

Patogenicidade de isolados de *Glomerella Colletotrichum* associados à soja

JANUARIO, N. C. G.¹; ALMEIDA, A. M. R.²; HENNING, A. A.²; SEIXAS, C. D. S.²

¹ Unifil, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, nathguize_@hotmail.com; ² Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp., é uma das doenças que podem limitar o rendimento da cultura da soja. No Brasil duas espécies foram associadas à doença, *Colletotrichum truncatum* (Rogério et al. 2017) e *C. cliviae* (Barbieri et al., 2017). Mas há outras espécies relatadas associadas à antracnose, *C. coccodes* (Riccioni et al., 1998), *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) (Chen et al., 2006), *C. incanum* (Yang et al., 2014), *C. capsici* (Ghosh et al., 2016), *C. destructivum* (teleomorfo *G. glycines*), *C. graminicola* (teleomorfo *G. graminicola*), *C. chlorophyti* (Yang; Hartman, 2015).

O fungo pode sobreviver em restos de cultura e sementes. Sementes infectadas podem dar origem a plântulas com necrose nos cotilédones. Essa necrose pode se estender para o hipocótilo e resultar em tombamento pré- ou pós-emergência. Várias partes das plantas podem ser infectadas (haste, pecíolos, folíolos, vagens) em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas. Pode ocorrer queda de vagens e/ou deterioração das sementes. Vagens infectadas no início da formação [estádios R3-R4 (Fehr; Caviness, 1981)] ficam castanho-escuras a negras e retorcidas. Se infectadas em estádios mais avançados podem ocorrer lesões escuras nas vagens. Em períodos de alta umidade podem ser visualizadas pontuações negras que são as frutificações do fungo. Nas hastes e nas nervuras dos folíolos podem ocorrer lesões negras e deprimidas (Godoy et al., 2016).

A doença é favorecida por condições de temperatura e umidade altas. Ocorre mais comumente nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (Henning et al., 2014), mas tem sido comum produtores da região Sul do Brasil citarem essa doença como uma das mais comuns em suas lavouras e realizarem aplicações de fungicidas para controle.

Em amostras de hastes, folhas e/ou vagens, coletadas e recebidas pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, com ou sem sintomas que poderiam ser atribuídos a antracnose, tem sido frequente a obtenção de isolados de *Colletotrichum* ou de *Glomerella* (teleomorfo de *Colletotrichum*), o que indicou a necessidade de caracterização e identificação desses isolados, para verificar se há a ocorrência de espécies diferentes daquelas já relatadas associadas à antracnose na soja.

O objetivo deste trabalho foi verificar a patogenicidade (capacidade de causar doença) dos isolados de *Glomerella/Colletotrichum* obtidas de amostras de plantas de soja, em várias safras e de diversos locais.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido em laboratório e casa de vegetação da Equipe de Fitopatologia, na Embrapa Soja, em Londrina-PR, no período de outubro de 2017 a maio de 2018.

Para esse estudo foram utilizados 58 isolados de *Glomerella/Colletotrichum* depositados na Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), obtidos de amostras de hastes, folhas e/ou vagens de soja de vários estados (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Maranhão, Tocantins, Pará, Roraima), com ou sem sintomas típicos da doença. Também foram incluídos quatro isolados já identificados por Rogério et al. (2017) como *C. truncatum* [CMES 286 (MT), CMES 1055 (PR), CMES 1075 (PA) e CMES 1080 (RR)], dois de *C. cliviae* [CMES 1900 (MT) e CMES 1901 (MT)] (Barbieri et al., 2017) e dois de *C. sublineola* (CMES 1906 e CMES 1907 ambos de MG), num total de 66 isolados. Os dois isolados de *C. sublineola*, obtidos de sorgo, foram cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo.

Todos os isolados foram testados quanto à patogenicidade à soja. O método utilizado foi baseado no proposto por Manandhar et al. (1988) e por Yang e Hartman (2015). Os 66 isolados foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) para preparação de inóculo. A cultivar Potência RR foi semeada em vasos, com seis sementes por vaso, deixando três plantas por vaso. Quando as plantas atingiram o estágio V2-V3 [(primeira folha trifoliolada com-

pletamente desenvolvida - segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida (Fehr; Caviness, 1981] foram inoculadas com suspensão de esporos e/ou micélio dos isolados. Cada isolado foi inoculado em plantas de quatro vasos. Por causa da diferença na produção de esporos entre os isolados, nesse teste a concentração de esporos foi determinada, mas não foi padronizada. O isolado CMES 1906 (*Colletotrichum sublineolum*) não produziu esporos, então a suspensão foi preparada a partir do micélio. A suspensão de esporos, de outros 16 isolados, teve concentração menor que 3×10^6 esporos por mL, concentração mínima usada por Manandhar et al. (1988), entre eles os dois isolados de *C. cliviae* (CMES 1900, CMES 1901), um isolado de *C. truncatum* (CMES 286) e um isolado de *C. sublineolum* (CMES 1907).

Após a inoculação, os vasos com as plantas inoculadas foram colocados em câmara úmida por 72 horas, utilizando sacos plásticos transparentes, umedecidos internamente, para envolver os vasos e assim favorecer a infecção. A temperatura da casa de vegetação foi ajustada para se manter entre 18 °C (mínima) e 28 °C (máxima). Após as 72 horas, os sacos plásticos foram retirados e foi mantida nebulização por 30 segundos, de quatro em quatro horas.

A avaliação foi feita observando as plantas a partir do quinto dia após a inoculação e registrando quando do aparecimento de lesões na haste, no pecíolo e/ou na nervura dos trifólios. Aos 70 dias após a inoculação haste e pecíolo de nove plantas inoculadas com cada isolado, com ou sem sintomas, foram coletadas e levadas para o laboratório onde foi realizado isolamento indireto para recuperar o fungo.

As sementes das três plantas restantes inoculadas com cada isolado foram coletadas para análise, a fim de verificar a presença do fungo. Para isso utilizou-se o método do papel de filtro (Blotter Test), com 200 sementes de cada amostra. As sementes foram distribuídas, colocando-se 20 sementes, por caixa plástica (gerbox), desinfestada com hipoclorito de sódio a 1,05%, contendo quatro folhas de papel de filtro umedecidas com água autoclavada. Os gerbox contendo as sementes foram colocados em câmara de incubação a 20 °C \pm 2 °C. Após sete dias foi feita a leitura, com auxílio de microscópio estereoscópio, observando cada semente e registrando a presença de *Colletotrichum*.

Resultados e Discussão

Os isolados, juntamente com sua procedência, ano de coleta e os resultados obtidos no teste de patogenicidade, no reisolamento e na análise de sementes estão apresentados na Tabela 1. O período para observação dos primeiros sintomas foi nove dias, diferente do observado por Manandhar et al. (1988) e por Yang e Hartman (2015). Nos dois trabalhos, sintomas severos, e até morte de plantas foram observados já aos três dias após a inoculação. A diferença no método em relação ao trabalho de Manandhar et al. (1988) foi a maneira de fazer a câmara úmida. Os autores utilizaram câmara de nebulização por 10 horas com ciclos por 15 minutos a cada hora, e no presente trabalho foi feita com saco plástico. O objetivo da câmara úmida é favorecer a germinação dos esporos do fungo e a infecção do hospedeiro e ambos os métodos são indicados para isso (Alfenas et al., 2016). A concentração do inóculo também foi diferente, nos dois trabalhos a concentração mínima foi 3×10^6 esporos mL^{-1} e nesse trabalho não foi possível padronizar. Mas, considerando que mesmo o isolado que produziu mais esporos (CMES 938, 10×10^6 esporos mL^{-1}) provocou sintomas após 16 dias, a concentração da suspensão não parece ter sido um fator limitante. De qualquer maneira, o objetivo era verificar a capacidade dos isolados de infectar as plantas de soja, portanto, mesmo com essas diferenças foi possível alcançar o objetivo.

Dos 66 isolados, a maioria, 55 isolados (83,3%), causou sintomas, incluindo os quatro isolados já identificados como *C. truncatum* (CMES 286, CMES 1055, CMES 1075, CMES 1080), os dois isolados de *C. cliviae* (CMES 1900 e CMES 1901) (Barbieri et al., 2017) e os dois isolados de *C. sublineolum* (CMES 1906 e CMES 1907), esses dois últimos obtidos de sorgo. Porém, os isolados CMES 286, CMES 1075 (*C. truncatum*) e CMES 1906 (*C. sublineolum*), apesar de terem causado sintomas, não foram recuperados na tentativa de reisolamento, mas foram detectados nas sementes e o CMES 1901 foi reisolado, mas não detectado nas sementes.

Tabela 1. Código dos isolados utilizados, município, estado e ano da coleta; resultado da patogenicidade, do reisolamento e da análise da semente para os isolados de *Glomerella/Colletotrichum* avaliados.

Isolado	Município	Estado	Ano da Coleta	Sintoma	Reisolamento	Presença na semente (%)
CMES 286-Ct1,4	Rondonópolis	MT	1992	S6	n7	4,5
CMES 929	Cascavel	PR	2011	S	S	2,5
CMES 934	Rolândia	PR	2011	S	S	1,5
CMES 935	Londrina	PR	2011	S	n	2,9
CMES 938	Bela Vista do Paraíso	PR	2011	S	S	2,5
CMES 991	Jataizinho	PR	2012	S	S	1,9
CMES 1055-Ct1	Londrina	PR		S	S	0,5
CMES 1075-Ct1	Santarém	PA		S	n	3,5
CMES 1080-Ct1	Boa Vista	RR		S	S	1,9
CMES 1167	Borrazópolis	PR	2013	n	n	0,0
CMES 1168	Borrazópolis	PR	2013	n	n	0,0
CMES 11704	Guapirama	PR	2013	n	S	0,0
CMES 1172	Nantes	SP	2013	n	S	0,0
CMES 1176	Londrina	PR	2013	S	S	0,0
CMES 1177	Londrina	PR	2013	S	S	1,7
CMES 1179	Bela Vista do Paraíso	PR	2013	S	S	0,0
CMES 1180	São Gotardo	MG		S	S	0,0
CMES 11814	Chapadão do Sul	MS	2006	n	n	1,0
CMES 1183	Londrina	PR		S	n	2,0
CMES 1184	Taquarituba	SP		S	S	0,5
CMES 11904	Lucas do Rio Verde	MT	2013	S	n	2,0
CMES 1191	Lucas do Rio Verde	MT	2013	S	S	1,5
CMES 1433	Bonfim	RR	2013	S	n	1,0
CMES 1468	Sinop	MT	2014	S	n	1,5
CMES 1626	Riachão	MA	2016	S	S	1,0
CMES 1630	Cambé	PR	2016	S	S	0,0
CMES 1631	Planaltina	DF	2016	S	S	0,0
CMES 1632	Planaltina	DF	2016	S	S	1,3

continua...

continuação

CMES 16354	Campo Mourão	PR	2016	S	n	1,0
CMES 1636	Planaltina	DF	2016	S	S	1,0
CMES 1637	Planaltina	DF	2016	S	S	1,0
CMES 1638	Cornélio Pro- cópio	PR	2016	n	n	1,5
CMES 1639	Planaltina	DF	2016	S	S	0,5
CMES 1647	Planaltina	DF	2016	S	S	1,5
CMES 1648	Cambé	PR	2016	S	S	1,5
CMES 16494	São Jorge de Ivaí	PR	2016	n	S	1,5
CMES 1660	Cambé	PR	2016	S	n	1,0
CMES 1791	Planaltina	DF	2016	S	S	0,0
CMES 1794	Maracaju	MS	2016	S	S	1,4
CMES 18044	Cornélio Pro- cópio	PR	2016	S	n	0,5
CMES 1809	Cândido Mota	SP	2017	n	S	0,5
CMES 1810	Itaberá	SP	2017	S	S	1,0
CMES 1812	Astorga	PR	2017	S	S	1,5
CMES 1813	Astorga	PR	2017	S	S	1,0
CMES 18144	Astorga	PR	2017	S	n	2,5
CMES 1815	Astorga	PR	2017	n	n	0,0
CMES 1819	Astorga	PR	2017	S	n	2,0
CMES 1824	Iguaraçu	PR	2017	S	S	1,0
CMES 1862	Iguaraçu	PR	2017	S	n	5,5
CMES 1864	Cascavel	PR	2017	S	n	1,0
CMES 18654	Laranjeiras do Sul	PR	2017	n	n	1,5
CMES 1872	Paragominas	PA	2017	n	S	2,0
CMES 18884	Ponta Porã	MS	2017	n	n	1,0
CMES 1889	Nova Mutum	MT	2017	S	S	2,5
CMES 1893	Palmas	TO	2017	n	S	0,0
CMES 1894	Palmas	TO	2017	S	n	1,0
CMES 18954	Palmas	TO	2017	S	S	1,5
CMES 1896	Palmas	TO	2017	S	n	0,5
CMES 1897	Palmas	TO	2017	S	n	5,5
CMES 18984	Palmas	TO	2017	S	n	3,5
CMES 1899	Marmealeiro	PR	2017	n	n	1,5

continua...

continuação

CMES 1900- Cc2,4	Peixoto de Azevedo	MT	2014	S	S	0,5
CMES 1901- Cc2,4	Americana do Norte	MT	2013	S	S	0,0
CMES 1906- Cs3,4,5	Sete Lagoas (sorgo)	MG	2014	S	n	1,0
CMES 1907- Cs3,4	Sete Lagoas (sorgo)	MG	2014	S	S	2,5

¹*Colletotrichum truncatum*; ²*C. cliviae*; ³*C. sublineolum*; ⁴Concentração da suspensão com menos de 30.000 esporos mL⁻¹; ⁵Suspensão preparada com micélio, ausência de esporos; ⁶S: presença de sintoma; ⁷n: ausência de sintoma.

Entre os 11 isolados restantes, que não causaram sintomas, três foram recuperados no reisolamento e detectados nas sementes; cinco foram apenas detectados nas sementes. O teste deve ser repetido, mas de qualquer forma, há relatos de infecção de folhas, vagens e hastes sem que a planta mostre sintomas (Yang; Hartman, 2015).

Apenas três isolados não provocaram sintomas visíveis, não foram recuperados por reisolamento e nem detectados nas sementes (CMES 1167, CMES 1168 e CMES 1815). A ausência de sintomas e do fungo na haste, pecíolo e semente pode ser devida ao fato do isolado não ser, de fato, patogênico à soja. Nem todas as espécies de *Colletotrichum* são fitopatogênicas (Cannon et al., 2012).

Embora *C. sublineolum* tenha sido obtido de amostras de sorgo, infectou a soja também. Essa situação não é incomum. A infecção da soja por espécies que causam antracnose em outras plantas tem sido relatada como já mencionado (Riccioni et al., 1998; Chen et al., 2006; Yang et al., 2014; Ghosh et al., 2016).

As próximas etapas do trabalho serão a repetição do teste de patogenicidade, utilizando um método de inoculação que independa da produção de esporos; a caracterização morfológica dos isolados e a identificação dos isolados por técnica molecular.

Conclusão

A maioria dos isolados foi patogênica à soja, mostrando que o fungo está presente ainda que sintomas de antracnose não estejam sendo visualizados.

Referências

- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; ALFENAS, R. F. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.) **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p.123-143.
- BARBIERI, M. C. G.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; MORAES, S. R. G.; BONALDO, S. M.; ROGÉRIO, F.; LINHARES, R. R.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. First report of causing anthracnose on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-16-0963-PDN>>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- 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.
- CHEN, L. S.; CHU, C.; LIU, C. D.; CHEN, R. S.; TSAY, J. G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 654-662, 2006.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1981. 12 p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).
- GHOSH, R.; BHADRA, S.; BANDYOPADHYAY, M. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum capsici* causing leafspot of soybean. **Tropical Plant Research**, v. 3, n. 3, p. 481-490, 2016.
- GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2. p. 657-675.
- 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. (Embrapa Soja. Documentos, 256).
- MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Soybean germ plasm evaluation for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 72, p. 56-59, 1988.
- RICCIONI, L.; CONCA, G.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum coccodes* on soybean in the United States. **Plant Disease**, v. 82, p. 959, 1998.
- ROGÉRIO, F.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA, N. S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 402-415, 2017.

YANG, H. C.; HARTMAN, G. L. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 99, p. 143-148, 2015.

YANG, H. C.; HARTMAN, G.L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5. ed. Saint Paul: APS Press, 2015. p. 31-34.

YANG, H. C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, p. 32-42, 2014.