



## CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Diaporthe/Phomopsis* OBTIDOS DE LOCAIS COM SUSPEITA DE CANCRO-DA-HASTE

FERREIRA, E.G.C.<sup>1</sup>; JANUARIO, N.C.G.<sup>2</sup>; BOWSER, N.D.<sup>3</sup>; GUERRA, W.D.<sup>4</sup>; CAMPOS, H.D.<sup>5</sup>; UTIAMADA, C.M.<sup>6</sup>; SEIXAS, C.D.S.<sup>7</sup>; SOARES, R.M.<sup>7</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, e-mail toon.ferreira@gmail.com; <sup>2</sup>Centro Universitário Filadélfia de Londrina – Unifil; <sup>3</sup>World Food Prize; <sup>4</sup>Aprosoja-MT; <sup>5</sup>Universidade de Rio Verde-GO; <sup>6</sup>Tagro-Tecnologia Agropecuária Ltda.; <sup>7</sup>Embrapa Soja.

A soja pode ser afetada por várias espécies de fungos do Complexo *Diaporthe/Phomopsis*: *Phomopsis longicolla* que causa a podridão da semente; *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* que causa a seca da haste e da vagem; *Diaporthe aspalathi* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) e *Diaporthe caulivora* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) que causam o cancro-da-haste. Dessas doenças, o cancro-da-haste é a mais importante em razão do seu poder destrutivo. O primeiro relato de *D. aspalathi* no país, foi em 1989 no Paraná (Yorinori et al., 1989), espalhando-se por outras regiões produtoras de soja nos anos seguintes, chegando a causar perdas de 80% a 100% em algumas áreas (Yorinori, 1996). Posteriormente, em 2006, ocorreu a detecção de *D. caulivora* no Rio Grande do Sul (Costamilan et al., 2008), no entanto, até o momento, essa espécie não foi relatada em outras regiões produtoras de soja no país.

O principal agente causal do cancro-da-haste no Brasil é *D. aspalathi*. Os sintomas iniciais da doença ocorrem 15 a 20 dias após o contato do fungo com a planta e caracterizam-se como pequenos pontos negros (1 mm a 2 mm de diâmetro) nas hastes. À medida que a doença avança, as lesões tornam-se castanho-avermelhas a negras, e aprofundam-se até atingir a medula, causando a necrose da mesma (Henning et al., 2014).

Atualmente, o cancro-da-haste causado por *D. aspalathi* está sob controle no Brasil, principalmente pelo emprego de cultivares resistentes. Apesar desse cenário, essa doença apresenta alta capacidade de danos se houver “quebra” da resistência. Com isso, é imprescindível o monitoramento constante da sua incidência nos campos de soja, a fim de acompanhar o surgimento e o estabelecimento de raças de *D. aspalathi* e *D. caulivora* que possam suplantar a resistência presente nas cultivares atuais. Recentemente, na safra 2016-2017, a ocorrência de plantas com sintomas em alguns estados produtores levantou a suspeita de que a doença pudesse estar ressurgindo e que poderia estar associada a *D. caulivora*.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar o agente causal de sintomas suspeitos em plantas de soja, na safra 2016-17, verificar sua patogenicidade, seguida da caracterização molecular dos isolados e da virulência frente às fontes de resistência à doença previamente descritas.

Amostras de plantas de soja coletadas, na safra 2016-2017, no Pará, no Mato Grosso, no Tocantins, em São Paulo e no Paraná foram trazidas ou enviadas ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, onde por isolamento indireto foram obtidos três isolados de *Phomopsis* do PA, 31 do MT, três do TO, um de SP e sete do PR. Também foram incluídos isolados obtidos de amostras de outras safras recebidas do Rio Grande do Sul (um isolado da safra 2013-2014 e um da 2015-2016); do Paraná (dois da safra 2015-2016) e do Mato Grosso (um da safra 2015-2016). Foram recebidos e incluídos dois isolados de Goiás (da safra 2016-2017) e um do Paraná (de 2005), totalizando 53 isolados caracterizados neste trabalho. Como controle foram incluídos cinco isolados da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES) e identificados como pertencentes ao Complexo



*Diaporthe/Phomopsis* (*Phomopsis longicolla*, *D. aspalathi*, *D. caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae* e *D. phaseolorum*).

O teste de patogenicidade foi feito inoculando os isolados nas cultivares BR 23 (padrão de suscetibilidade a *D. aspalathi*) e FT Estrela (padrão de suscetibilidade a *D. caulivora*). O método de inoculação utilizado foi o do palito colonizado com micélio do fungo. As plantas cultivadas em vasos (dois vasos com 10 plantas por isolado) em casa de vegetação foram inoculadas 12 dias após a semeadura. No teste com a BR 23, a avaliação foi feita 15 dias após a inoculação verificando o número de plantas infectadas e de plantas mortas. No teste com a FT Estrela, a avaliação foi feita 22 dias após a inoculação. Para a identificação molecular, foram obtidas culturas de ponta de hifas dos isolados, posteriormente cultivados em meio líquido batata dextrose (BD) para obtenção de micélio para extração de DNA. O DNA das amostras foi extraído seguindo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Após isso, foi realizada a amplificação via PCR do fragmento correspondente as regiões ITS (ITS1-5, 8S-ITS2) usando os primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') conforme Costamilan et al. (2008). Por fim, procedeu-se a técnica de PCR-RFLP, conforme descrito por Zhang et al. (1997). Para isso, foi feita tanto a reação de digestão dos produtos de PCR com as enzimas de restrição *AluI* e *RsaI* (37 °C por 3 horas) e os produtos obtidos da digestão foram visualizados em gel de agarose (1,3%).

Com base nos resultados do PCR-RFLP, os isolados identificados como *D. aspalathi* foram avaliados quanto a sua virulência nos genótipos de soja diferenciadores para cancro-da-haste, sendo esses: cv. Tracy-M, portadora dos genes de resistência, *Rdm1/Rdm2*, linhagem D85-10404 (*Rdm1*), linhagem D85-10412 (*Rdm2*), cv. Crockett (*Rdm3*), cv. Dowling (*Rdm4*), cv. Hutcheson (*Rdm4/Rdm5*), PI 398469 (*Rdm?*) e os materiais suscetíveis, BR 23 e Essex. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, cada bloco contendo um vaso com 10 plantas por material/isolado.

No teste de patogenicidade, 22 isolados infectaram a cultivar BR 23 (16 isolados de *P. longicolla*, três de *D. phaseolorum/D. phaseolorum* var. *sojae* e três de *D. aspalathi*), mas nenhum dos 53 isolados testados foi patogênico à FT Estrela.

As análises moleculares baseadas nos fragmentos de restrição com a enzima *AluI* permitiu observar que a maioria dos isolados poderia ser *D. phaseolorum*, *D. phaseolorum* var. *sojae* e *P. longicolla*, uma vez que essa enzima é capaz de separar as espécies *D. aspalathi* e *D. caulivora*. Com isso, três isolados foram identificados como *D. aspalathi* (os dois de GO e o do PR de 2005) e nenhum isolado foi identificado como *D. caulivora*. Por meio da análise com a enzima *RsaI*, foi possível separar as espécies *P. longicolla* de *D. phaseolorum/D. phaseolorum* var. *sojae*. Assim, os demais isolados foram identificados como *Phomopsis longicolla* (31 isolados) e *D. phaseolorum/D. phaseolorum* var. *sojae* (19).

As análises de virulência dos três isolados de *D. aspalathi* nos materiais diferenciadores revelaram que um dos isolados de GO e o isolado do PR (de 2005) foram virulentos para as linhagens D85-10404 e D85-10412, e para a cv. Dowling, concluindo-se que esses isolados já são capazes de suplantam a resistência dos genes, *Rdm1* e *Rdm2* quando presentes separadamente nas linhagens, e *Rdm4* presente na cv. Dowling. O outro isolado de GO também foi patogênico para a linhagem D85-10404 e para a cv. Dowling. Todos os isolados de *D. aspalathi* foram patogênicos aos materiais suscetíveis (BR 23 e Essex).

A suspeita de que *D. caulivora* fosse responsável pelos sintomas detectados não se confirmou com base no conjunto de amostras avaliado nesse trabalho. Tal conclusão foi evidenciada tanto pela caracterização molecular, que não identificou nenhum isolado dessa espécie, quanto pelo teste de patogenicidade com o padrão suscetível para a mesma (FT Estrela). Recentemente, Brumer (2017) caracterizou



uma coleção de isolados de *D. aspalathi* molecularmente por PCR-RFLP, e posteriormente por sequenciamento da região ITS e obteve total correlação na identificação dos isolados entre as duas técnicas, demonstrando robustez da discriminação das espécies do complexo pela digestão da região do gene ITS com as enzimas de restrição *AluI* e *RsaI* proposta por Zhang et al. (1998).

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que isolados de *D. aspalathi* presentes nas lavouras de soja são capazes de suplantar a resistência dos genes *Rdm1*, *Rdm2* e *Rdm4*, revelando a importância dos estudos de variabilidade genética do patógeno e de monitoramento de possíveis novos focos da doença, que podem ser um reflexo direto do surgimento de novas raças do patógeno. Tais estudos são essenciais aos programas de melhoramento, seja pela identificação de novas fontes de resistência, seja pelo direcionamento de suas estratégias quanto aos genes alvo a serem introduzidos nas cultivares, garantindo que a resistência a essa importante doença sempre esteja presente nas cultivares lançadas no mercado brasileiro.

#### Referências

- BRUMER, B. B.; LOPES-CAITAR, V. S.; CHICOWSKI, A. S.; BELOTI, J. D.; MARIN, S. R. R.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Morphological and molecular characterization of *Diaporthe aspalathi* isolates and reaction of soybean genotypes to stem canker. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 6., 2017, Ouro Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
- COSTAMILAN, L. M.; YORINORI, J. T.; ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; BINNECK, E.; ARAÚJO, M. R.; CARBONARI, J. A. First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 381-385, 2008.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p. il. color. (Embrapa Soja. Documentos, 256).
- YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja**: epidemiologia e controle. Londrina: Embrapa Soja, 1996. 75 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 14).
- YORINORI, J. T.; ALMEIDA, A. M. R.; HOMECHIN, M.; MIRANDA, L. C.; KIIHL, R. A. S.; POLA, J. N. Epifítia do cancro da haste da soja nos municípios de Castro, Palmeira, Ponta Grossa e Tibagi no Paraná e Rondonópolis, no Mato Grosso, na safra de 1989/89. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 5, 1989, Campo Grande. **Resumos...** Londrina: Embrapa-CNPSO, 1989. p. 22-23.
- ZHANG, A. W.; HARTMAN, G. L.; RICCONI, L.; CHEN, W. D.; MA, R. Z.; PEDERSEN, W. L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. **Plant Disease**, v. 81, p. 1143-1149, 1997.