

OCORRÊNCIA DE *Diaporthe infecunda* ASSOCIADO A DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA NO BRASIL

Bernardo Henrique Drösemeyer, Gabriela Carolina dos Santos, Laísa Maindra Lima Horn, Ricardo Trezzi Casa, Fábio Nascimento da Silva

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o grão mais produzido no Brasil. A produção desta oleaginosa pode ser afetada negativamente em virtude da sanidade das sementes, que, se infectadas por fitopatógenos, podem comprometer a germinação de sementes e disseminar patógenos em áreas indenes.

Espécies do complexo de *Diaporthe* já relatados no Brasil, são exemplos de patógenos que causam diversas doenças na soja, como cancro da haste (*Diaporthe aspalathi* E. Jansen), cancro caulívora (*Diaporthe caulivora* Athow & Caldwell), seca da haste e da vagem (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehn), e deterioração de sementes (*Diaporthe longicolla* Hobbs).

A diversidade de espécies de *Diaporthe* em sementes de soja é demonstrada pela variação na morfologia das colônias em testes de patologia. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi descrever pela primeira vez no Brasil a ocorrência de uma nova espécie de *Diaporthe* causando deterioração de sementes de soja.

DESENVOLVIMENTO

O experimento foi realizado no município de Lages-SC, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), nos Laboratórios de Fitopatologia (LF) e Virologia Vegetal (LVV).

Durante as safras de 2020/21, 2021/22 e 2022/23, 479 amostras de sementes de soja produzidas em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul foram submetidas a patologia de sementes, para detectar os fungos que as infectavam, entre eles, o gênero *Diaporthe*. As colônias características deste complexo foram isoladas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), purificadas e armazenadas na Micoteca Erlei Melo Reis (MEMR), utilizando o método de Castellani (1939), para análises futuras.

Um isolado (MEMR0499), com características morfológicas distintas dos demais, foi selecionado para a caracterização morfológica, molecular e testes de patogenicidade. Visando à observação das características morfológicas: cor e aspecto da colônia, e a observação de conídios, o isolado foi repicado em 10 placas contendo BDA por 14 dias a 23°C com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio óptico.

Para a caracterização molecular, foi extraído o ácido desoxirribonucleico (DNA) do micélio obtido de três placas. O micélio foi raspado com auxílio de lâmina para microscopia esterilizada e acondicionado em microtubo de 1,5 mL, Dnase/Rnase Free. A maceração foi feita com tampão Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (CTAB) (Doyle e Doyle, 1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada utilizando os pares

de primers, EF1-728F/EF1-986R, Bt2b/T2 e CYLH3F/H31b para a amplificação dos genes: fator de alongamento de tradução 1- α (TEF1- α) (Carbone e Kohn 1999), β -tubulin (TUB2) e histona (HIS) (Glass e Donaldson 1995). Após, os produtos visualizados em transiluminador com luz UV em gel de agarose a 1% e 1,0 μ l de corante intercalante de ácidos nucleicos, foram enviados para sequenciamento. As sequências obtidas foram corrigidas, e comparadas com as sequências disponíveis no *GenBank*. Em seguida, foram concatenadas para a análise filogenética multilocus, realizada no software MEGA X (Kumar et al., 2018).

Para comprovar a patogenicidade do isolado, o postulado de Koch foi realizado em plantas e sementes da cultivar BMX Zeus IPRO. Nas plantas, a técnica do palito de dente (Siviero; Menten, 1995) foi utilizada, inserindo palitos colonizados com o fungo no caule de 10 plantas em estágio V2. Plantas com palitos não colonizados serviram como controle negativo. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida a 25°C por quatro dias, para avaliação dos sintomas e reisolamento. Em sementes, o teste de patogenicidade foi adaptado de Galli et al. (2005). Sementes desinfestadas foram inoculadas em 10 placas com o isolado, cinco sementes por placa, e incubadas a 23°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Após esse período, as sementes ficaram totalmente cobertas por micélio e foram reisoladas para confirmar a morfologia do isolado.

RESULTADOS

A colônia do isolado (MEMR0499) é densa, cotonosa, de coloração superior branca a bege-acinzentada e com formação de picnídios. O reverso da colônia apresenta coloração bege indo de marrom-claro a marrom-escuro. Os conídios do tipo alfa são hialinos, bicelulares, de formato elipsoidal a cilíndrico, com ápices arredondados. E os conídios do tipo beta, hialinos, filiformes, ligeiramente curvos e asseptados.

Na filogenia, MEMR0499 agrupou-se exclusivamente no clado desta espécie com *bootstrap* de 98%, confirmando sua identidade.

Nos testes de patogenicidade, as plantas apresentaram lesões elípticas de coloração parda a negra (0,2x0,4cm a 0,5x1,0cm). As sementes ficaram completamente deterioradas e não germinaram. Após o reisolamento do fungo, tanto da haste quanto da semente, as colônias formadas foram idênticas às isoladas no início do estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro relato do *D. infecunda* causando deterioração de sementes de soja. Esse novo registro em soja amplia o conhecimento sobre o potencial patogênico dessa espécie fúngica, já relatado em maracujá (*Passiflora edulis* Sims) causando podridões de flores e frutos (Moreira, et al. 2020). Evidencia-se a necessidade de novos estudos para investigar a possibilidade de ocorrência do patógeno em outras estruturas da planta de soja, como a haste e a vagem, como já observada em outras espécies do mesmo gênero fúngico.

Palavras-chave: *Glycine max*; *Phomopsis*; sanidade de sementes; detecção de fungo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 15, p. 225-226, 1939.

GALLI, J. A. et al. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Cercospora kikuchii* na germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 182-187, 2005.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

MOREIRA, R.R. et al. Phomopsis rot caused by *Diaporthe infecunda* on fruit and flowers of *Passiflora edulis* in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, n. 2, p. 141-145, 2020.

SIVIERO, A.; MENTEN, J. O. M. A toothpick method for inoculation of soyabean plantlets with *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 3/4, 2p. 59-260, 1995.

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Bernardo Henrique Drösemeyer

MODALIDADE DE BOLSA: PIBIC/CNPq (IC)

VIGÊNCIA: 09/2024 a 09/2025– Total: 12 meses

ORIENTADOR(A): Ricardo Trezzi Casa

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Departamento de Agronomia

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Proteção de plantas e agroecologia – ênfase em Fitopatologia

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Detecção, quantificação e caracterização morfológica e molecular de espécies do complexo *Phomopsis/Diaporthe* associados à semente de soja nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: NPP3945-2021