28 aA
47	0 aA	0,14 aA	0,06 aA	0,06 aA
29	0 aA	0,29 aA	0,08 aA	0,12 aA
56	0 aA	0,42 aB	0,21 aB	0,06 aA
30	0 aA	0,99 cB	0,34 aA	0,18 aA
82	0 aA	0,12 aA	0,06 aA	0,08 aA
79	0 aA	1,17 cB	1,73 dC	1,18 cB
62	0 aA	0,81 bB	0,36 aA	0,19 aA
49	0 aA	0,19 aA	0,24 aA	0,11 aA
61	0 aA	1,11 cC	0,16 aA	0,71 bB
83	0 aA	0,49 aB	0,30 aB	0,22 aB
60	0 aA	2,01 dC	2,05 eC	1,64 dB
65	0 aA	1,31 cC	1,28 cC	0,59 bB

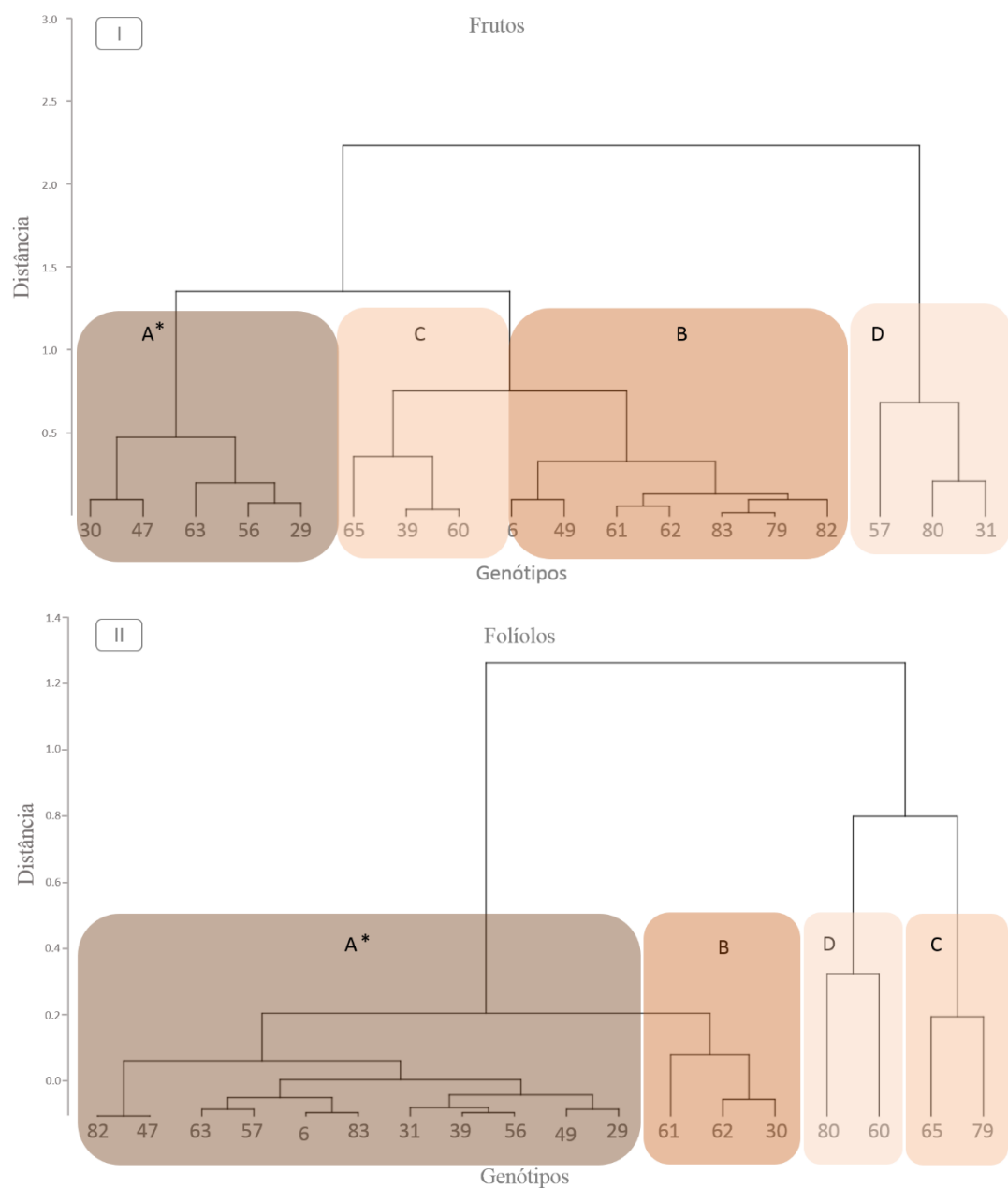
6	0 aA	0,25 aA	0,70 bB	0,11 aA
31	0 aA	0,29 aA	0,21 aA	0,26 aA
39	0 aA	0,25 aA	0,12 aA	0,28 aA
57	0 aA	0,40 aB	0,30 aB	0,15 aA
80	0 aA	2,42 eB	2,28 eB	2,29 eB

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: 11,0%. A tonalidade das células corresponde à sensibilidade aos patógenos, sendo mais clara nos mais sensíveis (maior área lesionada) e mais escura nos menos sensíveis (menor área lesionada).

A análise de agrupamento realizada com a área das lesões dos folíolos de cada genótipo inoculado com as três espécies de *Colletotrichum*, indicou a formação de quatro grupos (A- alta resistência, B - média resistência; C - baixa resistência; D - suscetível). O grupo A englobou a maioria dos genótipos testados e a área média de lesão variou de 0,09 até 0,35 cm². As lesões caracterizavam-se por serem pouco desenvolvidas e sem presença de frutificações (acérvulos), evidenciado alta resistência aos patógenos testados (Figura 1 – II; Figura 2).

No grupo B os genótipos apresentaram média resistência aos patógenos. As áreas das lesões mediram entre 0,45 a 0,66 cm². As lesões apresentavam coloração escura, com pouco ou nenhuma frutificação (Figura 1 – II; Figura 2). No grupo C, os genótipos apresentaram baixa resistência. As áreas das lesões mediram entre 1,06 até 1,36 cm² e apresentavam coloração escura com presença de acérvulos (Figura 1 – II; Figura 2). Por fim, no grupo D, os genótipos não apresentaram resistência à ação dos patógenos, sendo considerados suscetíveis. As lesões se desenvolveram por toda a superfície do folíolo, medindo de 1,90 até 2,33 cm² e com grande quantidade de acérvulos (Figura 1 – II; Figura 2).

Figura 1. Análise de agrupamento pela distância euclidiana, de genótipos de noqueira-pecã de acordo com a sensibilidade aos patógenos *Colletotrichum nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii*. I - Frutos e II – Folíolos.

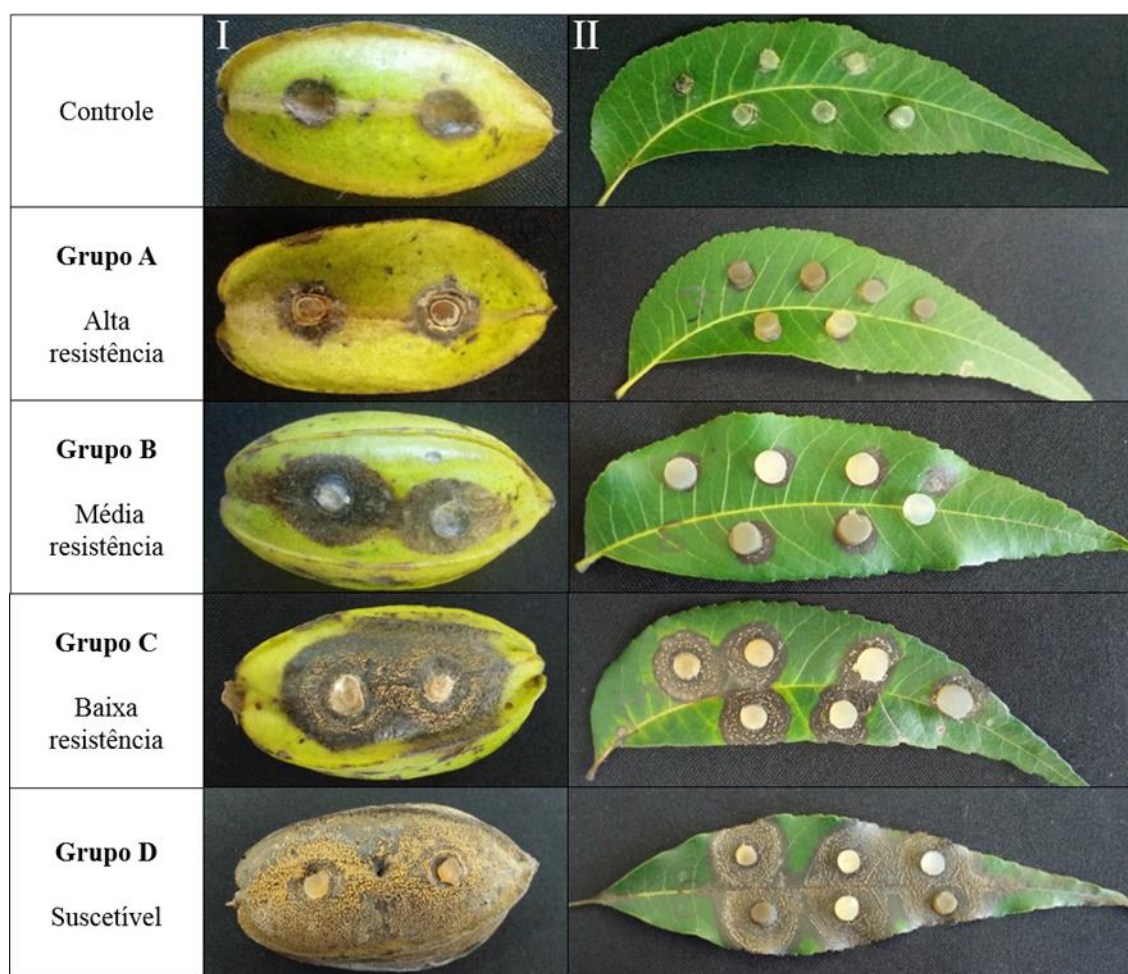


* **A** - alta resistência; **B** - média resistência; **C** - baixa resistência; **D** - suscetível. Coeficiente de correlação cofenética (r): frutos: 0,92; folíolos: 0,94.

No teste de sensibilidade foi observado que os primeiros sintomas da antracnose iniciaram no quarto dia após a inoculação, sendo que no décimo segundo dia apresentaram sintomas típicos da antracnose, tanto em frutos como em folíolos (Figura 2). Vale salientar que a antracnose se manifestou em menor proporção nos folíolos em relação aos frutos, ou seja, a doença é mais intensa nos frutos. Além disso, um mesmo genótipo pode ou não apresentar

resistência diferenciada para os frutos e folíolos. O genótipo 30, por exemplo, apresentou alta resistência para frutos e média resistência para folíolos, do contrário, foi observado no genótipo 31, o qual apresentou alta resistência em folíolos e baixa resistência em frutos. O genótipo 80 demonstrou ser suscetível tanto para frutos como para folíolos e o genótipo 29 apresentou alta resistência para frutos e folíolos.

Figura 2. Escala de sensibilidade para frutos (I) e folíolos (II) de genótipos de noqueira-pecã inoculados com patógenos *Colletotrichum nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii*, aos 12 dias da inoculação.



5.3.3 Marcadores microssatélites

A análise dos marcadores microssatélites nucleares e plastidiais revelou índices de diversidade genética alta para os genótipos avaliados (Tabela 4). Os marcadores nucleares apresentaram um número total de alelos (A), número efetivo de alelos (Ae) e índice de diversidade de Shannon (I) levemente maiores que os marcadores plastidiais. Por outro lado, as estimativas de diversidade genética (H) foram mais altas para os marcadores plastidiais em comparação com os marcadores nucleares.

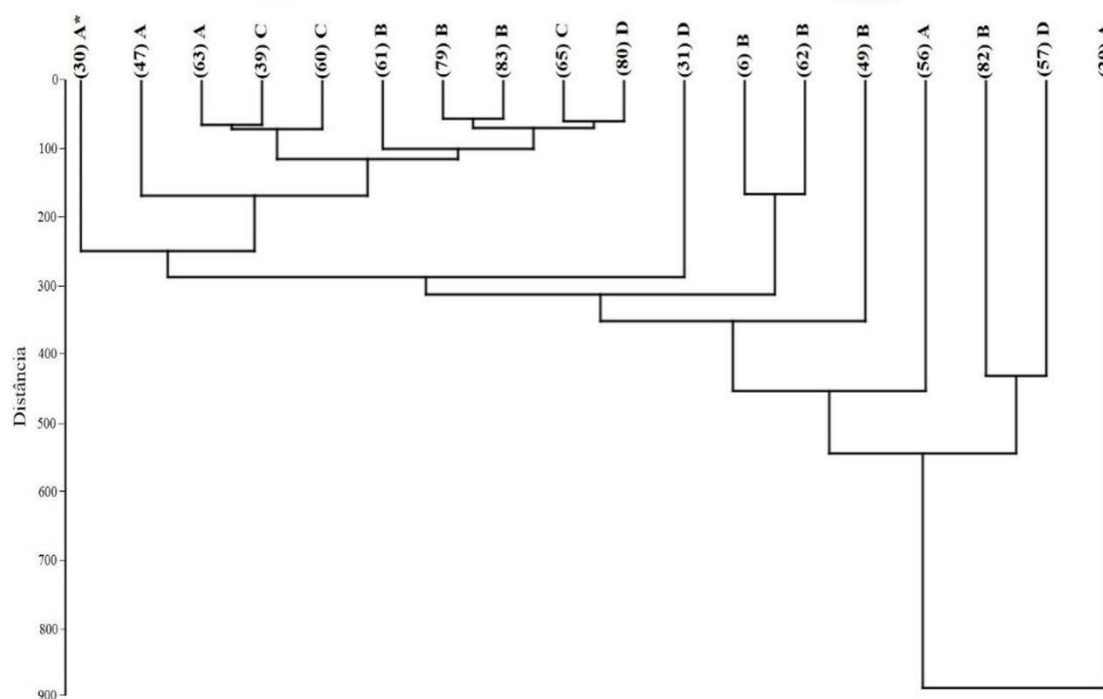
Tabela 4. Índices de diversidade genética multilocus para marcadores SSR nucleares (nSSR) e plastidiais (cpSSR) estimados para noqueira-pecã.

	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>I</i>	<i>H</i>
nSSR	4,325	4,032	1,328	0,791
cpSSR	3,850	3,741	1,263	0,956

A: número total de alelos; *A_e*: número efetivo de alelos; *I*: índice de diversidade de Shannon; *H*: índice de diversidade genética

O dendrograma UPGMA apresentou alto coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,98$), mas não agrupou os genótipos de acordo com o nível de sensibilidade a *Colletotrichum* spp. (Figura 3). Por exemplo, a cultivar 63 (alta resistência) e a 39 (suscetível) foram agrupadas no mesmo clado. Da mesma forma, não identificou-se relação entre a característica de resistência com nenhum marcador específico, utilizados nesta análise (dados não mostrados).

Figura 3. Agrupamentos de genótipos de noqueira-pecã com base em marcadores microssatélites nucleares e plastidiais conjugados.



***A** - alta resistência; **B** - média resistência; **C** - baixa resistência; **D** - suscetível. Coeficiente de correlação cofenética (r): 0,98.

5.4 Discussão

Neste estudo, foi avaliada a sensibilidade de 18 genótipos de noqueira-pecã à três espécies de *Colletotrichum* causadoras da antracnose, *C. nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C.*

karstii em condições controladas. A interação significativa entre os genótipos de noqueira-pecã e as espécies de *Colletotrichum* testadas, tanto em frutos como em folíolos, evidenciaram que a doença foi influenciada tanto por características do hospedeiro quanto do patógeno associado. Para alguns genótipos, a sensibilidade foi uniforme para os três patógenos, enquanto que para outros, a sensibilidade variou quanto aos diferentes patógenos.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Tanaka e Passos (2002), os quais evidenciaram que cultivares de morango inoculadas com *C. acutatum* e *C. fragariae* apresentaram graus variáveis de sintomas em relação a cada um dos patógenos, podendo ser semelhantes ou diferentes para cada uma das cultivares. Araújo et al. (2016) também evidenciaram variação da severidade entre e dentro de cultivares de pimenta *Capsicum frutescens* L. inoculadas com três isolados do *C. gloeosporioides*. Camargo (2018) explica que a interação patógeno-hospedeiro é gerida por diversos mecanismos, onde de um lado o patógeno, através de mecanismos bioquímicos, ataca o hospedeiro e, de outro, a planta procura resistir ao ataque através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos. O resultado dessa interação poderá se dar em maior ou menor grau e dependerá da constituição genética tanto do patógeno como do hospedeiro.

Os três patógenos testados causaram doença tanto em frutos como em folíolos, entretanto os frutos apresentaram menor resistência aos patógenos do que os folíolos. Silva e Michereff (2013) e Lei et al. (2016) relatam que a antracnose pode ocorrer em flores, frutos, galhos e folhas em várias culturas. Menge e Ploetz (2003) relatam que em abacate (*Persea americana* Mill.) as flores e frutos são frequentemente mais suscetíveis à *Colletotrichum* spp. do que outras partes da planta. Em noz-européia (*Juglans regia* L.), a antracnose ocorreu principalmente nos frutos, porém também nas folhas e brotações (ZHU et al., 2014).

Buscando elucidar os mecanismos de resistência para sarna (*Venturia effusa*), em noqueira-pecã, Lei et al. (2018) encontraram maior expressividade de compostos fenólico, flavonóides e glicosídeos no perfil metabólico da cultivar Kanza (resistente) do que na Pawnee (suscetível). Esses metabólitos tem atividade antimicrobiana e podem contribuir para resistência às doenças. Zhang et al. (2019) observaram maior expressão da enzima chalcona sintase (CHS), precursora da síntese de compostos fenólicos, em folhas, pistilo e ramos verdes, do que em outros órgãos da noqueira-pecã, como a casca do fruto e em amêndoa. No presente estudo, diferenças no perfil metabólico e/ou estruturais entre frutos e folíolos podem ter influenciado na resistência à *Colletotrichum* spp. nesses órgãos.

Pascholati e Dalio (2018) evidenciam que além dos atributos estruturais e bioquímicos que conferem respostas de resistência à patógenos em plantas hospedeiras, também há outros fatores influentes como a idade da planta, tipo de órgão ou tecido afetado, estado nutricional e condições ambientais. Desta forma, é possível que os resultados encontrados no presente estudo possam apresentar alguma variação de sensibilidade em trabalhos futuros, em função da idade das plantas, estado nutricional ou por pequenas diferenças na maturação do fruto entre os genótipos testados, pois encontram-se em propriedades rurais e não em um banco de germoplasma nas mesmas condições.

De acordo com Pascholati e Dalio (2018), dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, o hospedeiro pode expressar resistência ou suscetibilidade ao ataque de um patógeno, sendo que a resistência pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Baseado nisso, no presente estudo, os genótipos foram classificados quanto a sensibilidade em quatro grupos. Em frutos: altamente resistentes (cinco genótipos), medianamente resistentes (sete genótipos), pouco resistentes (três genótipos) e suscetíveis (três genótipos). Em folíolos: altamente resistentes (11 genótipos), medianamente resistentes (três genótipos), pouco resistentes (dois genótipos) e suscetíveis (dois genótipos).

Este é o primeiro estudo sobre resistência à doenças em noqueira-pecã no Brasil e, ainda não há disponibilidade de um banco de germoplasma onde os genótipos fiquem em iguais condições edafoclimáticas e com idades similares para a realização de estudos controlados sobre esse tema. Dessa forma, fica clara a importância da constituição de um Banco de germoplasma de noqueira-pecã, iniciativa fundamental para que testes de sensibilidade em condições de campo possam ser contrastados.

Neste estudo, não foi possível contrastar os resultados obtidos em condições controladas com ensaios à campo, como foi realizada para oliveira (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) (MORAL et al., 2017) e amendoeira [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] (LÓPEZ-MORAL et al., 2019) para testar a sensibilidade à antracnose. No entanto, Biggs e Miller et al. (2001), testando germoplasma de maçã (*Malus* sp.) para resistência a antracnose, salientaram que inoculações em condições laboratoriais, em comparação a campo, proporcionaram melhor qualidade, pela reprodutibilidade dos resultados.

Este estudo demonstrou que alguns genótipos podem ser fontes de resistência, mas também suscetíveis à antracnose, essa evidência dá mérito à possibilidade de desenvolvimento

de estudos relacionados a seleção de cultivares resistentes à antracnose e a utilização do controle genético para a doença.

O conjunto de marcadores moleculares microssatélites nucleares e plastidiais utilizados neste estudo revelaram moderada a alta diversidade genética para os genótipos estudados. Este aspecto é muito importante pois pode ser utilizado como princípio para a seleção de indivíduos a serem introduzidos em bancos de germoplasma e/ou programas de melhoramento genético, garantindo uma base genética mais ampla. Os marcadores nucleares utilizados neste estudo já foram utilizados em análises de caracterização da diversidade genética de noqueira-pecã nos EUA e revelaram índices de diversidade inferiores aos reportados aqui (GRAUKE et al., 2010). Já os marcadores plastidiais foram utilizados somente em análises de genótipos estudados por nosso grupo, porém apresentaram índices de diversidade superiores ao reportado em estudos de genótipos de noqueira-pecã dos EUA (GRAUKE et al., 2010).

Por outro lado, a análise de agrupamento baseada em dados genotípicos e haplotípicos não revelou clusters de genótipos de acordo com a sensibilidade a *Colletotrichum* spp. Apesar de marcadores SSR serem importantes ferramentas em programas de seleção assistida por marcadores, é necessário testar um grande número de locus em populações contrastantes para características segregantes, de modo a identificar marcadores ligados a genes de interesse. A ausência de correlação entre marcadores SSR e resistência/ susceptibilidade à doença sugere que os locus utilizados no presente estudo são neutros, ou seja, não estão ligados a regiões expressas dos genomas nuclear e plastidial, para a característica de resistência a *Colletotrichum* spp. Os marcadores microssatélites são largamente utilizados para identificação de genes QTL (Locus de Característica Quantitativa), para grupos de plantas resistentes e suscetíveis em muitas culturas, como em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (ALZATE-MARIN et al., 2005), cacauero (SANTOS et al., 2007), entre outros. A prospecção de marcadores QTLs, normalmente, envolvem um grande número de marcadores em populações de indivíduos sabidamente resistentes e suscetíveis a determinada doença, sendo possível a correlação do fenótipo (resistência) com marcadores. Em nosso estudo utilizamos poucos genótipos de cada classe de sensibilidade, dificultando a obtenção de uma boa correlação. Guzmán e Moncada (2012), comentam que no cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a resistência a *Colletotrichum kahawae* (Coffee Berry Disease - CBD) é oligogênica, a qual é gerida por um a três genes, dependendo do genótipo e, em seu estudo encontraram três marcadores microssatélites associados à alelos ligados a resistência, auxiliando na seleção assistida para identificação de genótipos resistentes.

No sul do Brasil, a umidade e a temperatura elevadas durante o período vegetativo são fatores que favorecem a antracnose. Aliada a isso, muitas espécies frutíferas são cultivadas próximos aos pomares de nogueira-pecã, podendo aumentar a dispersão de inóculo de um hospedeiro para outro, elevando o risco de epidemias. Desta forma, o controle genético é visto como uma das ferramentas mais importantes para integrar o manejo de doenças em nogueira-pecã no sul do Brasil.

5.5 Conclusões

Alguns genótipos apresentaram alta resistência a antracnose tanto em frutos como em folíolos nos testes laboratoriais, podendo servir como fontes de resistência para estudos futuros envolvendo o melhoramento para resistência à doenças.

A antracnose foi influenciada tanto por características do hospedeiro quanto do patógeno associado e se manifestou mais severamente nos frutos em relação aos folíolos.

O conjunto de marcadores microssatélites utilizados neste estudo revelou moderada a alta diversidade genética dos genótipos estudados, mas não agrupou os genótipos quanto a sensibilidade a *Colletotrichum* spp., como também não houve correlação entre a característica de resistência a *Colletotrichum* spp. com nenhum marcador microssatélite específico.

5.6 Referências Bibliográficas

ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.

ARAÚJO, N.A.F., VIEIRA, J.D., MOURA, M.D.R., PESSOA, W.R.L.S., BARGUIL, B.M. Pathogenicity and aggressiveness of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in ornamental pepper. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 3, p. 321-326, 2016.

ASSUNÇÃO, I.P., COELHO, R.S.B., LIMA, G.S. DE A., LIMA, J.A.S., TAVARES, S.C.C. DE H. Reação de cultivares de cebola a isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados na região do Submédio São Francisco. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 205-209, 1999.

BESPALHOK FILHO, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK FILHO, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. (eds). **Melhoramento de Plantas**. Curitiba: UFPR. 2007. p.11-18.

BIGGS, A.R., MILLER, S.S. Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 85 p. 657-660, 2001.

BRYAN, G.J., MCNICOLL, J., RAMSAY, G., MEYER, R.C., JONG, W.S.D. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. **Theoretical and applied genetics**, v. 99, n. 5, p. 859-867, 1999.

BRENNEMAN T. Pecan anthracnose and other unusual diseases: Learning from an unusual year. **Department of Plant Pathology University of Georgia**, Tifton-GA. 2010. Disponível em: <http://sepga.com/Presentation/WEB2010pres/T_Brenneman.pdf>. Acesso em: fev. 2021.

BOCK, C.H., HOTCHKISS, M.W., SHAPIRO-ILAN, D.I., WELLS, L., BROCK, J., BRENNEMAN, T., MIZELL, R. Efficacy of Bordeaux mixture in reducing pecan scab in the southeastern USA. **Organic Agriculture**, v. 9, n. 2, p.189-198, 2019.

CAMARGO L.E.A. Genética da interação patógeno hospedeiro. Amorim, L., Rezende, J.A. M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.EA. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Agronômica Ceres, 2018, v. 1, p. 85-92.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.729-758.

CONNER, P.J. ‘Avalon’, a New Pecan Cultivar with High Levels of Resistance to Pecan Scab. **HortScience**, v. 53, n. 12, p. 1915-1918, 2018.

de OLIVEIRA, L.O., BEISE, D.C., Dos SANTOS, D.D., NAGEL, J.C., POLETTO, T., POLETTO, I., STEFENON, V.M. Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae):

from genetic characterization to molecular breeding. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p.560-569, 2021.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39-40, 1990.

GRAUKE, L.J., IQBAL, M.J., REDDY, A.S., THOMPSON, T.E. Developing microsatellite DNA markers in pecan. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 3, p. 374-380, 2003.

GRAUKE, L.J., MENDOZA-HERRERA, M.A., BINZEL, M.L. Plastid Microsatellite Markers in *Carya*. **Acta Horticultural**, v. 859, p. 237–246, 2010.

GRAUKE, L.J., WOOD, B.W., HARRIS, M.K. Crop vulnerability: *Carya*. **HortScience**, v. 51, n. 6, p. 653-663, 2016.

GUZMÁN, F.; MONCADA B.M. del P. Evaluación de marcadores SSR ligados a resistencia a *Colletotrichum kahawae* en *Coffea arabica*. **Revista Cenicafé**, v. 63, n. 2, p. 7-22, 2012.

INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT (INC). **Nuts & Dried fruits statistical yearbook 2020 / 2021** (International Nut and Dried Fruit, Reus, Spain), 2021.

LEI, Y., TANG, X.B., JAYAWARDENA, R.S., YAN, J.Y., WANG, X.D., LIU, M., CHEN, T., LIU, X.M., WANG, J.C., CHEN, Q.X. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1177–1191, 2016.

LEI, Z., KRANAWETTER, C., SUMNER, B.W., HUHMAN, D., WHERRITT, D.J., THOMAS, A.L., ROHLA C., SUMNER, L.W. Metabolomics of two pecan varieties provides insights into scab resistance. **Metabolites**, v. 8, n. 4, p. 56, 2018.

LIMA, J.S., MARTINS, M.V.V., SERRANO, L.A.L., NETO, F.D.C.V., VIANA, F.M.P., CARDOSO, J.E. Reação de clones de cajueiro-anão à antracnose e ao mofo-preto. **Embrapa Agroindústria Tropical** - Comunicado Técnico (INFOTECA-E). Comunicado técnico 247, 2019.

LÓPEZ-MORAL, A., AGUSTÍ-BRISACH, C., LOVERA, M., LUQUE, F., ROCA, L.F., ARQUERO, O., TRAPERO, A. Effects of cultivar susceptibility, fruit maturity, leaf age, fungal isolate, and temperature on infection of almond by *Colletotrichum* spp. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2425-2432, 2019.

MARINGONI, A.C. Virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 861-867, 1995.

MEDINA-JUÁREZ, L.A., MOLINA-QUIJADA, D.M.A., AGUSTIN-SALAZAR, S., VALENZUELA, L.R., MOLINA-DOMÍNGUEZ, C.C., GÁMEZ-MEZA, N. Chemical evaluation and antioxidant capacity of Western and Wichita pecan nut cultivars [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 95, n. 2, p. 111-118, 2018.

MENGE, J.A., PLOETZ, R.C. Diseases of avocado. In: Ploetz, R.C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Florida: University of Florida (UFAS), 2003. p. 37-38.

MICHEREFF, S.J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 133p. 2001.

MORAL, J., XAVIÉR, C.J., VIRUEGA, J.R., ROCA, L.F., CABALLERO, J., TRAPERO, A. Variability in susceptibility to anthracnose in the world collection of olive cultivars of Cordoba (Spain). **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1892, 2017.

NAGEL, J.C., DE OLIVEIRA MACHADO, L., LEMOS, R.P.M., MATIELO, C.B.D.O., POLETTO, T., POLETTO, I., STEFENON, V.M. Structural, evolutionary and phylogenomic features of the plastid genome of *Carya illinoensis* cv. Imperial. **Annals of Forest Research**, v. 36, n. 1, p. 3-18, 2020.

SANTOS, R.M.F., LOPES, U.V., BAHIA, R.D.C., MACHADO, R.C.R., AHNERT, D., CORRÊA, R.X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p.1137-1142, 2007.

SILVA, C.B.F.B.D., MICHEREFF, S.J. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 130 – 138, 2013.

SOUZA, A.D.S., SOUZA, F.V.D., dos SANTOS-SEREJO, J.A., JUNGHANS, T.G., da PAZ, O.P., MONTARROYOS, A.V.V., SANTOS V.S., MORAIS, L.S. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca. Embrapa Mandioca e Fruticultura-Circular Técnica (INFOTECA-E). 2009, 24p.

PASCHOLATI, S.F., DALIO, R.J.D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Agronômica Ceres, 2018, v. 1, p. 423-450.

POLETTO, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., FANTINEL, S.V., REINIGER, L.R.S., STEFENON, V.M., HARAKAVA, R., BRIOSO, P.S.T., POLETTO, I. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3277-3277, 2019.

POLETTO, T., POLETTO, I., SILVA, L.M.M., MUNIZ, M.F.B., REINIGER, L.R.S., RICHARDS, N., STEFENON, V.M. Morphological, chemical and genetic analysis of southern Brazilian pecan (*Carya illinoensis*) accessions. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p.108863, 2020.

TANAKA, M.A.S., PASSOS, F.A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 484-488, 2002.

THOMPSON, T.E., GRAUKE, L.J. Genetic resistance to scab disease in pecan. **Hort Science**, v. 29, n. 9, p. 1078-1080, 1994.

WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 9-19, 1999.

ZHANG, C., YAO, X., REN, H., WANG, K., CHANG, J. Isolation and characterization of three chalcone synthase genes in pecan (*Carya illinoensis*). **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 236, 2019.

ZHU, Y.F., YIN, Y.F., QU, W.W., YANG, K.Q. Morphological and molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing walnut anthracnose in Shandong Province, China. **Acta Horticulturae**, v. 1050, p. 353–359, 2014.

6. CAPÍTULO 5: Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Colletotrichum* spp., agente etiológico da antracnose em noqueira-pecã

Resumo Dentre as várias doenças que ocorrem na cultura da noqueira-pecã, destaca-se a antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. O biocontrole com o uso de *Trichoderma* spp. apresenta-se como uma medida promissora para ser empregada no controle de doenças por apresentar um amplo espectro de ação sobre fitopatógenos, possibilitar a ativação do sistema de defesa e a promoção do crescimento em plantas, contribui para a sustentabilidade ambiental e a segurança alimentar, entre outros. O objetivo deste trabalho foi investigar a ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum* spp., agente etiológico da antracnose em noqueira-pecã. Para tanto, foi realizado o teste de pareamento de culturas e o teste de inibição por metabólitos voláteis com cinco espécies de *Trichoderma*, sendo ela: *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. tomentosum* e *T. virens*. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições cada tratamento. O crescimento micelial foi avaliado diariamente até o sétimo dia. No teste de pareamento de cultura, todas as espécies apresentaram potencial antagonista, inibindo o crescimento micelial dos patógenos a partir do terceiro dia. *T. virens* e *T. tomentosum*, demonstraram maior potencial antagonista, como também, se destacaram no teste de metabólitos voláteis pela maior inibição de *Colletotrichum* spp. Os testes de biocontrole *in vitro* são utilizados para selecionar agentes antagonistas à patógenos, visando demonstrar seu potencial de ação, incentivando seu uso no controle de doenças em campo.

Palavras chave: controle biológico, pecanicultura, *Carya illinoensis*

Abstract Among the various diseases that occur in the pecan tree crop, anthracnose, caused by species of the genus *Colletotrichum*, stands out. Biocontrol using *Trichoderma* spp. presents itself as a promising measure to be used in disease control because it has a broad spectrum of action on phytopathogens, enables the activation of the defense system and the promotion of plant growth, contributes to environmental sustainability and food security, and others. The objective of this work was to investigate the *in vitro* antagonistic action of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum* spp., the etiological agent of anthracnose in pecan. For that, the culture pairing test and the inhibition test by volatile metabolites were performed with five species of *Trichoderma*, namely: *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. tomentosum* and *T. virens*. The experiments were carried out in a completely randomized design, with five

replications for each treatment. Mycelial growth was evaluated daily until the seventh day. In the culture pairing test, all species showed antagonist potential, inhibiting the mycelial growth of the pathogens from the third day onwards. *T. virens* and *T. tomentosum* showed greater antagonist potential, as well as stood out in the volatile metabolites test due to the greater inhibition of *Colletotrichum* spp. In vitro biocontrol tests are used to select agents that are antagonistic to pathogens, aiming to demonstrate their action potential, encouraging their use in the control of diseases in the field.

Keywords: biological control, pecan, *Carya illinoensis*

6.1 Introdução

Diversas doenças acometem a pecanicultura [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] mundial, dentre as mais importantes destaca-se a antracnose, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum* spp. (BRENNEMAN e REILLY, 1989; LATHAM, BOWEN e CAMPBELL, 1995; MANTZ et al., 2010, ZHANG et al., 2019a; POLETTTO et al., 2019). Nas folhas, a manifestação mais característica da doença são manchas necróticas, sem coalescência das lesões, com pouca ou nenhuma abscisão foliar, perdurando por todo o ciclo vegetativo. Entretanto, a principal ação da doença ocorre nos frutos, causando necrose e posterior abscisão. O período em que o patógeno se associa aos frutos da noqueira-pecã ainda não foi devidamente elucidado, contudo, os sintomas são expressos principalmente no período de enchimento e maturação, os quais já se encontram comprometidos, dificultando o manejo da doença. Em anos chuvosos, a doença pode prejudicar até 60% da produção (POLETTTO et al., 2019).

A antracnose pode ser considerada uma doença complexa e de difícil manejo, em função da alta variabilidade de *Colletotrichum* spp. (SUTTON, 1992), sua estreita relação com condições ambientais (ARAÚJO et al., 2016), por apresentar modos de vida necrotrófico, hemibiotrófico, latente e endofítico (SILVA et al., 2017), bem como pela capacidade de realizar infecção cruzada em muitos hospedeiros (LEHARWAN et al., 2018). O controle desta doença em grandes culturas é realizado, principalmente, pela aplicação sistemática de fungicidas químicos (PESQUEIRA, BACCHI e GAVASSONI, 2016; OLIVEIRA, VIANA e MARTINS, 2016). Entretanto, muitos autores evidenciam que, além de promover o aumento da resistência dos fitopatógenos, há efeitos nocivos desses produtos no meio ambiente, na saúde humana e na segurança alimentar (KEFIALEWA e AVALEWB, 2008; CHRISTMANN et al., 2019; EFROM et al., 2019). Por conseguinte, há uma crescente demanda por novas alternativas

eficientes e seguras para minimizar o efeito das doenças sobre os cultivos vegetais. Neste sentido, agentes de biocontrole, como fungos do gênero *Trichoderma*, têm sido largamente investigados, pois apresentam grande potencial para supressão de fitopatógenos na agricultura, principalmente, quando inseridos dentro do contexto do manejo integrado de doenças.

Trichoderma spp. são fungos hiperparasitas encontrados naturalmente em uma grande variedade de ecossistemas e seu potencial para biocontrole é conhecido há várias décadas (BROTMAN, KAPUGANTI e VITERBO, 2010). Suas propriedades antagônicas são baseadas na ativação de múltiplos mecanismos que incluem: parasitismo (microrganismo alimenta-se do outro) (CARVALHO et al., 2019); antibiose (produção de metabólitos voláteis ou não, os quais têm efeito danoso sobre o outro) (CUBILLA-RÍOS et al., 2019); competição (competição por espaço, alimento e oxigênio no sítio de infecção), indução de resistência e promoção do crescimento em vegetais (ativação do sistema de defesa, produção de hormônios, solubilização de nutrientes) (KUMAR, 2013; CHAGAS, JUNIOR e CASTRO, 2017). Esses mecanismos variam com a espécie de *Trichoderma*, a linhagem dentro da mesma espécie e de acordo com a interação hospedeiro-parasita (MELLO, 1996).

Vários estudos vêm demonstrando o potencial do *Trichoderma* como um agente antagonista à *Colletotrichum* spp. em culturas agrícolas, como em goiaba-serrana [*Feijoa sellowiana* (O.Berg) O.Berg], para o controle da antracnose dos frutos, causada por *C. siamense* (FANTINEL et al., 2018); em bananeira (*Musa* spp.), no controle de *C. musa*, agente causal da antracnose (OLIVEIRA, VIANA e MARTINS, 2016); em *Citrus* spp., no controle da queda de frutos, causada por *Colletotrichum* spp. (KLEIN et al., 2013); em açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart.) e em mangueira (*Mangifera indica* L.) no controle de *C. gloeosporioides*, causador de antracnose nos frutos (DA COSTA et al., 2019; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS et al., 2013). Neste sentido, Haddad et al. (2017) comentam que *Trichoderma* spp. tem ganhado ampla aceitação como um agente de biocontrole necessitando ampliar as investigações para seleção de novas espécies e ou linhagens com ação sobre doenças de plantas.

A base de um programa de controle biológico está na seleção de microrganismos que apresentem potencial antagônico à determinado fitopatógeno alvo. Essa seleção, na maioria das vezes, segue uma ordem lógica que é de *in vitro* (testes em placas de Petri) para *in vivo* (testes em casa de vegetação e em campo) (MESQUITA et al., 2017). Os mesmos autores destacam que todos os métodos de seleção de antagonistas são baseados em evidências de que o organismo candidato interfere, de algum modo, no desenvolvimento do patógeno ou redução da doença.

Contudo, até o momento, não há relatos de estudos utilizando *Trichoderma* spp. como uma ferramenta para o controle biológico de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose em nogueira-pecã no Brasil. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade antagônica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre o patógeno *Colletotrichum* spp.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Obtenção dos patógenos

Os isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados neste experimento são provenientes de frutos de nogueira-pecã com sintomas de antracnose, obtidos por estudos anteriores (Capítulo 2) (Tabela 1). O isolamento foi realizado pelo método direto em meio BDA (19 g por litro de água de extrato comercial de BDA - Himedia®), a purificação por cultura monospórica e a identificação através do sequenciamento das regiões nucleares actina (ACT) e beta tubulina 2 (β -tub2) e a patogenicidade comprovada pelos postulados de Koch. Os isolados encontram-se armazenados em glicerol 15%, refrigerados a 7 ± 1 °C, na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria e estão devidamente cadastrados no SISGEN (Cadastro n. ACCDFA6).

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. causadores da antracnose, utilizados para os testes de confrontação direta com *Trichoderma* spp.

Isolado	Número de acesso no Genbank		Espécie	Data da Coleta	Local de coleta	Coordenadas Geográficas
	ACT*	β -TUB2				
FAR2	MT981233	MT981234	<i>Colletotrichum karstii</i>	Mar. 2018	Farroupilha/RS	29° 13' 29" S 51° 21' 04" O
SAJ2	MT981210	MT981219	<i>C. nymphaeae</i>	Fev. 2018	São Jorge/RS	28° 57' 31" S 51° 59' 45" O
PIB1	MT981237	MT981238	<i>C. kahawae</i>	Mar. 2018	Pinto Bandeira/RS	29° 05' 52" S 51° 27' 1" O
CZA	MT981241	MT981244	<i>C. gloeosporioides</i>	Fev. 2018	Cruz Alta/RS	28° 38' 22" S 53° 36' 22" O
CDL	MT981232	MT981230	<i>C. fioriniae</i>	Jan. 2018	Capão do Leão/RS	31° 46' 03" S 52° 26' 55" O
ADM3	MT981235	MT981236	<i>C. siamense</i>	Fev. 2018	Arroio do Meio/RS	29° 23' 56" S 51° 56' 41" O

* Genes parciais actina (ACT) e beta-tubulina (β -TUB), utilizados para identificação das espécies de *Colletotrichum* spp.

O inóculo de cada isolado de *Colletotrichum* spp., necessário para realização dos testes, foi obtido pelo cultivo em placas de petri contendo meio de cultura BDA e incubados à temperatura de 25 ± 1 °C, com 12 h de fotoperíodo, por sete dias.

6.2.2 Obtenção dos antagonistas

Cinco espécies de *Trichoderma* foram utilizadas no teste de antagonismo. *T. harzianum* e *T. asperellum* foram obtidas a partir dos produtos comerciais Ecotric® e QualityWG®, respectivamente. *T. koningiopsis* (IIOT1, Genbank: MN319462, SISGEN: A6F940E) (KRAHN, 2017), foi obtido do solo de um pomar de citros (*Citrus deliciosa* Tenore) sob cultivo orgânico em Montenegro, Rio Grande do Sul (RS), Brasil. *T. tomentosum* (T2s, Genbank: KC155357) (MILANESI, 2012) foi obtido de solo cultivado com culturas agrícolas anuais em Victor Graeff - RS. *T. virens* (TF1, Genbank: MK450344, SISGEN: A28E445) (SARZI, 2017), foi obtido do solo sob cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em Roque Gonzales - RS. Os isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do solo estão depositados na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria.

Para obtenção do inóculo, os produtos comerciais e os isolados de *Trichoderma* foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA e incubados à temperatura de 25 ± 1 °C, com 12 h de fotoperíodo, por sete dias.

6.2.3 Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. à *Colletotrichum* spp. por teste de cultura pareada

Para a avaliação do antagonismo pelo método da cultura pareada, foram utilizados discos de meio de cultura BDA com 5 mm de diâmetro, contendo estruturas de *Colletotrichum* spp., retirados da zona de crescimento de colônias e transferidos para a borda das placas petri com 90 mm de diâmetro, contendo também meio BDA. As placas permaneceram incubadas a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 48 h. Após esse período, um disco de meio BDA de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas de *Trichoderma* spp., foi transferido para a posição oposta aos discos de micélio contendo *Colletotrichum* spp. nas placas de Petri. Os tratamentos testemunhas foram compostos por placas de petri contendo apenas *Colletotrichum* spp. e mantidas incubadas nas mesmas condições.

A avaliação do antagonismo ocorreu durante sete dias após a transferência de *Trichoderma* spp. para as placas, pela medição do crescimento micelial das colônias de *Colletotrichum* spp., utilizando-se um paquímetro digital. Os dados do sétimo dia de medição foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos patógenos pela fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, em que, crtest = crescimento radial do tratamento testemunha; e crtrat = crescimento radial do tratamento (MENTEN et al., 1976).

O antagonismo também foi avaliado segundo a escala de Bell (BELL, WELLS e MARKHAM, 1982), adaptada por Rodrigues (2010) no sétimo dia, que estabelece sete notas como grau de antagonismo (Figura 1).

Figura 1. Gabarito para classificação do antagonismo em teste de pareamento de culturas.

Nota*	Descrição	Gabarito
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno;	
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno;	
3	Antagonista cresce sobre 3/4 da placa;	
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa;	
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa;	
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa;	
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri.	

*Fonte: Adaptado de Rodrigues (2010).

6.2.4 Efeito inibitório de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Colletotrichum* spp.

Para a avaliação do efeito inibitório de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. frente a *Colletotrichum* spp., discos de 5 mm de meio BDA com estruturas de *Colletotrichum* spp. foram depositados no centro de placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. O material foi incubado por 48 h em temperatura de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, placas do mesmo diâmetro contendo meio BDA com um disco central de 5 mm com estruturas de *Trichoderma* spp. foram encaixadas sobre as placas contendo *Colletotrichum* spp. (base com base), vedadas com plástico filme e incubadas novamente nas mesmas condições anteriores. A testemunha possuía apenas *Colletotrichum* spp. Após sete dias da inoculação dos antagonistas foi avaliado o crescimento micelial ortogonal das colônias dos patógenos com um paquímetro digital. Para determinação do percentual de inibição do crescimento micelial dos patógenos foi utilizada a fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, em que, crtest = crescimento radial do tratamento testemunha; e crtrat = crescimento radial do tratamento (MENTEN et al., 1976).

6.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e cada teste realizado foi composto por cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de petri. Os dados foram verificados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o *software* BioEstat 5.0 e após, transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$. Para a análise da variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade foi utilizando o *software* SISVAR 5.3.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum* spp. por teste de cultura pareada

No teste de cultura pareada houve interação significativa do antagonismo das espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum* spp., ou seja, o efeito inibitório foi variável e determinado pelas características intrínsecas de cada interação, o qual variou de 7,5% até 52,3% (Tabela 2). Todas as espécies de *Trichoderma* inibiram significativamente o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em relação a testemunha, mostrando-se eficientes no controle in vitro de *Colletotrichum* spp. isolados de noqueira-pecã, em maior ou menor grau.

Tabela 2. Porcentagem de inibição de *Colletotrichum* spp. em cultivo pareado com *Trichoderma* spp. avaliada aos sete dias.

Patógeno	Testemunha	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. tomentosum</i>	<i>T. virens</i>	Média
<i>C. karstii</i>	0,0 aC*	7,5 cB	21,5 bA	15,8 cA	20,7 cA	14,3 cA	15,9
<i>C. nymphaeae</i>	0,0 aD	20,0 bB	11,8 bC	27,8 bA	29,8 cA	35,8 bA	25,0
<i>C. kahawae</i>	0,0 aC	14,7 bB	17,8 bB	33,6 bA	27,7 cA	33,5 bA	25,4
<i>C. gloeosporioides</i>	0,0 aC	27,9 aB	20,4 bB	30,1 bB	35,4 bA	40,8 bA	30,9
<i>C. fioriniae</i>	0,0 aD	32,6 aB	24,9 bC	36,3 bB	40,0 bB	52,3 aA	37,2
<i>C. siamense</i>	0,0 aC	34,3 aB	43,9 aA	46,3 aA	48,0 aA	47,2 aA	43,9
Média	0,0	22,8	23,4	31,7	33,6	37,3	

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: 17, 5%

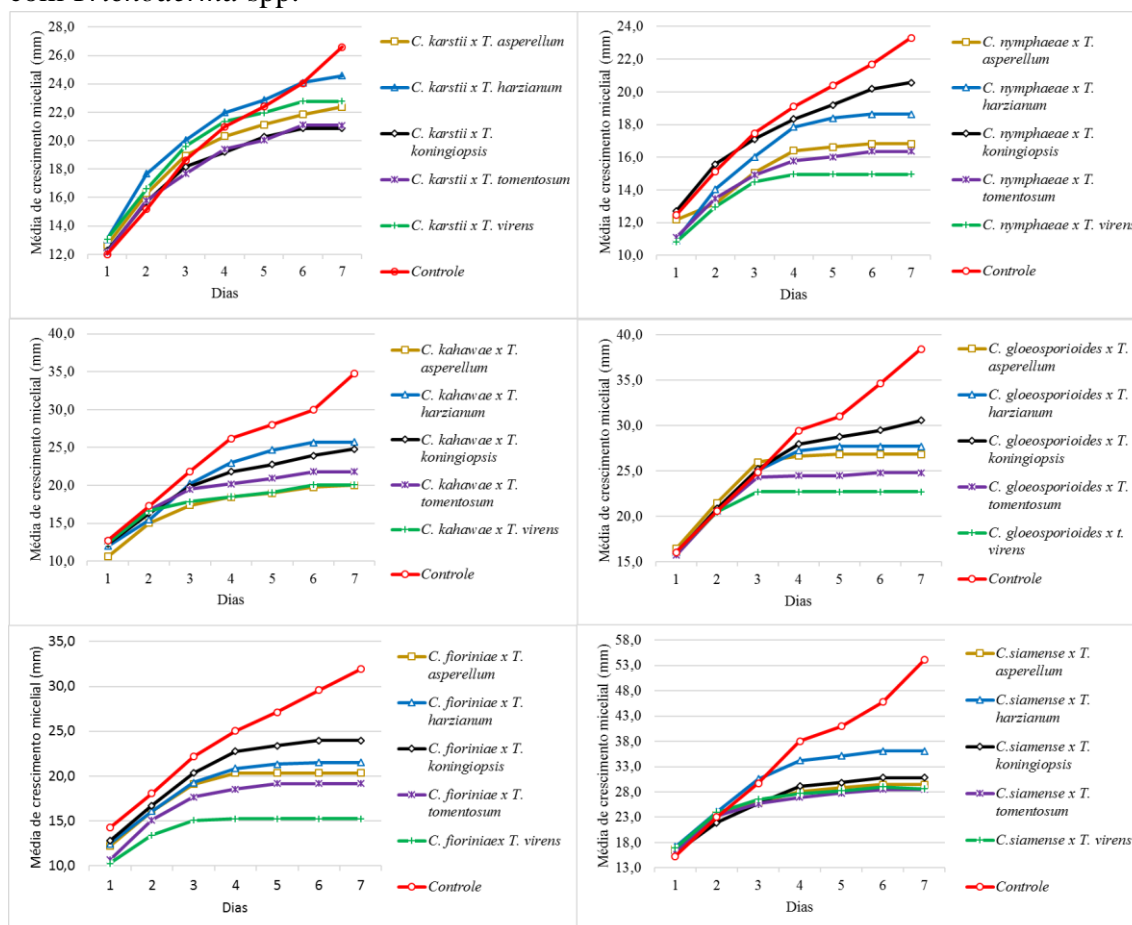
Para os patógenos *C. karstii* e *C. siamense* houve maior porcentagem de inibição quando foram confrontados com os antagonistas *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. tomentosum* e *T. virens*. Nestas interações, a inibição variou de 14,3% a 48,0%. Para *C. nymphaeae* e *C. kahawae*, o maior controle foi na presença de *T. asperellum*, *T. tomentosum* e *T. virens* (27,7% a 35,8%). Para *C. gloeosporioides* a maior inibição ocorreu com *T. tomentosum* e *T. virens* (35,4% e 40,8%, respectivamente), e a maior porcentagem de inibição foi para *C. fioriniae* (52,3%) pelo antagonista *T. virens*. Neste teste, o antagonista *T. virens* se destacou pelo

potencial de inibição do crescimento micelial do maior número de espécies de *Colletotrichum* isolados de noqueira-pecã (Tabela 2).

Vários estudos demonstram o potencial de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole para *Colletotrichum* spp. Karimi et al. (2017) verificaram índice de inibição de *C. nymphaeae*, agente causal da antracnose em morango, de 61,2% e 57,8%, utilizando *T. harzianum* e *T. virens*, respectivamente. De La Cruz-Quiroz et al. (2018) encontraram percentuais de inibição para *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose em pimenta, de 9,5% e 22,5%, utilizando *T. harzianum* e *T. asperellum*, respectivamente. Fantinel et al. (2018), utilizando *T. koningiopsis*, *T. asperellum* e *T. harzianum* como agentes de biocontrole para *C. siamense*, patógeno causador da antracnose em *Feijoa sellowiana* Berg., obtiveram índices de inibição entre 39,5 a 44,2%, muito similares aos encontrados neste estudo.

A partir do terceiro dia de avaliação houve uma tendência de decréscimo na velocidade do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., em maior ou menor grau, gerada pelo efeito dos antagonistas, o qual não foi observada nos tratamentos testemunha, que mantiveram o crescimento constante até o sétimo dia de avaliação (Figura 2). De forma similar a esse estudo, Maciel et al. (2014) verificaram interrupção do crescimento de *Fusarium sambucinum* no terceiro dia do confronto direto, havendo a formação do halo de inibição entre o patógeno e o antagonista *Trichoderma* spp. Bomfim et al. (2009), também observaram que com apenas três dias de incubação, *Trichoderma* spp. já causaram inibição no desenvolvimento de *Rhizopus stolonifer*. Christmann et al. (2019) observaram que a inibição do crescimento micelial de *C. lindemutianum* em confronto direto com *Trichoderma* spp. começou a partir do segundo dia, atingindo 80% de inibição no terceiro dia.

Figura 2. Crescimento micelial diário de *Colletotrichum* spp. no teste de pareamento de cultura com *Trichoderma* spp.



No estudo em questão, em linhas gerais, *T. virens* foi o que apresentou o maior potencial de biocontrole frente a *Colletotrichum* spp., e *T. harzianum*, o menor. Já foi verificado que o armazenamento pode reduzir a viabilidade de um agente de biocontrole e que isolados nativos (*T. virens*) tendem a apresentar maior agressividade quando comparado com cepas obtidas de formulações comerciais. Isso já foi evidenciado por Brito, Miller e Stadnik (2010), Silva et al. (2015) e Fantinel et al. (2018), em que os isolados armazenados apresentaram redução na viabilidade.

Na avaliação do antagonismo pela escala de Rodrigues (2010), os melhores resultados foram encontrados para *T. virens*, o qual apresentou notas médias menores ou iguais a 2 em todas as confrontações (Tabela 3 e Figura 3). A nota 2 demonstra que o antagonista cresceu por toda a placa de Petri, exercendo um forte antagonismo sobre o patógeno. *T. tomentosum* também apresentou notas médias abaixo de 2, com exceção da confrontação com *C. fioriniae*. *T. asperellum* apresentou notas intermediárias e variáveis dependendo da interação (1,6 a 2,8).

T. harzianum e *T. koningiopsis*, tiveram desempenho geral inferior aos demais antagonistas, apresentando notas maiores, entre 2 e 4 (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Colletotrichum* spp. segundo a escala de Rodrigues (2010).

Patógeno	Testemunha	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. tomentosum</i>	<i>T. virens</i>	Média
<i>C. karstii</i>	6,0 aD*	3,6 bC	2,0 aA	2,8 bB	1,6 aA	1,4 aA	2,3
<i>C. nymphaeae</i>	6,0 aD	3,0 aB	3,8 bC	1,6 aA	1,6 aA	1,6 aA	2,3
<i>C. kahawae</i>	6,0 aC	2,8 aB	2,8 aB	2,2 bA	1,8 aA	1,8 aA	2,3
<i>C. gloeosporioides</i>	6,0 aD	3,0 aB	4,0 bC	1,4 aA	1,6 aA	2,0 aA	2,4
<i>C. fioriniae</i>	6,0 aC	2,8 aB	2,4 aB	2,6 bB	2,6 bB	1,4 aA	2,4
<i>C. siamense</i>	6,0 aD	3,8 bC	2,8 aB	2,0 aA	2,0 aA	2,0 aA	2,5
Média	6,0	3,2	3,0	2,1	1,9	1,7	

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: 8,7%

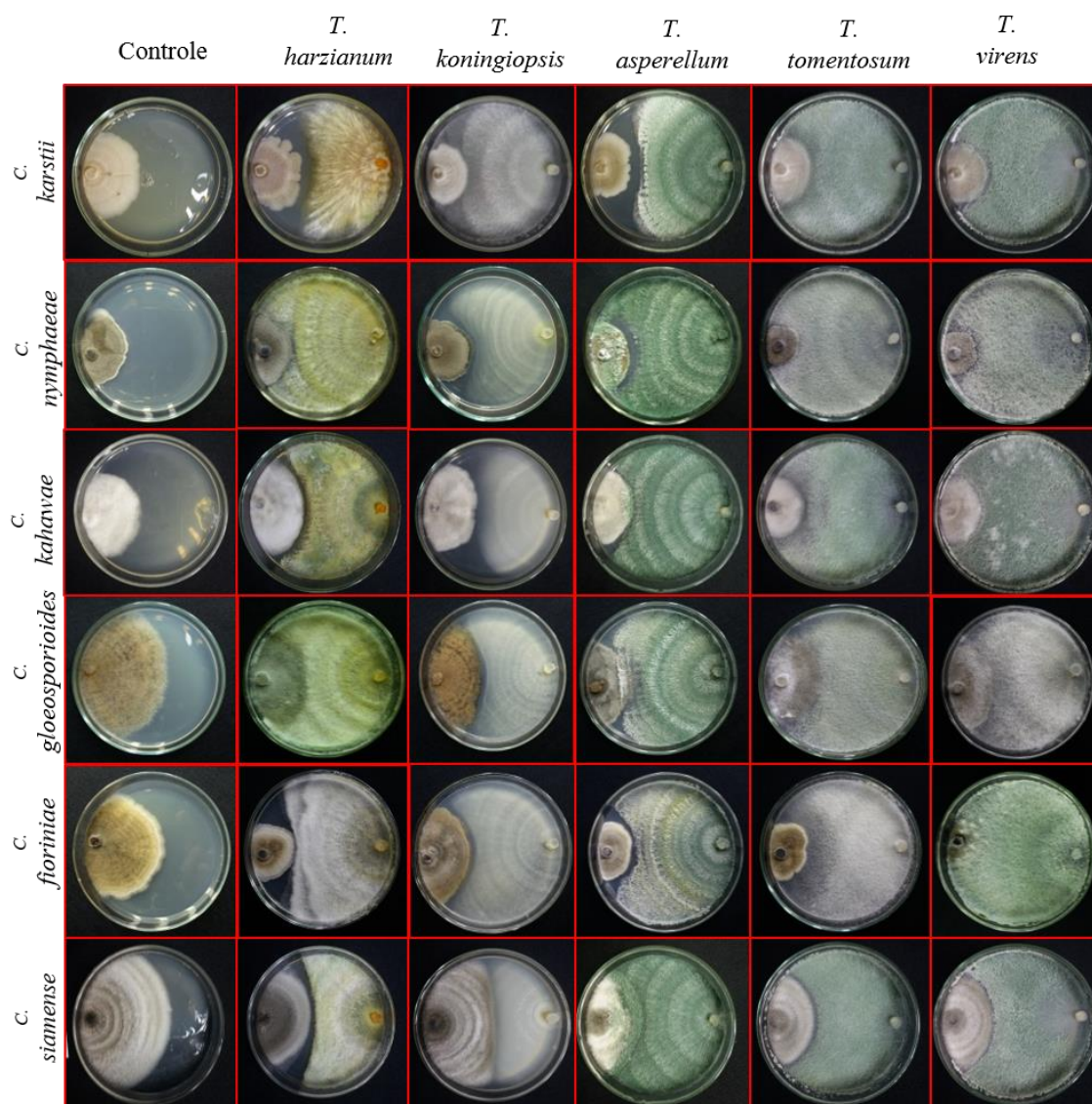
A escala de Rodrigues, assim como a tradicional escala de Bell, medem a força do antagonismo sobre o patógeno, entretanto a escala de Rodrigues amplia o conjunto de notas para a diferenciação de isolados antagonistas para avaliações em testes de pareamento de cultura. Segundo Silva et al. (2015), a escala de Rodrigues apresentou coeficiente de variação menor do que a escala de Bell, por ser mais precisa e objetiva, permitindo resultados mais acurados no teste de confrontação direta. Essa redução no coeficiente de variação também foi encontrada por Nozaki et al. (2018) ao comparar essas duas escalas em teste de confronto direto.

A capacidade inibitória de muitas espécies de *Trichoderma* sobre patógenos fúngicos em testes de pareamento de cultura *in vitro* é promovida por diferentes mecanismos que atuam de forma individual ou em conjunto, como a competição por espaço e nutrientes, parasitismo e antibiose pela produção de metabólitos secundários voláteis e não voláteis. O mecanismo de competição é dependente da velocidade de crescimento do agente de biocontrole em relação ao patógeno, quando ambos estão associados em um determinado sítio, de modo que, quando há rápida colonização do local pelo biocontrolador, impede o estabelecimento e desenvolvimento de agentes patogênicos pela indisponibilidade de espaço e nutrientes (MEDEIROS et al., 2018). Quanto ao mecanismo de parasitismo, o agente de biocontrole parasita as estruturas do patógeno por penetração e colonização das hifas, interferindo no seu desenvolvimento e, a antibiose, consiste na produção de metabólitos secundários pelo biocontrolador com atuação direta na redução do crescimento do patógeno (MEDEIROS et al., 2018).

Ribas, Matsumura e Van Der Sand, (2014) mencionam que *Trichoderma* spp. podem produzir mais de 40 diferentes metabólitos secundários que podem contribuir na sua ação

antagônica. Dentre esses metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp., Dennis e Webster (1971), Ribas, Matsumura e Van Der Sand, (2014) e Reino et al. (2008) descrevem gliotoxina, viridina, ácido harziânico, trichodermina, suzucacilina, alameticina, dermadina, pironas, daucanas, sideróforos, entre outros. Markovich e Kononova (2003) relatam que o micoparasitismo de *Trichoderma* spp. também é acompanhado pela produção de enzimas líticas degradantes da parede celular do hospedeiro como a quitinases, celulases e proteases.

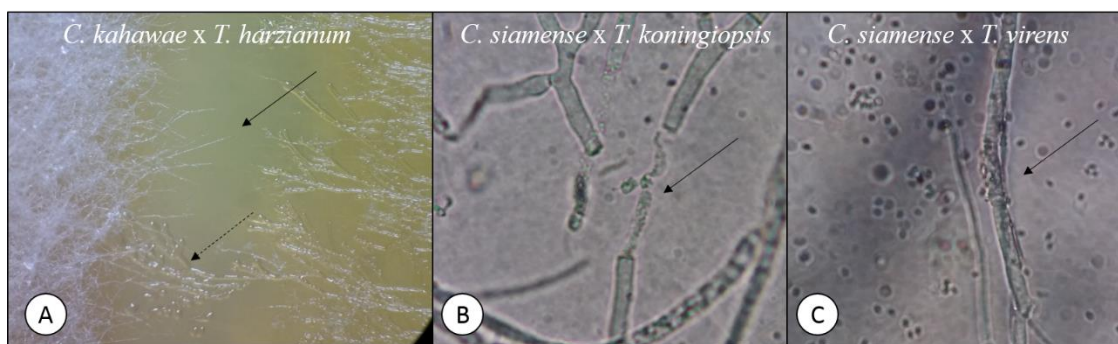
Figura 3. Pareamento de cultura em placas de petri entre *Colletotrichum* spp. e *Trichoderma* spp.



Bonfim et al. (2010) descreve que dentre os efeitos provocados pelos metabólitos secundários sobre os fitopatógenos, destaca-se: a redução ou paralisação do crescimento e esporulação; redução na germinação de esporos; distorções na hifa e endólise. No presente

estudo, foi possível observar alguns desses efeitos durante o processo de confrontação, como formação de halo de inibição entre antagonistas e patógenos (indício de antibiose, supressão do crescimento micelial do patógeno por metabólitos não voláteis) (Figura 4. A), degradação de hifas do patógeno (Figura 4. B) e enrolamento das hifas do patógeno pelo antagonista (micoparasitismo, que funciona quando os organismos estão em contato) (Figura 4. C).

Figura 4. **A** – Detalhe do halo de inibição formado na interação entre *C. kahawae* x *T. harzianum*, seta pontilhada indica a presença de hifas de *T. harzianum* recobertas possivelmente por metabólitos secundários. **B** - Hifa de *C. siamense* degradada na presença de *T. koningiopsis* (microscopia óptica, 400x). **C** – Hifa de *T. virens* parasitando *C. siamense* (microscopia óptica, 400x).



6.3.2 Efeito inibitório de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

No teste de antibiose por metabólitos voláteis integrando espécies de *Trichoderma* spp. e *Colletotrichum* spp. houve interação positiva e todas as espécies de *Trichoderma* proporcionaram efeito inibitório significativo frente as diferentes espécies de *Colletotrichum* (Tabela 4 e Figura 5). Deste modo, foi possível constatar a produção de metabólitos voláteis pelas espécies de *Trichoderma* com ação sobre *Colletotrichum* spp.

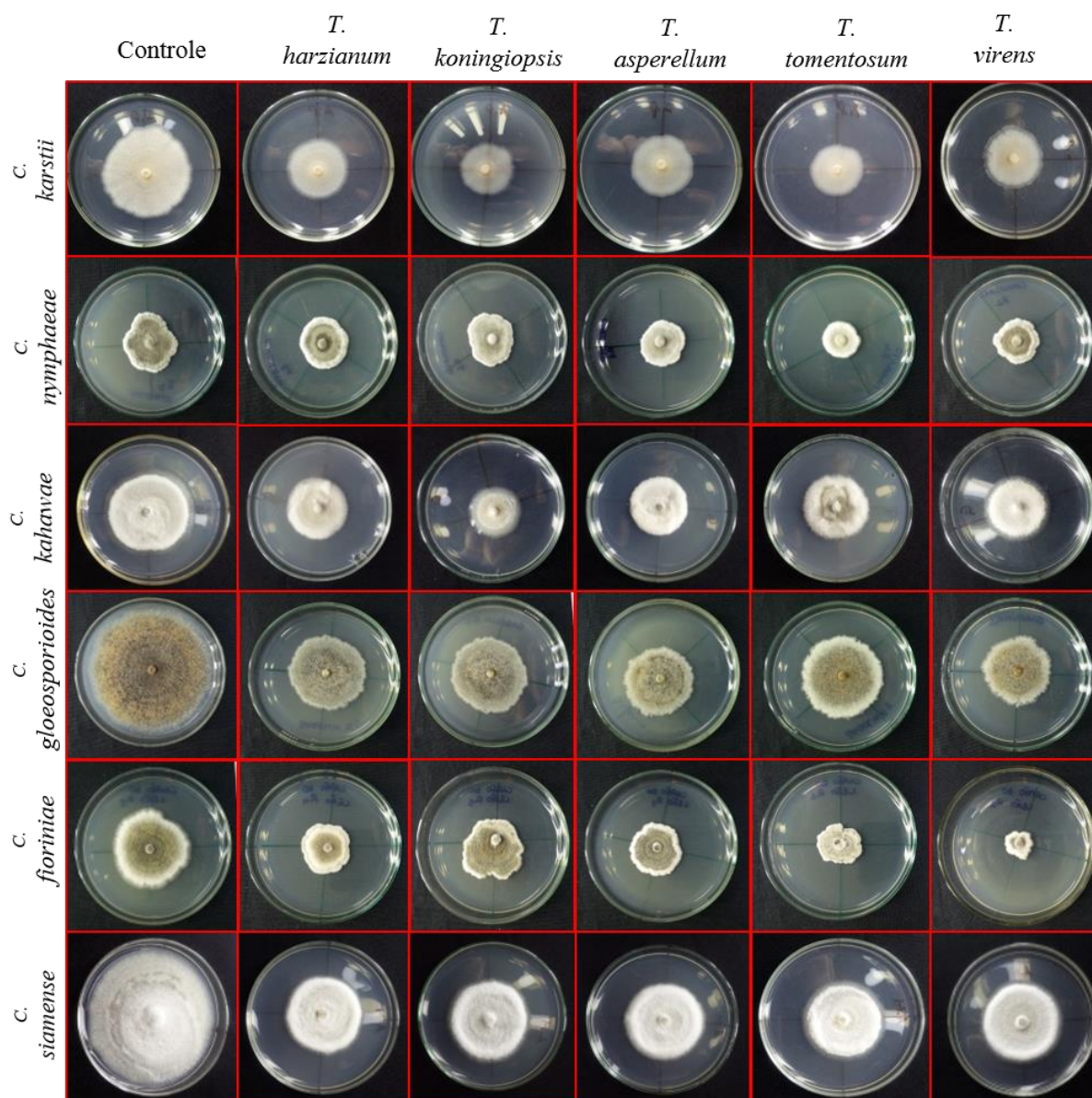
Tabela 4. Efeito inibitório (%) de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Patógenos	Testemunha	<i>T. harzianum</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. tomentosum</i>	Média
<i>C. karstii</i>	0,0 aC*	26,7 aB	34,3 aB	26,8 aB	19,9 aB	41,0 aA	29,7
<i>C. nymphaeae</i>	0,0 aC	15,4 bA	9,3 bB	21,7 aA	22,6 aA	29,4 bA	19,7
<i>C. kahawae</i>	0,0 aB	20,3 bA	21,7 bA	30,4 aA	21,1 aA	18,5 bA	22,4
<i>C. gloeosporioides</i>	0,0 aB	26,4 aA	35,7 aA	25,4 aA	36,0 aA	27,6 bA	30,2
<i>C. fioriniae</i>	0,0 aC	14,8 bB	19,1 bB	23,3 aB	28,7 aA	31,9 bA	23,6
<i>C. siamense</i>	0,0 aB	27,1 aA	26,0 aA	21,0 aA	24,6 aA	29,7 bA	25,7
Média	0,0	21,8	24,4	24,7	25,5	29,7	

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: 24,7%

Neste teste, o antagonista *T. tomentosum* proporcionou índice de inibição de até 41,0% quando confrontado com *C. karstii* e, para os outros patógenos, o percentual de inibição variou de 18,5% até 31,9%, destacando-se entre os demais antagonistas. *T. virens* apresentou índices de inibição ligeiramente inferiores que *T. tomentosum*, os quais variaram de 19,9% a 36,6%. Os antagonistas *T. koningiopsis*, *T. harzianum* e *T. asperellum* também inibiram o crescimento micelial dos patógenos, em maior ou menor grau dependendo da interação, porém, em linhas gerais, em menores porcentagens. Dessa forma, *T. tomentosum* e *T. virens* foram os antagonistas que apresentaram maior ação inibitória à *Colletotrichum* spp. por metabólitos voláteis (Tabela 4 e Figura 5).

Figura 5. Pareamento de cultura em placas de petri entre *Colletotrichum* spp. e *Trichoderma* spp.



De forma análoga a este estudo, o efeito antifúngico de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. vem sendo observado em vários outros testes. Karimi et al. (2017), obtiveram índice de inibição do crescimento micelial in vitro de *C. nymphaeae* de até 6,25% utilizando *T. asperellum*. Joshi e Misra (2013) observaram índice de inibição de até 14,7% para *C. falcatum* utilizando *Trichoderma* spp. e Guimarães et al. (2016), observaram redução no crescimento micelial de *Cladosporium herbarum* de 50%, quando confrontado com *T. harzianum*. De acordo com Tamimi e Hutchinson (1975) e Keszler et al. (2000), dentre os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. citam-se: acetona, etanol, etileno, dióxido de carbono,

aldeídos e cianeto de hidrogênio. Esses compostos são ativos a baixas concentrações e desempenham um importante papel no controle de fitopatógenos (BONFIM et al., 2010).

Todas as cepas representantes das espécies de *Trichoderma* spp. avaliadas neste estudo, apresentaram potencial para o controle de *Colletotrichum* spp. *in vitro*. Os testes tiveram o objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* spp. que sejam capazes de exercer ação antagônica contra os agentes etiológicos da antracnose em noqueira-pecã. Entretanto, recomenda-se a complementação do estudo com a realização de testes *in vivo*, em casa de vegetação e em campo, pois é importante para confirmação do antagonismo. Segundo Bell, Wells e Markham (1982), algumas condições de temperatura e umidade podem interferir no desenvolvimento tanto do agente de biocontrole, quanto do patógeno.

A literatura disponível enfatiza que os fungos do gênero *Trichoderma* possuem amplas possibilidades para aplicação na agricultura dentre elas cita-se: biocontrole de patógenos em sementes (JUNGES et al., 2016), em frutos para as controle de doenças da pós-colheita (MOREIRA et al., 2002), em solo para biocontrole de fitopatógenos radiculares (LOUZADA et al., 2009), no biocontrole de patógenos da parte aérea de plantas (MARTINS, MELLO e PEIXOTO, 2007), para produção de biomolecular (GÓMEZ-GARCÍA et al., 2019) como também para promoção do crescimento e indução de resistência em plantas (SILVA, 2012).

A realização de testes de antagonismo *in vitro* visam a seleção dos isolados mais promissores para o biocontrole de *Colletotrichum* spp. e para o posterior desenvolvimento de formulações comerciais projetadas para o manejo da antracnose. A possibilidade de utilização do biocontrole com *Trichoderma* spp. para o manejo desta doença em pomares de noqueira-pecã deve ser estudada e aplicada de forma ampla, buscando respostas sobre as interações entre antagonistas e o patossistema, promovidas pelos diversos mecanismo de ação diretamente sobre patógenos, a possibilidade de ativação do sistema de defesa da planta e o equilíbrio da microbiota associada. Vale salientar que o biocontrole tende a apresentar melhor eficiência quando inserido dentro do manejo integrado de doenças, onde as diversas técnicas convergem para a promoção da saúde da planta e a supressão de patógenos.

6.4 Conclusões

Com base nos testes de pareamento de cultura, escala de Rodrigues (2010) e antagonismo por metabólitos voláteis, concluiu-se que todas as espécies de *Trichoderma* utilizadas apresentaram potencial antagônico frente aos agentes etiológicos da antracnose em

nogueira-pecã, em maior ou menor grau. Entretanto, *T. virens* e *T. tomentosum* foram as espécies com maior capacidade antagonista à *Colletotrichum* spp. in vitro.

Recomenda-se a realização de mais estudos voltados à elucidação das interações entre *Trichoderma* spp. e o patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã, assim como testes em campo que ratifiquem os resultados deste estudo.

6.5 Referências Bibliográficas

ARAÚJO, N.A.F., VIEIRA, J.D., MOURA, M.D.R., PESSOA, W.R.L.S., BARGUIL, B.M. Pathogenicity and aggressiveness of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in ornamental pepper. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 3, p. 321-326, 2016.

BELL, D.K., WELLS, H.D. MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BOMFIM, M.P., SÃO JOSÉ, A.R., REBOUÇAS, T.N.H., ALMEIDA, S.S.D., SOUZA, I.V.B., DIAS, N.O. Avaliação antagonista in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BRENNEMAN, T.B., REILLY, C.C. Recent occurrence of pecan anthracnose caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Disease**, v. 73, n. 9, 1989.

BRITO, F.S., MILLER, P.R.M., STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.

BROTMAN, Y., KAPUGANTI, J. G., VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. 390-391, 2010.

CARVALHO, D.D.C., MUNIZ, P.H.P.C., DE OLIVEIRA, T.A.S., MARTINS, I., DE MELLO, S. C.M. Antagonist activity of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum* from common bean. **Acta Iguazu**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 2019.

CHAGAS, L.F.B., JUNIOR, A.F.C., DE CASTRO, H.G. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production. **Brazilian Journal of Agriculture**. v. 92, n. 2, p. 176-185, 2017.

CHRISTMANN, P.E.T.P., DALLA PRIA, M., HENNIPMAN, H.S., GODOY, A.R. In vitro control of *Colletotrichum lindemuthianum* by *Trichoderma* spp. and in vivo with alternative products. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 10, p. 74-80, 2019.

CUBILLA-RÍOS, A.A., RUÍZ-DÍAZ-MENDOZA, D.D., ROMERO-RODRÍGUEZ, M.C., FLORES-GIUBI, M.E., BARÚA-CHAMORRO, J.E. Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. **Agronomía Mesoamericana**, v. 30, n. 1, p. 63-77, 2019.

DA COSTA, K.K., RUFINO, C.P.B., DE MACEDO, P.E.F., NOGUEIRA, S. R. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose de *Euterpe precatoria*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, p. 391-397, 2019.

DE LA CRUZ-QUIROZ, R., ROUSSOS, S., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., HERNANDEZ-CASTILLO, D., AGUILAR, C.N. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 4, n. 2, p. 237-243, 2018.

DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. D., GUZMÁN-ORTIZ, D.A., GÓMEZ-LIM, M.A., DÉLANO-FRIER, J. P., DE-FOLTER, S., SÁNCHEZ-GARCÍA, P., PEÑA-CABRIALES, J.J. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**, v. 64, n. 1, p. 37-44, 2013.

DENNIS, C., WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 368-369, 1971.

EFROM, C.F.S., OLIVEIRA, A.M.R., DOS SANTOS WOLFF, V R., TONIETTO, A., WITTER, S. Aspectos fitotécnicos do cultivo da oliveira no Rio Grande do Sul II: estudos sobre cochonilhas e controle da antracnose. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 3, p. 119-132, 2019.

FANTINEL, V.S., MUNIZ, M.F.B., POLETTO, T., DUTRA, A.F., KRAHN, J.T., FAVARETTO, R.F., SARZI, J.S. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 3, p. 43-50, 2018.

GÓMEZ-GARCÍA, R., ROUSSOS, S., MEDINA-MORALES, M.A., FARRUGGIA, B., PICO, G., AGUILAR, C.N. Producción de enzimas de *Trichoderma harzianum* por fermentación de residuos lignocelulósicos. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 13, n. 22, p.15-23, 2019.

GUIMARÃES, G.R., DA SILVA FERREIRA, D., DOS SANTOS GALVÃO, C., MELLO, S.C.M., CARVALHO, D.D.C. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 21, n. 1, p. 7-11, 2016.

HADDAD, P.E., LEITE, L.G., LUCON, C.M.M., HARAKAVA, R. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140-1148, 2017.

JOSHI, D., MISRA, S.C. Characterization of *Trichoderma* isolates from sugarcane agro-ecosystem and their efficacy against *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 15, n. 2, p. 192-196, 2013.

JUNGES, E., MUNIZ, M.F., MEZZOMO, R., BASTOS, B., MACHADO, R.T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 2, p. 237-244. 2016.

KARIMI, K., AHARI, A.B., ARZANLOU, M., AMINI, J., PERTOT, I. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol

efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 124, n. 5, p. 453-466, 2017.

KEFIALEWA, Y., AVALEWB, A. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 8-10, 2008.

KESZLER, Á., FORGÁCS, E., KÓTAI, L., VIZCAÍNO III, J.A., MONTE, E., GARCÍA-ACHA, I. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, n. 10, p. 421-424. 2000.

KLEIN, M.N., SILVA, A.C., LOPES, M.R., KUPPER, K.C. Application of microorganisms, alone or in combination, to control postbloom fruit drop in citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 6, p. 505-512, 2013.

KRAHN, J.R.T. **Microbiota do solo em três sistemas de cultivo de citros e patogenicidade de *Fusarium* spp.** 2017. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

KUMAR, S. *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. **International Journal of Agriculture Science and Medical Veterinary**, v. 1, n. 3, p. 106-121, 2013.

LATHAM, A.J., BOWEN, K.L. CAMPBELL, H.L. Occurrence of *Glomerella cingulata* in pecan nut shucks and its association with fungal leaf scorch. **Plant Disease**, v. 79, n. 2, p. 182-185, 1995.

LEHARWAN, S., MALIK, V. K., SINGH, R., LEHARWAN, M. In vivo cross pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of mango with subtropical fruits and weeds host. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 12, p. 1829-1834, 2018.

LOUZADA, G.A.D.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I., BRAÚNA, L.M. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**. v. 9, n. 3, p. 145-149. 2009.

MACIEL, C.G., WALKER, C., MUNIZ, M.F.B., ARAÚJO, M.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* Engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

MANTZ, G., MINHOT, R., MORRELLI, G. MAIALE, S. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing pecan anthracnose in Argentina. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 544, 2010.

MARKOVICH N., KONONOVA G., Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 39, n. 4, p. 341-351, 2003.

MARTINS, I., MELLO, S., PEIXOTO, J. Potencial de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico da antracnose em maracujazeiro-amarelo. Brasília: **EMBRAPA**, 2007. 17 p. (Documentos, 233).

MEDEIROS, F.H.V., da SILVA J.C.P., PASCHOLATI S.F. Controle biológico de doenças de plantas. AMORIM, L., REZENDE, J.A. M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.EA. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Agronômica Ceres, 2018, v. 1, p. 261-272.

MELLO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MUNISSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid, "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 57-66, 1976.

MESQUITA, D.C.M., FERREIRA, F.A., MARTINS, I., MELLO, S.C.M., CARVALHO, D.D.C. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 13, n. 1, p. 1-4, 2017.

MILANESI, P.M. Aspectos biológicos da interação *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto. Tese de doutorado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2012, 131 p.

MOREIRA, L.M., MAY-DE MIO, L.L., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M., LIMA, M.L., POSSAMAI, J.C. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 4, p. 395-398, 2002.

NOZAKI, M. H., HENDGES, C., ENSINA, G.H., LUI, L., MARTINS, C. V. B., STANGARLIN, J.R. Controle in vitro de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Cultivando o saber**. v. 11, n. 4, p. 338-345, 2018.

OLIVEIRA, E.S., VIANA, F.M.P., MARTINS, M.V.V. Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 340-350, 2016.

PESQUEIRA, A.D.S., BACCHI, L.M.A., GAVASSONI, W.L. Fungicide association in the control of anthracnose in the soybean in Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 203-212, 2016.

POLETTO, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., FANTINEL, V. S., REINIGER, L.R.S., STEFENON, V.M., HAKAKAVA, R., BRIOSO, P.S.T., POLETTO, I. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3277-3277, 2019.

REINO, J.L., GUERRERO, R.F., HERNÁNDEZ-GALÁN, R., COLLADO, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89-123, 2008.

RIBAS, P.P.R., MATSUMURA, A.T.D.S., VAN DER SAND, S.T. Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro in vitro. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 20, n. 1/2, p. 94-103, 2014.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associados a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SARZI, J.S. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de feijoeiro. 2019. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

SILVA, D.D., CROUS, P.W., ADES, P.K., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 155-168, 2017.

SILVA, G.B.P.D., HECKLER, L.I., SANTOS, R.F.D., DURIGON, M. R., BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.

SILVA, V.N., GUZZO, S.D., LUCON, C.M.M., HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1609-1617, 2012.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and it's anamorph *Colletotrichum*, In: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CAB International, Wallingford, U.K. p. 1-26, 1992.

TAMIMI, K.M., HUTCHINSON, S.A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 64, n. 3, p. 455-463, 1975.

ZHANG, Y.B., MENG, K., SHU, J.P., ZHANG, W., WANG, H.J. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1432, 2019.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Além do México e dos Estados Unidos, que são os maiores produtores, a noqueira-pecã também é cultivada em vários países do mundo, principalmente com clima temperado, subtropical ou em regiões de altitude, onde o microclima propicia o repouso vegetativo invernal, necessário para o seu desenvolvimento. No Brasil, é cultivada principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná e, em menor escala, na região sudeste do País, estando entre as principais frutíferas de clima temperado produzidas no País.

Nos três Estados sulinos a cultura está em expansão, o bom retorno financeiro e a perspectiva de aumento da demanda mundial pela fruta, têm estimulado o seu cultivo. Nos últimos 18 anos, centenas de novos pomares foram implantados, as estimativas quanto a área cultivada no Brasil, apontam para 10 mil hectares, apesar de não haver um estudo concreto (LIMA, 2021).

Apesar do Brasil ser o quarto maior produtor mundial de noz-pecã e a indústria almejar o mercado internacional na busca de preços mais atrativos, o país ainda importa grande quantidade de nozes para poder suprir a demanda interna. A maior parte da noz-pecã brasileira destina-se ao mercado interno e é consumida in natura ou processada, na indústria confeitaria, compondo produtos lácteos, sorvetes, biscoitos, como também, na indústria de cosméticos, entre outros setores.

O aumento no cultivo da noz-pecã vem demandando inovações e tecnologias em todas as áreas da cadeia produtiva, desde a produção de mudas, técnicas de cultivo, processamento da fruta, marketing, além da criação de políticas públicas para fomento do cultivo. Apesar de ser uma cultura consagrada nos Estados Unidos e México, seu cultivo fora da sua região de origem, como no Brasil, pode apresentar peculiaridades, principalmente em função das diferenças edafoclimáticas, socioambientais e econômicas da região onde é cultivada, requerendo o desenvolvimento de pesquisas específicas ao seu contexto de cultivo.

No que diz respeito às doenças da noqueira-pecã no Brasil, vale destacar que a pesquisa científica trouxe contribuições significativas nesta área, principalmente pela elucidação de vários patossistemas importantes, o que possibilitou o entendimento das relações patógeno/hospedeiro, auxiliando na adoção de manejos fitossanitários adequados para mitigação e/ou prevenção das doenças. Algumas dessas doenças foram diagnosticadas ocorrendo exclusivamente no Brasil, como é o caso da murcha, causada por *Fusarium oxysporum* (ROLIM et al., 2020b) e o cancro-do-tronco, causado por fungos da família

Botryosphaeriaceae (POLETTO et al., 2016; ROLIM et al., 2020a), e outras doenças que são causadas por patógenos distintos de outros países, como a mancha-de-cladosporium causada por *Cladosporium* spp. (WALKER et al., 2016). Além disso, os estudos relacionados ao controle biológico de doenças vêm ampliando o leque de estratégias de manejo fitossanitário para a noqueira-pecã (SILVA et al., 2013; NICOLETTI et al., 2017; ROLIM et al., 2019; POLETTO et al., 2019).

A história da pecanicultura no Brasil indica que o desconhecimento sobre o manejo fitossanitário, já foi umas das principais causas que impediram o seu desenvolvimento comercial no passado, levando ao abandono ou corte da maioria dos pomares. Assim, a busca pelo conhecimento sobre as doenças e seus controles, objetiva melhorar o cultivo e a produtividade dos pomares de noqueira-pecã. Contudo, os métodos e as técnicas de controle de doenças empregadas na cultura, não só devem ser eficientes, mas também, preservar a saúde do homem, do ambiente e a integridade do alimento. O uso de cultivares resistentes a doenças, aliado às práticas de manejo sustentáveis que promovam a saúde da planta e a supressão dos patógenos, tende a proporcionar colheitas satisfatórias e frutos saudáveis, conservando os recursos naturais.

No sul do Brasil, a antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, traz empecilhos ao cultivo da noqueira-pecã, causando abscisão prematura dos frutos, principalmente na fase de enchimento, como também, manchas foliares durante todo o período vegetativo. O plantio de cultivares suscetíveis às doenças, o clima com temperatura e umidade elevada, assim como a ausência de princípios ativos registrados para a cultura em órgãos oficiais, são fatores que dificultam o manejo fitossanitário. Diante disso, o manejo integrado de doenças é visto como uma ferramenta importante que pode ser utilizada nos pomares de noqueira-pecã para o controle de doenças como a antracnose.

Entretanto, primeiramente, é necessário caracterizar o patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã, de modo a identificar os patógenos causadores e as características da doença. A caracterização de cultivares de noqueira-pecã e a busca por fontes de resistência à antracnose, assim como o uso de agentes de biocontrole para a doença, foram objetivos desta tese. Esses componentes são importantes ferramentas para o manejo de doença, trazendo maior efetividade para o controle da antracnose.

O primeiro estudo envolvendo a antracnose da noqueira-pecã no Brasil, culminou com a publicação intitulada primeiro relato de *Colletotrichum nymphaeae* causando antracnose em *Carya illinoensis* no Brasil (**Capítulo 1**). Neste estudo, foi realizada a identificação do

patógeno *C. nymphaeae* associada as lesões em frutos e folhas com sintomas de antracnose em um pomar de noqueira-pecã no município de Santa Maria – RS, inicialmente, pela descrição dos sintomas da doença e sinais do patógeno e, posteriormente, comprovada pela análise morfológica, molecular e patogênica do agente causal.

A partir desta constatação buscou-se realizar um estudo mais abrangente para investigar a variabilidade de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose da noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul (**Capítulo 2**). Para isso, coletas de frutos sintomáticos foram realizadas em 47 municípios do Estado, abrangendo regiões com condições edafoclimáticas distintas, bem como, pomares com diferentes idades e técnicas de manejo. No total, foram obtidos 68 isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de noqueira-pecã com sintomas de antracnose.

Durante as coletas, pode-se constatar que a antracnose é uma doença que preocupa os produtores, principalmente pela queda prematura dos frutos e consequente redução na produtividade da cultura, intensificando-se em anos com verões quentes e chuvosos. Notou-se também, uma demanda muito grande por parte dos produtores por informações sobre a identificação das doenças e seus respectivos métodos de controle, assim como, por cultivares resistentes as doenças.

A identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. a nível de espécie não foi possível utilizando somente critérios morfológicos, pois estes se limitam a poucos caracteres. Além disso, Hu et al. (2015); Weir, Johnston e Damm (2012) destacam que para o gênero *Colletotrichum* pode haver variações nos fenótipos sob diferentes condições ambientais, ou também, ocorrer a sobreposição de caracteres entre as espécies, dificultando a análise. Sutton (1992), destaca que o gênero *Colletotrichum* apresenta grande variação em suas características morfológicas, o que reflete a ampla variabilidade genética que ocorre entre e dentro das espécies deste gênero. Neste caso, é recomendado que as técnicas morfológicas tradicionais de identificação sejam combinadas com ferramentas de diagnóstico molecular, gerando resultados mais apropriados e confiáveis (CAI et al., 2009; CANNON et al., 2012; HASSAN et al., 2018).

Neste estudo, a técnica de análise molecular utilizada para identificação das espécies de *Colletotrichum* spp. foi o sequenciamento genético. Essa técnica é vantajosa pela alta qualidade dos seus resultados e livre de influências ambientais, mas relativamente onerosa, pois requer equipamentos e insumos de alto custo, a qual aumenta proporcionalmente com o número de regiões genômicas analisadas para cada isolado. Uma alternativa para viabilizar a realização dessa análise neste estudo foi a realização do agrupamento dos isolados semelhantes, através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean),

utilizando características morfológicas quantitativas, deste modo, foi possível escolher isolados representantes de cada grupo de similaridade morfológica.

A análise de agrupamento discriminou os isolados em três morfotipos, dos quais, foram escolhidos 18 isolados representantes para serem analisados molecularmente. Após a análise, constatou-se que para todos os isolados houve coincidência entre o morfotipo e seu respectivo complexo de espécies. Desta forma, a análise de agrupamento mostrou-se uma ferramenta adequada para diferenciação preliminar de *Colletotrichum* spp. a nível de complexo. Segundo Guginski-Piva et al. (2018), os complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* são convencionalmente identificados usando caracteres morfológicos.

Através do sequenciamento dos genes parciais actina (ACT) e beta tubulina 2 (β -tub2), foi possível realizar a identificação dos isolados representantes a nível de espécie, pela comparação com sequências similares depositadas no Genbank e pela análise filogenética multigênica. Neste estudo, foram identificadas seis espécies de *Colletotrichum*, comprovadamente patogênicas, associadas à antracnose em frutos de noqueira-pecã, que foram *C. nymphaeae*, *C. fioriniae* (complexo *C. acutatum*), *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* (complexo *C. gloeosporioides*) e *C. karstii* (complexo *C. boninense*).

No teste de patogenicidade, as espécies apresentaram diferentes níveis de virulências, contudo, *C. nymphaeae* (isolado SAJ2) foi a mais virulenta, além de ser encontrada em maior número entre os isolados identificados molecularmente, assim, pode ser considerada a espécie dominante causadora de antracnose em noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul. De acordo com Wang et al. (2016a), Munir et al. (2016) e Noor et al. (2018), a antracnose pode ser causada por várias espécies de *Colletotrichum* em um hospedeiro, havendo, dentre elas, geralmente, prevalência de algumas espécies. Identificar a variabilidade do agente patogênico e suas características de virulência são fatores fundamentais para o desenvolvimento de estudos que envolvam o controle da doença, seja ele, por métodos genéticos, biológicos, químicos ou culturais.

No contexto do controle genético, além do conhecimento sobre a variabilidade do agente patogênico e sua relação com o hospedeiro, o desenvolvimento de programas de melhoramento genético para resistência a doenças requer, também, obter fontes de resistência à doença na cultura. No Brasil, a introdução de muitas cultivares comerciais de noqueira-pecã, juntamente com a seleção e a propagação de materiais genéticos oriundos de polinização espontânea,

promoveu o estabelecimento de um germoplasma amplo e com significativa diversidade genética, com potencial para fornecimento de genes de interesse.

Entretanto, a propagação sem controle varietal, trouxe como consequência negativa, o cultivo de variedades sinônimas (diferentes nomes para a mesma cultivar) e variedades homônimas (diferentes cultivares com o mesmo nome), trazendo, muitas vezes transtornos aos produtores. Além do mais, encontram-se dezenas de genótipos sem denominação em função da alta segregação gênica promovida pela propagação seminal. Nesse sentido, a caracterização do germoplasma disponível, realizada no **Capítulo 3**, é fundamental para o conhecimento do potencial de cada genótipo, possibilitando a identificação, seleção e/ou desenvolvimento de cultivares superiores de noqueira-pecã.

Buscando conhecer a variabilidade do germoplasma de noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul foram selecionados 60 genótipos, com diferentes características morfológicas, os quais são cultivados em propriedades familiares. Para a caracterização desses genótipos foram utilizados métodos morfométricos, químicos e análises genéticas através de marcadores AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado).

A análise das características morfométricas e químicas revelaram uma grande variação entre os genótipos estudados. Embora se deseje uma alta homogeneidade morfométrica em espécies de culturas comerciais, essas diferenças representam uma fonte importante de variação genética na noqueira-pecã que podem ser exploradas para melhorar o seu cultivo. Além disso, nozes com diferentes características podem ser úteis para diferentes fins na indústria, dependendo de sua composição química, relacionados a demandas comerciais, farmacêuticas ou nutricionais.

A análise genética dos acessos de noqueira-pecã baseadas em marcadores de AFLP não se correlacionou com as características morfométricas ou químicas avaliadas. Apesar disso, marcadores AFLP podem ser encontrados ligados a genes de interesse agrônomico, os quais podem ser convertidos em marcadores SCAR (região amplificada de sequência caracterizada).

A análise molecular por marcadores AFLP revelou um nível moderado a alto de diversidade genética entre os genótipos estudadas. Como a diversidade genética é crucial para a realização do aprimoramento genético, esse resultado apoia o potencial de avançar nessa questão, usando genótipos de noqueira-pecã selecionados como fonte de germoplasma. Nesse sentido, a conservação desse recurso genético é de suma importância para a pecanicultura brasileira. A formação de um banco de germoplasma é importante, tanto para conservação,

como também, para auxiliar no desenvolvimento de estudos relacionados à adaptação, produtividade, sanidade e outros.

Dentre as estratégias de manejo fitossanitário, a resistência genética é apontada como uma das formas mais eficientes para o controle de doenças e, sempre que possível, deve ser priorizada (LIMA et al., 2019). Diante disso, no **Capítulo 4**, buscou-se identificar fontes de resistência à antracnose causada por *Colletotrichum* spp., em genótipos de noqueira-pecã cultivados no Brasil.

Para tanto, foram selecionados 18 genótipos, baseando-se no índice de similaridade de Jaccard, estudados no **Capítulo 3**. A partir disso, cada genótipo foi inoculado com *Colletotrichum* spp., a fim de verificar a sua sensibilidade a cada patógeno. Quanto aos patógenos, foram selecionadas três espécies, *C. nymphaeae*, *C. gloeosporioides* e *C. karstii*, estudados no **Capítulo 2**, cada uma representando um complexo de espécies de *Colletotrichum* (Complexos *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*), respectivamente. As inoculações foram realizadas nos frutos e folíolos sadios de cada genótipo. Além disso, foi realizada a caracterização da diversidade genética desses genótipos utilizando marcadores microsatélites nucleares e plastidiais e a identificação de possíveis correlações entre os marcadores moleculares e a resistência à *Colletotrichum* spp.

O teste de sensibilidade revelou que a doença foi influenciada tanto por características do hospedeiro quanto do patógeno inoculados. Ou seja, para alguns genótipos a sensibilidade foi uniforme para os três patógenos, enquanto que, para outros, a sensibilidade variou entre os três patógenos. Camargo (2018b) explica que a interação patógeno/hospedeiro é gerida por diversos mecanismos, estruturais e/ou bioquímicos. O resultado dessa interação poderá se dar em maior ou menor grau e dependerá da constituição genética tanto do patógeno como do hospedeiro. Observou-se também, que a antracnose se manifestou mais severamente nos frutos em relação aos folíolos, possivelmente diferenças no perfil metabólico e/ou estruturais entre frutos e folíolos podem ter influenciado na resistência à *Colletotrichum* spp. nesses órgãos.

Os genótipos 63, 47, 29 e 56 apresentaram alta resistência a antracnose tanto em frutos como em folíolos, os quais podem servir como fontes de resistência para estudos futuros envolvendo o melhoramento para resistência a antracnose. Entretanto, vale salientar que pelo fato de os genótipos não estarem sendo cultivados nas mesmas condições, é possível que os resultados encontrados no presente estudo possam apresentar variação de sensibilidade em trabalhos futuros, ocasionadas pelas diferentes idades das plantas, estado nutricional ou por pequenas diferenças na maturação do fruto. Nesse sentido, a criação de um banco de

germoplasma de noqueira-pecã permitiria que testes de sensibilidade sejam realizados com materiais vegetais mais homogêneos. Além disso, testes de campo poderiam ser contrastados com os testes laboratoriais, dando maior confiabilidade aos resultados.

A análise genética por meio dos marcadores moleculares microssatélites revelou moderada a alta diversidade genética para os genótipos estudados. Este aspecto é muito importante, pois pode ser utilizado como princípio para a seleção de indivíduos a serem introduzidos em bancos de germoplasma e/ou programas de melhoramento genético, garantindo uma base genética mais ampla.

Por outro lado, a análise de agrupamento UPGMA não agrupou os genótipos de acordo com a sensibilidade à *Colletotrichum* spp., ou seja, alguns genótipos com alta resistência e suscetíveis foram alocados no mesmo clado. Além disso, não houve correlação entre marcadores SSR e a resistência a *Colletotrichum* spp., sugerindo que os locus utilizados no presente estudo são neutros, ou seja, não estão ligados a regiões expressas dos genomas nuclear e plastidial, para a característica de resistência a *Colletotrichum* spp.

Assim como o controle genético, a utilização de organismos biocontroladores é uma importante ferramenta de controle de doenças, o qual pode ser utilizado integrado a outras formas de manejo trazendo maior efetividade para minimização do efeito das doenças sobre os cultivos vegetais. Neste contexto, insere-se o controle biocontrole estudado no **Capítulo 5**, visando a supressão de fitopatógenos através de um organismo não patogênico.

Objetivando aumentar a gama de alternativas eficientes e seguras para o manejo de doenças, agentes de biocontrole como o fungo *Trichoderma* spp. vêm sendo intensamente investigados. O gênero *Trichoderma* spp. apresentam grande potencial para a supressão de fitopatógenos, pelo seu amplo espectro de ação, principalmente, quando inserido no manejo integrado de doenças.

Buscando avaliar a ação do antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre os patógenos *Colletotrichum* spp. causador da antracnose da noqueira-pecã, foram conduzidos testes de confrontação direta, onde avaliou-se a inibição do crescimento micelial, o antagonismo segundo a escala de Rodrigues (2010) e por metabólitos voláteis.

Para isso, foram selecionadas cinco espécies de *Trichoderma* spp., duas delas (*T. harzianum* e *T. asperellum*) provenientes de produtos comerciais e outras três (*T. koningiopsis*, *T. tomentosum* e *T. virens*), obtidos a partir de solo em estudos anteriores, estando depositadas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa

Maria. Quanto ao patógeno, foi selecionado um isolado representante de cada espécie, identificadas no capítulo 2 (*C. nymphaeae*, *C. fiorinae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* e *C. karstii*).

Os testes demonstraram que todas as espécies de *Trichoderma* spp. testadas apresentaram efeito antagonista frente ao patógeno *Colletotrichum* spp., as quais inibiram o crescimento a partir do terceiro dia de confronto direto. Entretanto, *T. virens* e *T. tomentosum* foram as espécies com maior capacidade antagônica à *Colletotrichum* spp. in vitro.

Os testes de confronto direto são realizados primeiramente in vitro, objetivando a seleção de isolados mais promissores para o biocontrole de um determinado agente patogênico. Posteriormente, testes mais amplos em casa de vegetação ou em campo (in vivo) buscam avaliar sua efetividade inseridos em patossistemas, onde podem expressar seus diversos mecanismos de ação, diretamente sobre o patógeno, como também, sobre a planta, pela indução a resistência e pelo equilíbrio da microbiologia associada.

Por fim, espera-se que este estudo de caracterização do patossistema *Colletotrichum* spp. x noqueira-pecã, no Estado do Rio Grande do Sul, da variabilidade de genótipos de noqueira-pecã, a busca por fontes de resistência para antracnose, bem como de seleção de agentes de biocontrole, possa nortear a criação de estratégias de manejo de doenças para a cultura, auxiliando no desenvolvimento da pecanicultura Brasileira.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo foram identificadas seis espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul, sendo elas *C. nymphaeae*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. kahawae* e *C. karstii*. Contudo, a espécie *C. nymphaeae* foi considerada a mais agressiva nos testes de patogenicidade, tanto em frutos como em folhas e com maior incidência entre os isolados identificados, indicando ser uma espécie preponderante associada à antracnose em noqueira-pecã no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Destacamos a necessidade de realização de estudos sobre a epidemiologia desta doença em pomares de noqueira-pecã no sul do Brasil, visto as condições climáticas poderem favorecer o desenvolvimento do patógeno.

A caracterização de acessos de noqueira-pecã cultivados no Estado do Rio Grande do Sul mostrou que há uma ampla diversidade morfológica, química e genética na espécie. Essas diferenças representam uma fonte importante de variação genética e podem ser exploradas para melhorar o seu cultivo. Desta forma, salienta-se a necessidade urgente de criar meios para conservação desse germoplasma diverso e adaptado as condições sul brasileiras.

A resistência genética dos genótipos de noqueira-pecã, a *Colletotrichum* spp. manifestou-se de forma variável, sendo influenciada tanto por características do hospedeiro (genótipos) quanto do patógeno associado, entretanto, os frutos mostraram ser mais suscetíveis que os folíolos. Quatro genótipos apresentaram alta resistência à antracnose (63, 47, 29 e 56), podendo servir como fontes de resistência para estudos futuros envolvendo o melhoramento para resistência a antracnose. Os marcadores microssatélites nucleares e plastidiais não agruparam os genótipos de acordo com sua sensibilidade a *Colletotrichum* spp. uma vez que não houve correlação entre as características de sensibilidade com nenhum marcador microssatélite específico. Contudo, os índices de diversidade estimados demonstram moderada a alta variabilidade genética no grupo de genótipos avaliados.

No teste de biocontrole todas as espécies de *Trichoderma* spp. apresentaram potencial antagonista à *Colletotrichum* spp., com destaque para *T. virens* e *T. tomentosum*. É fundamental a realização de testes complementares in vivo com as espécies *T. virens* e *T. tomentosum* para avaliar a influência sobre o desenvolvimento da antracnose em pomares de noqueira-pecã.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C., ZAUZA, A.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Editora UFV. 2009. 500p.

ASSUNÇÃO, I.P., COELHO, R.S.B., LIMA, G.S. DE A., LIMA, J.A.S., TAVARES, S.C.C. de H. Reação de cultivares de cebola a isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados na região do Submédio São Francisco. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 205-209, 1999.

ATANASOV, A.G., SABHARANJAK, S.M., ZENGIN, G., MOLLICA, A., SZOSTAK, A., SIMIRGIOTIS, M., HUMINIECKI, Ł., HORBANCZUK O.K., MOHAMMAD, S., MOCAN, A. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. **Trends in food science & technology**, v. 71, p. 246-257, 2018.

AUNE, D., KEUM, N., GIOVANNUCCI, E., FADNES, L. T., BOFFETTA, P., GREENWOOD, D. C., TONSTAD, S., VATTEN, L.J., RIBOLI E., NORAT, T. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **BMC medicine**, v. 14, n. 1, p. 207, 2016.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.

BOCK, C.H., HOTCHKISS, M.W., SHAPIRO-ILAN, D.I., WELLS, L., BROCK, J., BRENNEMAN, T., MIZELL, R. Efficacy of Bordeaux mixture in reducing pecan scab in the southeastern USA. **Organic Agriculture**, v. 9, n. 2, p.189-198, 2019.

BRENNEMAN T. Pecan anthracnose and other unusual diseases: Learning from an unusual year. **Department of Plant Pathology University of Georgia**, Tifton-GA. 2010. Disponível em: <http://sepga.com/Presentation/WEB2010pres/T_Brenneman.pdf> Acesso em: fev, 2021.

BRENNEMAN, T.B.; REILLY, C.C. Recent occurrence of pecan anthracnose caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Disease**, v. 73, n. 9, 1989.

CAI, L., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W.J., WEIR, B.S., WALLER, J.M., 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**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CAMARGO L.E.A. Controle Genético. AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Agronômica Ceres, 2018a, v. 1, p. 229-238.

CAMARGO L.E.A. Genética da interação patógeno hospedeiro. AMORIM, L., REZENDE, J.A. M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Agronômica Ceres, 2018b, v. 1, p. 85-92.

CANNON, P.F., DAMM, U., JOHNSTON, P.R., WEIR, B. S. *Colletotrichum*—current status and future directions. **Studies in mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CONNER, P.J.; STEVENSON, K.L. Pathogenic variation of *Cladosporium caryigenum* isolates and corresponding differential resistance in pecan. **HortScience**, v. 39, n. 3, p. 553-557, 2004.

FANTINEL, V.S., MUNIZ, M.F.B., POLETTO, T., DUTRA, A.F., KRAHN, J.T., FAVARETTO, R.F., SARZI, J.S. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 3, p. 43-50, 2018.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GRAUKE, L.J., WOOD, B.W., HARRIS, M.K. Crop vulnerability: *Carya*. **HortScience**, v. 51, n. 6, p. 653-663, 2016.

GUGINSKI-PIVA, C.A., BOGO, A., GOMES, B.R., MENON, J.K., NODARI, R.O., WELTER, L.J. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *C. fructicola* associated with anthracnose symptoms of grape in Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 4, p. 405-413, 2018.

HADDAD, P.E., LEITE, L.G., LUCON, C.M.M., HARAKAVA, R. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140-1148, 2017.

HASSAN, O., JEON, J.Y., CHANG, T., SHIN, J.S., OH, N.K., LEE, Y.S. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. **Plant disease**, v. 102, n. 5, p. 1015-1024, 2018.

HU, M.J., GRABKE, A., SCHNABEL, G. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. **Plant disease**, v. 99, n. 6, p. 797-805, 2015.

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**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT (INC). **Nuts & Dried fruits statistical yearbook 2020 / 2021** (International Nut and Dried Fruit, Reus, Spain), 2021.

KLEIN, M.N., SILVA, A.C., LOPES, M.R., KUPPER, K.C. Application of microorganisms, alone or in combination, to control postbloom fruit drop in citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 6, p. 505-512, 2013.

LATHAM, A.J., BOWEN, K.L., CAMPBELL, H.L. Occurrence of *Glomerella cingulata* in pecan nut shucks and its association with fungal leaf scorch. **Plant disease**, v. 79, n. 2, p. 182-185, 1995.

LAZAROTTO, M., MUNIZ, M.F.B., POLETTO, T., DUTRA, C.B., BLUME, E., HARAKAWA, R., POLETTO, I. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot of *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1826-1826, 2012.

LIMA, J.S., MARTINS, M.V.V., SERRANO, L.A.L., NETO, F.D.C.V., VIANA, F.M.P., CARDOSO, J.E. Reação de clones de cajueiro-anão à antracnose e ao mofo-preto. **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. Comunicado técnico 247, 2019.

LIMA F. Embrapa lança documento com áreas recomendadas para cultivo da noqueira-pecã no sul do País, Embrapa clima temperado, Pelotas. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias>>. Acesso em: 25 fev. 2022.

MANTZ, G., MINHOT, R., MORRELLI, G., MAIALE, S. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing pecan anthracnose in Argentina. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, 2010.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997. 271 p.

MUNIR, M. MUNIR, M., AMSDEN, B., DIXON, E., VAILLANCOURT, L., GAUTHIER, N.W. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease**, v. 100, n. 11, p. 2194-2203, 2016.

NICOLETTI, S.S., POLETTO, I., BALDONI, D.B., PEREIRA, P.F., VEIT, G.H., POLETTO, T. *Trichoderma* spp. como antagonista biológico de *Lasiodiplodia subglobosa*, patógeno do cancro da noqueira-pecã. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.

NOOR, N.M.; ZAKARIA, L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. associated with chili anthracnose in peninsular Malaysia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 4, p. 961-973, 2018.

OLIVEIRA, E.S., VIANA, F.M.P., MARTINS, M.V.V. Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 340-350, 2016.

PAWAN, K. Studies on anthracnose of pecan nut caused by *Glomerella cingulata*. **Tese de Doutorado**. UHF, NAUNI, SOLAN. 2011.

PETERSON, J.K. *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch pecan. In: BURNS, R.M.; HONKALA, B.H. (Org.). **Silvics of North America**. Hardwoods. Washington: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, 1990. v. 2. p. 205-210.

POLETTI, T. MUNIZ, M.F.B. FANTINEL, V.S. QUEVEDO A. MARTELLO, L.S. STEFENON, V.M. POLETTI, I. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum nymphaeae*, agente causal da antracnose em noqueira-pecã. **Anais da 34ª Jornada acadêmica integrada da Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria, RS, 2019.

POLETTI, T., GONZATTO M.C., MUNIZ, M., BLUME, E., POLETTI, I., BRIOSO, P. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 1016, 2016.

POLETTI, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., MEZZOMO, R., BRAUN, U., VIDEIRA, S.I.R., R. HARAKAVA, POLETTI, I. First report of *Sirosporium diffusum* causing brown leaf spot on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 2, p. 381, 2017.

POLETTI, T., MUNIZ, M.F.B., BLUME, E., FANTINEL, S.V., REINIGER, L.R.S., STEFENON, V.M., HARAKAVA, R., BRIOSO, P.S.T., POLETTI, I. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3277-3277, 2019.

POLETTO, T., MUNIZ, M.F.B., FANTINEL, V.S., HARAKAVA, R., ROLIM, J.M. Characterization and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* associated with *Carya illinoensis* seedlings. **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 2, p. 1-9. 2020.

RAND, F.V. Some disease of pecans. **Journal of Agricultural Research**. v. 1, p. 303, 1914.

RIVERA-RANGEL, L.R., AGUILERA-CAMPOS, K.I., GARCÍA-TRIANA, A., AYALA-SOTO, J.G., CHAVEZ-FLORES, D., HERNÁNDEZ-OCHOA, L. Comparison of oil content and fatty acids profile of western schley, wichita, and native pecan nuts cultured in Chihuahua, Mexico. **Journal of lipids**, v. 2018, ID 4781345, 2018.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associados a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ROLIM, J.M., RABUSKE, J.E., SAVIAN, L.G., WALKER, C., SARZI, J.S., MUNIZ, MF. B., SILVA, J.C.P. First report of stem canker caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3067, 2020a.

ROLIM, J.M., SAVIAN, L.G., WALKER, C., BLUME, E., MUNIZ, M.F.B., POLETTO, T., SILVA, M. M., SILVA, E.L., RABUSKE J.E., SARZI, J.S. First Report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on pecan in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 6, p. 1870. 2020b.

ROLIM, J.M., WALKER, C., MEZZOMO, R., MUNIZ, M.F. Antagonism and Effect of Volatile Metabolites of *Trichoderma* spp. on *Cladosporium* spp. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, e20170594, 2019.

SHAMIM, M., KUMAR, P., KUMAR, R.R., KUMAR, M., KUMAR, RR., SINGH, K. N. Assessing fungal biodiversity using molecular markers. In: Singh, B.P., Gupta, V. K. **Molecular markers in mycology**. Springer International Publishing Switzerland, 2017. pp. 305-333.

SILVA, F.D., SILVA, F., FERNANDES, F., LEAL, L., POLETTO, I. Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da noqueira-pecã. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 109-118, 2013.

SPARKS, D. Adaptability of pecan as a species. **HortScience**, v. 40, n. 5, p.1175-1189, 2005.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB international, 1992. p. 1-26.

THOMPSON, T.E.; ROMBERG, L.D. Inheritance of heterodichogamy in pecan. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 6, p. 456-458, 1985.

USDA, Agricultural Research Service. **Food Data Central Search Results - Nut and Seed Products. 2019.** Disponível em: <<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170182/nutrients>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

VARELA, V., TAKATA, V., CAMUSSI, G., ZOPPOLO, R. Pecan: viability of a new crop in Uruguay. **Acta horticulturae**, v. 1070, p. 245-251, 2015.

WALKER, C., MUNIZ, M. F. B., MARTINS, R. R. O., MEZZOMO, R., ROLIM, J. M., BLUME, E. First report of species in the *Cladosporium cladosporioides* complex causing pecan leaf spot in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n. 2, p. 370, 2016.

WANG, Y.C., HAO, X.Y., WANG, L., XIAO, B., WANG, X.C., YANG, Y.J. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. **Scientific reports**, v. 6, p. 35287, 2016a.

WANG, W., YANG, M., KENFIELD, S.A., HU, F.B., STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C., FUCHS, C. S., GIOVANNUCCI, E.L., BAO, Y. Nut consumption and prostate cancer risk and mortality. **British journal of cancer**, v. 115, n. 3, p. 371-374, 2016b.

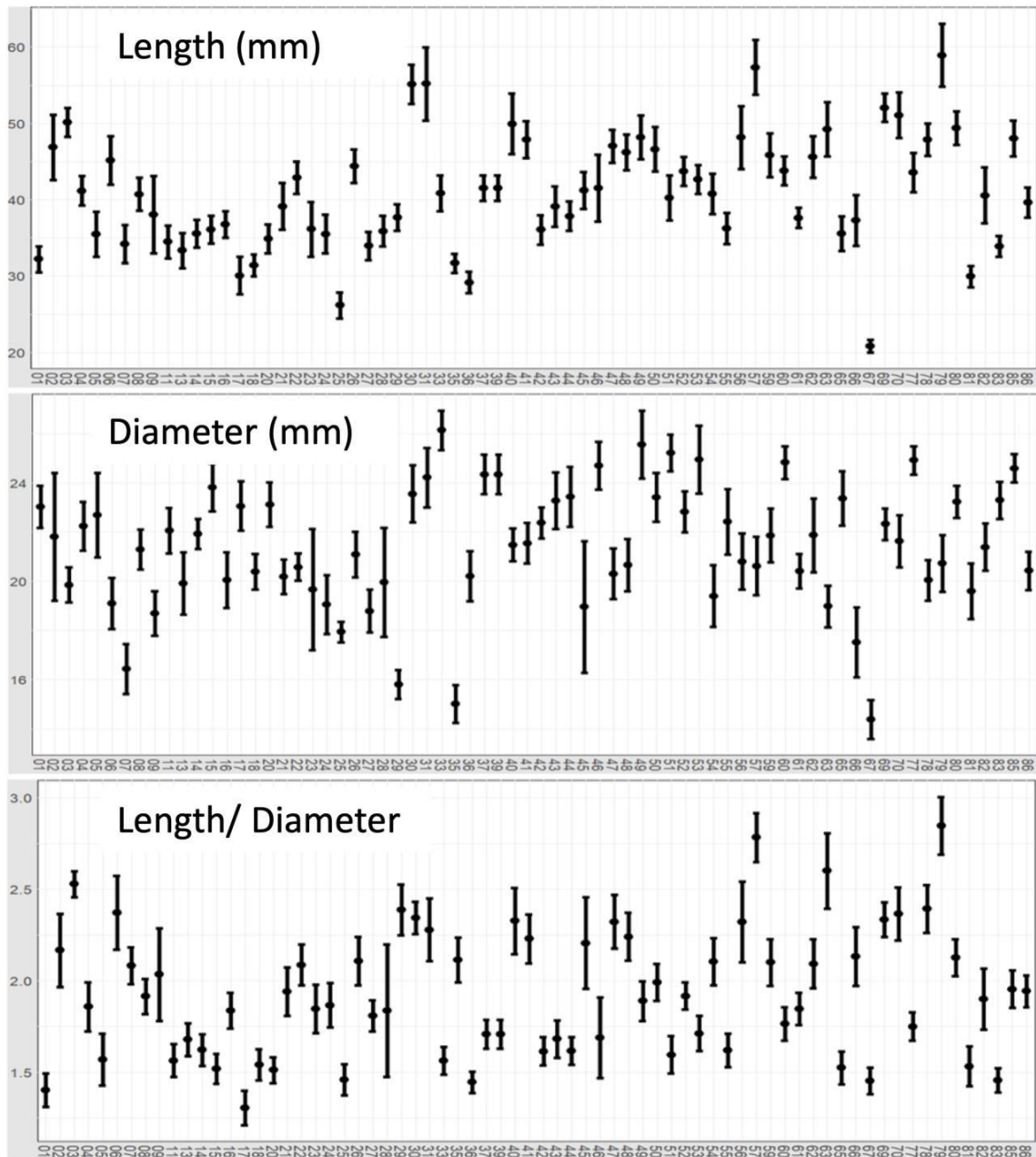
WEIR, B., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

ZHANG, C., YAO, X., REN, H., WANG, K., CHANG, J. Isolation and characterization of three chalcone synthase genes in pecan (*Carya illinoensis*). **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 236, 2019a.

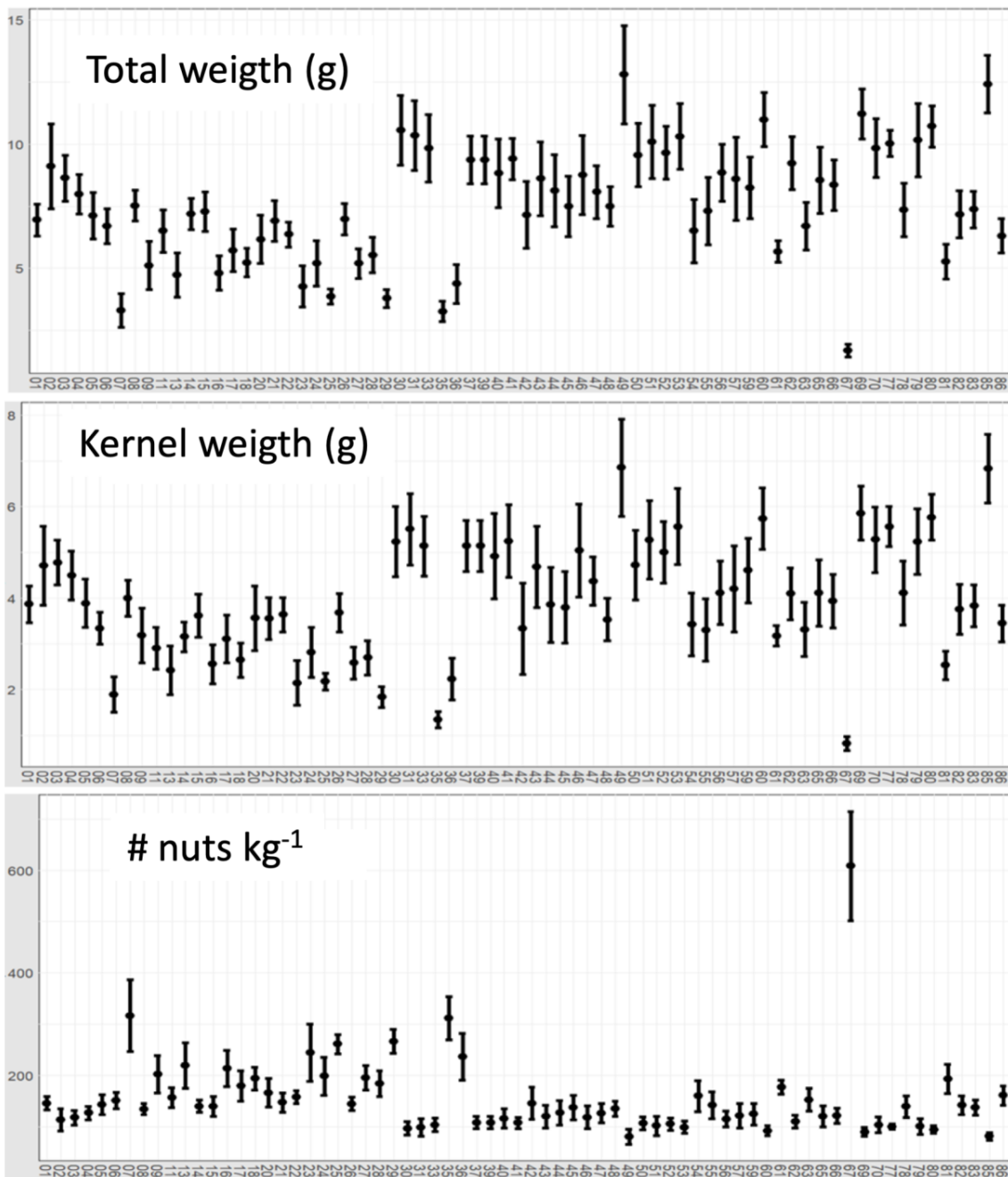
ZHANG, Y.B., MENG, K., SHU, J.P., ZHANG, W., WANG, H.J. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1432, 2019b.

10. APÊNDICES

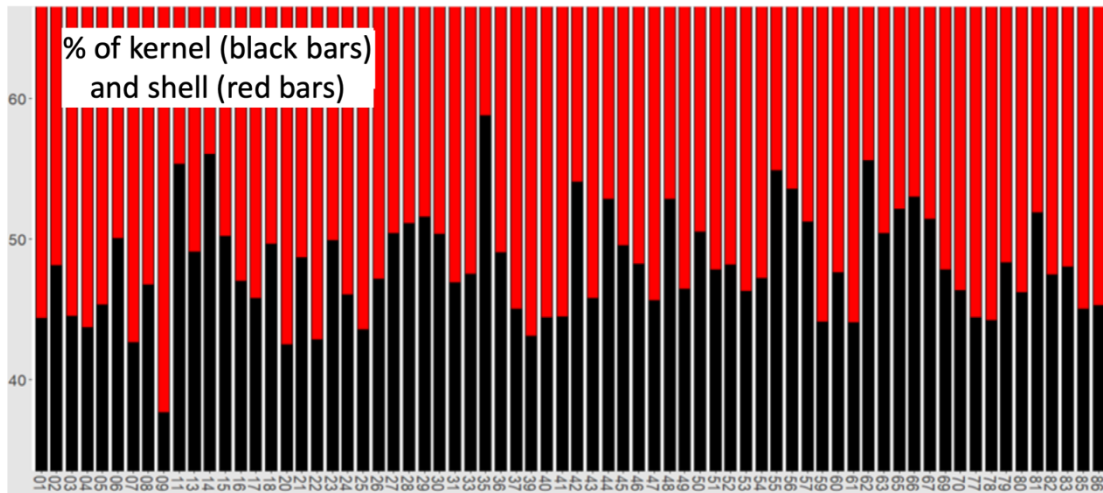
10.1 Comprimento (mm), diâmetro (mm) e comprimento / largura de frutos de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.



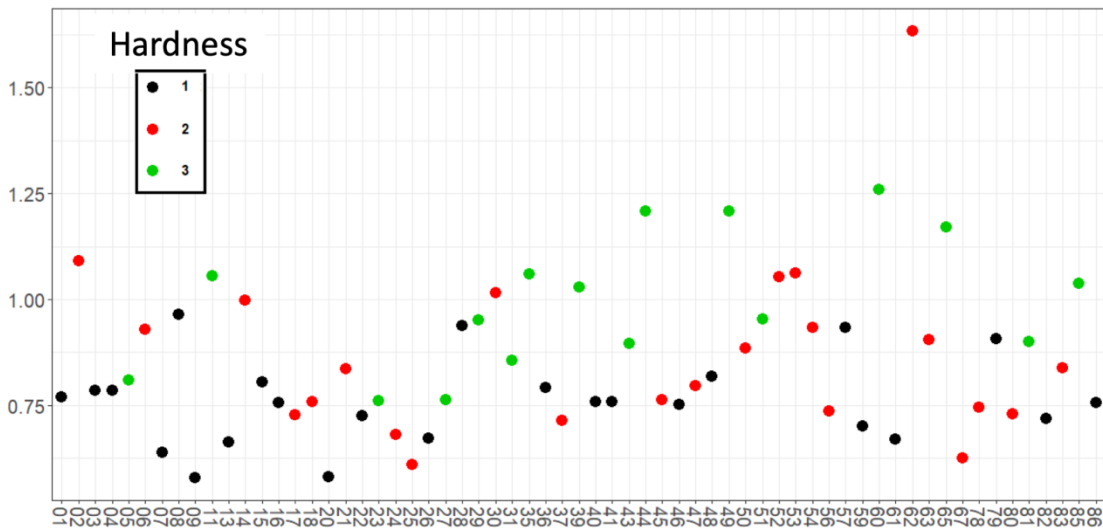
10.2 Peso total (g), peso da amêndoa (g) e número de frutos por quilograma de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.



10.3 Porcentagem de amêndoas (barra preta) e de casca (barra vermelha) de acessos de noqueira-pecã, utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.



10.4 Dificuldade de descascamento do fruto de acessos de noqueira-pecã: (preto difícil), (vermelho médio) e (verde fácil). Dados referentes as análises morfológicas do Capítulo 3.



10.5 Espessura da casca de fruto de acessos de noqueira-pecã utilizados nas análises morfológicas do Capítulo 3.

