



# XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

## 20 a 22 de fevereiro de 2018

### Marília - SP

#### EFEITO DO TIPO DE INÓCULO E PERÍODO DE MOLHAMENTO NA SEVERIDADE DA ANTRACNOSE EM SOJA

Wesler Luiz Marcelino<sup>1</sup>, Sérgio Florentino Pascholati<sup>1</sup>, Francine Falcão de Macedo<sup>2</sup>, Tainara Menegassi<sup>3</sup>, Mônica Mieko Nakanishi Tamura<sup>1</sup>, Suzani Maria Rodrigues da Paz<sup>1</sup>, Samuel de Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Departamento de Nematologia e Fitopatologia, Piracicaba-SP. [sfpascho@usp.br](mailto:sfpascho@usp.br); <sup>2</sup> Universidade Federal da Fronteira do Sul – Campus Erechim; <sup>3</sup> Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná – UNICENTRO.

**RESUMO** - Avaliou-se a agressividade de três isolados, tempo de molhamento e tipo de inoculo para o melhor desenvolvimento do fungo *Colletotrichum truncatum* em soja, agente causal da antracnose. Foi utilizada uma escala de notas de 0 a 5 (correspondendo a 0; 10; 35; 65; 90 e mais de 100% de área foliar afetada) para a avaliação da severidade da doença. As plantas foram inoculadas em estágio vegetativo VI/V2 e avaliadas 10 dias após a inoculação. Foi testada a agressividade dos isolados CMES 1034, CMES 1080 e CMES 1059, utilizando-se suspensão micelial ou suspensão de esporos (conídios). Além disso, os tratamentos foram submetidos à três diferentes tempos de molhamento, sendo 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). Os resultados mostraram que o isolado CMES 1059 apresentou o maior grau de agressividade, seguido pelos isolados CMES 1080 e CMES 1034. O melhor tempo de molhamento para o desenvolvimento da doença foi de 72 hai e a suspensão micelial no desenvolvimento da doença. Diante dos resultados pode-se concluir que a suspensão micelial e uma condição de molhamento de 72 horas se mostram como as mais adequadas para o desenvolvimento da doença.

**Palavras-chave:** *C. truncatum*, Métodos de inoculação, Severidade

### INTRODUÇÃO

A antracnose da soja, na maioria das vezes associada ao fungo *C. truncatum*, é uma doença fúngica que ocorre em todas as áreas de cultivo de soja do mundo, sendo as plantas infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento (MANANDHAR & HARTMAN, 1999). Os principais sintomas causados pelo patógeno é necrose dos pecíolos, manchas nas folhas, hastes, vagens e morte de plântulas. O fungo, geralmente presente nas sementes ou em restos de cultura, se desenvolve de forma latente, podendo ou não expressar-se até o final do ciclo. Entretanto, se houver ambiente favorável, as partes infectadas ficam cobertas por estruturas de frutificação do fungo (ALMEIDA, 2016).



# XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

## 20 a 22 de fevereiro de 2018

### Marília - SP

O conídio produzido em acérvulos é utilizado em inoculações para realização de bioensaios. Contudo, Yang & Hartman (2015) mostraram que a inoculação com suspensão micelial é mais vantajosa do que outras preparações. Além disso, Alvarado-Capó et al. (2003) indicaram que os sintomas observados em bananeiras, após a inoculação de *Mycosphaerella fijiensis* na forma de suspensão micelial, foram semelhantes aos registrados nas plantas no campo.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar métodos de inoculação, período de molhamento em câmara úmida e a agressividade de diferentes isolados de *C. truncatum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *C. truncatum* foram obtidos junto ao Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ – USP (isolado CMES 1059, CMES 1034 e CMES 1080) (ROGÉRIO et al., 2017), sendo mantidos em meio de cultivo do tipo BDA.

Para o preparo da suspensão micelial, após 14 dias de crescimento, seis discos de micélio de 4 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de 250 mL, onde foi adicionado 50 mL de meio batata dextrose (BD). Os frascos foram transferidos para mesa de agitação à 100 rpm e incubados por 5 dias sob temperatura de 24°C. A suspensão micelial foi transferida para tubos de 50 ml e centrifugada à 1.225 g por 20 min. Os *pellets* foram coletados, passados em gaze (para extrair o líquido resultante) e a massa do resíduo foi quantificada em balança analítica. Em seguida, foi adicionada água destilada autoclavada (para uma concentração final de 40mg/ml), sendo o material triturado com o auxílio de um liquidificador (duas vezes por 30 s em velocidade máxima).

A suspensão de esporos foi obtida utilizando-se colônias dos fungos com 14 dias de crescimento em meio BDA. Foi adicionado 10 ml de água destilada autoclavada sobre a colônia, e com o auxílio de uma alça de Drigalski, procedeu-se a liberação dos esporos. Utilizando-se um hemacitômetro, ajustou-se a concentração para  $1 \times 10^6$  conídios/ml.

Dezoito tratamentos, referentes a três isolados (1034, 1059 e 1080), dois tipos de inoculo (micelial e conídio) e três períodos de umidade (24, 48 e 72 h), foram arranjados em



# XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

## 20 a 22 de fevereiro de 2018

### Marília - SP

delineamento inteiramente casualizado, onde cada unidade experimental era constituída de 5 plantas.

Sementes do cultivar CD 254 RR (obtidas junto a COODETEC), foram semeadas em cinco vasos (1 L), onde cada vaso possuía uma planta, totalizando 90 vasos. As plantas foram mantidas em ambiente controlado a 25°C em casa de vegetação. Com 15 dias de crescimento (estádios V1/V2), as plantas foram inoculadas com os diferentes patógenos e preparações de inoculo até o ponto de escorrimento. Em seguida, as mesmas foram transferidas para câmara úmida, sob condições de umidade relativa acima de 90% e temperatura de 27°C, por 24, 48 e 72h após a inoculação, respectivamente. A severidade da doença foi avaliada 10 dias após a inoculação.

A severidade da doença foi baseada na avaliação visual das plantas inoculadas, utilizando-se uma escala de notas variando de 0 – 5, onde 0 = sem sintomas visíveis, 1 = 1 à 10% da planta com sintoma (principalmente necrose na nervura das folhas), 2 = 11 à 35% da planta com sintoma (principalmente necrose na folha e alguma necrose no pecíolo), 3 = 36 à 65% da planta com sintoma (principalmente necrose nas folhas, pecíolo e algumas necroses na haste), 4 = 66 à 90% da planta com sintoma (necrose extensiva nas folhas, pecíolos e hastes), 5 = 91 à 100% da planta com sintoma (necrose severa em todas as partes da planta ou planta morta) (YANG & HARTMAN, 2015).

Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey a 5%, utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

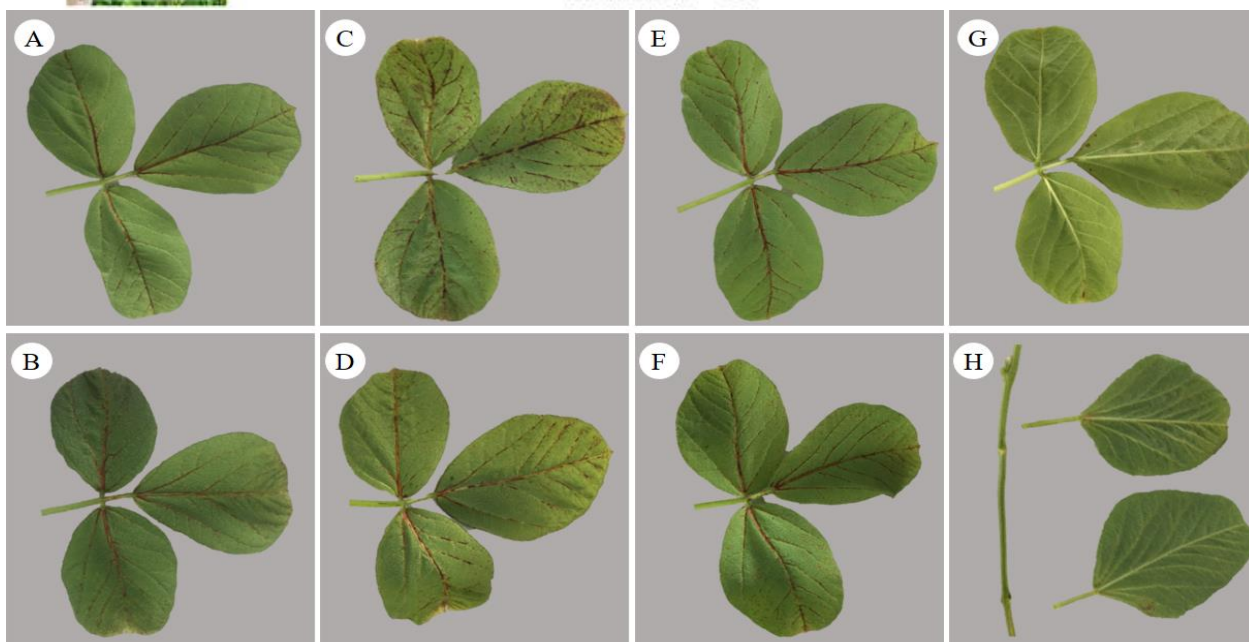
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados foram patogênicos em plântulas de soja (Figura 1), sendo que os resultados mostram que houve diferença na agressividade dos isolados, tempo de molhamento e tipo de inoculo (Tabela 1). Foi observado que o isolado 1059 apresentou maior agressividade nos diferentes tempos de molhamento, se diferenciando estatisticamente dos demais. O isolado 1034 apresentou o menor grau de agressividade, o que pode ser observado nos três tempos de molhamento. O isolado 1080 apresentou agressividade semelhante ao isolado 1059 quando a inoculação foi realizada através de suspensão de esporos, se diferenciando na suspensão micelial.



# XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018  
Marília - SP



**Figura 1.** Plantas de soja CD 254 RR avaliadas 10 dias após a inoculação e submetidas a 72 horas de molhamento. A) Isolado CMES 1034, suspensão micelial. B) Isolado CMES 1034, suspensão de esporos. C) Isolado CMES 1059, suspensão micelial. D) Isolado CMES 1059, suspensão de esporos. E) Isolado CMES 1080, suspensão micelial. F) Isolado CMES 1080, suspensão de esporos. G) Testemunha aspergida com água (trifólios). H) Testemunha aspergida com água (folhas unifoliadas e haste).

Rogério et al. (2017) também avaliaram a patogenicidade de isolados de *C. truncatum* inoculados em sementes (contato direto com o patógeno em meio de cultivo) e mudas (método do palito) e como resultado verificaram que o isolado CMES 1059 apresentou a maior agressividade, seguido pelos isolados CMES 1080 e CMS 1034, o que corrobora com os resultados do presente trabalho.

O período de incubação e a umidade são componentes importantes para muitos agentes patogênicos foliares, incluindo *Colletotrichum* spp. (HONG & HWANG, 1998). Os tempos de molhamento ocasionaram diferenças na severidade da doença nos diferentes tratamentos, sendo que aparentemente 72 horas foi o mais adequado para a máxima severidade com inoculo do tipo micelial (Tabela 1). Por sua vez, o tipo de inoculo micelial mostrou-se como o mais adequado para se demonstrar a agressividade em praticamente todos os tratamentos, destacando-se no tempo de molhamento de 72 horas. Em testes realizados por Yang & Hartman (2015), a utilização da suspensão micelial foi altamente eficiente no desenvolvimento de sintomas quando comparada com a suspensão de esporos, além do que os melhores tempos de molhamento foram



# XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

## 20 a 22 de fevereiro de 2018

### Marília - SP

48 e 72 horas após a inoculação, sendo a severidade maior quando as plantas foram submetidas à 72 horas de molhamento, com umidade relativa acima de 90%.

Os resultados mostram que o inoculo micelial proporcionou vantagens em relação a suspensão de esporos, na demonstração da agressividade do isolado e na facilidade de preparo do inoculo em grandes quantidades em culturas líquidas. Outros trabalhos mostraram benefícios em se utilizar suspensão micelial, como na infecção de *M. fijiensis* em bananeiras (DONZELLI & CHURCHILL, 2007).

**Tabela 1.** Efeito da severidade de antracnose em cultivar de soja CD 254 RR submetido a diferentes tipos de inóculo, isolados e tempo de umidade.

| Tipo de inóculo | Tempo de molhamento | Isolado | Média   |
|-----------------|---------------------|---------|---------|
| Conídio         | 24                  | 1059    | 3,4 a   |
| Micelial        | 24                  | 1059    | 3,0 ab  |
| Conídio         | 24                  | 1034    | 2,6 abc |
| Conídio         | 24                  | 1080    | 2,2 abc |
| Micelial        | 24                  | 1034    | 2,0 bc  |
| Micelial        | 24                  | 1080    | 1,6 c   |
| CV %            |                     |         | 26,66   |
| Tipo de inóculo | Tempo de molhamento | Isolado | Média   |
| Micelial        | 48                  | 1059    | 3,8 a   |
| Conidio         | 48                  | 1059    | 3,0 ab  |
| Micelial        | 48                  | 1080    | 3,0 ab  |
| Conidio         | 48                  | 1080    | 3,0 ab  |
| Conidio         | 48                  | 1034    | 2,6 b   |
| Micelial        | 48                  | 1034    | 2,0 b   |
| CV %            |                     |         | 19,91   |
| Tipo de inóculo | Tempo de molhamento | Isolado | Média   |
| Micelial        | 72                  | 1059    | 4,4 a   |
| Conidio         | 72                  | 1059    | 3,4 ab  |
| Micelial        | 72                  | 1080    | 3,4 ab  |
| Conidio         | 72                  | 1080    | 3,2 ab  |
| Micelial        | 72                  | 1034    | 2,6 b   |
| Conidio         | 72                  | 1034    | 2,6 b   |
| CV %            |                     |         | 27,09   |

<sup>1</sup>Notas de 0 a 5, correspondendo a 0; 10; 35; 65; 90 e mais de 100% de área foliar afetada





**XLI Congresso Paulista de Fitopatologia**  
20 a 22 de fevereiro de 2018  
Marília - SP  
CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o fungo *C. truncatum* necessitou de um período de molhamento de 72 horas para expressar o maior grau de agressividade, sendo que o isolado CMES 1059 se mostrou como o mais agressivo quando do uso da suspensão do tipo micelial.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds). **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 5a edição. volume 2. Ed. Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 2016. p. 642–664.

ALVARADO-CAPÓ, Y. et al. Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis* In: JACOME, L. et al., (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook: 2° International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases; 20-23 de maio de 2002; San Jose, Costa Rica. Montpellier: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain; 2003. p. 169–175.

DONZELLI, B. G. G.; CHURCHILL, A. C. L. A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. **Phytopathology**, v. 97, n. 8, p. 916–929, 2007.

HONG, J. K.; HWANG, B. K. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, v. 82, n. 10, p. 1079–1083, 1998.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, E. J. C., eds. Compendium of Soybean Diseases. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, Pag 13-14, 1999.

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