

**Variabilidade patogênica de populações multiespóricas e monospóricas de *C. lindemuthianum* em plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*)**

**Pathogenic variability of multispóric and monosporic isolates of *C. lindemuthianum* in common bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*)**

DOI:10.34117/bjdv6n11-303

Recebimento dos originais: 19/10/2020

Aceitação para publicação: 16/11/2020

**Viviana Gaviria-Hernández**

Doutora em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

E-mail: vgaviriah@gmail.com

**Gisele Zobot**

Mestre em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

E-mail: gisele.zobot@gmail.com

**Mario Fernando Pinel-Alvarez**

Mestrando em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

E-mail: maritopinel9@yahoo.com

**Mirian Alves**

Estudante de Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

E-mail: maritopinel9@yahoo.com

**Irajá Ferreira Antunes**

Doutor em Genética e Melhoramento de plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Instituição: Universidade de São Paulo

E-mail: iraja.antunes@embrapa.br

**Cândida Renta Jacobsen de Farias**

Doutora em Fitossanidade, Departamento de Fitossanidade

Universidade Federal de Pelotas

E-mail: jacobsencandida@gmail.com

**RESUMO**

A antracnose do feijão causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é a principal doença que acomete a cultura. O controle da doença baseia-se no uso de cultivares resistentes, no entanto a ampla variabilidade patogênica do fungo constitui um desafio para os programas de melhoramento. O uso padronizado de uma única cultura monospórica poderia subestimar os níveis de variabilidade presente nas populações multiespóricas do fungo. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade patogênica de populações multiespóricas e monospóricas de *C. lindemuthianum* em

plântulas de feijão comum. Foram avaliados 40 isolados de *C. lindemuthianum*, quanto a transmissão semente-plântula quando inoculados em sementes, e quanto a virulência quando inoculados em plântulas de feijão da cultivar Pérola. Foram determinadas as variáveis de índice da doença e taxa de transmissão quando transmitido via semente; e índice da doença e incidência de plântulas doentes quando inoculado em plântulas. Os resultados mostraram que para todas as variáveis avaliadas houve variabilidade entre isolados monospóricos de uma mesma população multiespórica, sendo expressiva dentro dos grupos de isolados LPSCL15 e LPSCL18. Na presente pesquisa foi evidenciada a variabilidade patogênica em populações multiespóricas de *C. lindemuthianum*. De acordo com os resultados, se sugere o uso de mais uma cultura monospórica de uma população multiespórica em trabalhos que envolvem a exploração de fontes de resistência à antracnose do feijão.

**Palavras-chave:** Transmissão semente-plântula, Virulência, Antracnose.

## ABSTRACT

Bean anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is the main disease that affects the crop. The control of the disease is based on the use of resistant cultivars, however the wide pathogenic variability of the fungus is a challenge for breeding programs. The standardized use of a single monosporic culture could underestimate the levels of variability present in the multisporic populations of the fungus. Thus, the objective of the present work was to evaluate the pathogenic variability of multisporic and monosporic populations of *C. lindemuthianum*. Forty isolates of *C. lindemuthianum* evaluated for transmission when inoculated in seeds, and virulence when inoculated in bean seedlings of cultivar Pérola. The disease index and transmission rate variables were determined when transmitted via seed. Disease index and incidence of seedlings with symptoms when inoculated into seedlings. The results showed that for all variables evaluated occur variability among monosporic isolates from the same multisporic population, being expressive within the groups of isolates LPSCL15 and LSPCL18. In the present research, pathogenic variability in multisporic populations of *C. lindemuthianum* was evidenced. According to the results, it is suggested the use of more than one monosporic culture form a multisporic population in works involving the exploration of sources of resistance to anthracnose of beans.

**Keywords:** Seed-seedling transmission, Virulence, Anthracnose.

## 1 INTRODUÇÃO

A antracnose do feijoeiro, é uma doença cosmopolita que ocorre na maior parte das zonas produtora do mundo, sendo mais agressiva em zonas tropicais e subtropicais, com perdas que podem chegar até 100% da produção quando são utilizadas cultivares suscetíveis e em condições favoráveis para a doença. O agente causal, *C. lindemuthianum*, pode infectar diferentes estádios da cultura, causando sintomas de necrose e/ou lesões deprimidas em pecíolos, nervuras, caule, vagens e sementes (Hall, 1994; Balardin; Goulart, 2010; Padder et al.2017).

A ampla variabilidade de *C. lindemuthianum* é constatada pela especialização patogênica do fungo em mais de 200 raças fisiológicas (Nunes et al., 2013). No Brasil, são conhecidas cerca de 74 raças do patógeno sendo as mais frequentes a 65, 73 e 81 (Alzate- Marin e Sartorato, 2004, Silva; De Souza; Ishikawa, 2007; NUNES et al., 2013; Ribeiro et al. 2016).

O uso de cultivares resistentes é a principal estratégia de controle do patógeno, porém a elevada variabilidade patogênica e genética do fungo é responsável pelo surgimento de novas raças ou raças mais virulentas o que limitam o uso de cultivares em regiões específicas onde as raças são conhecidas e causam a quebra de genes de resistência presentes em cultivares comerciais de feijão (Pastor-Corrales; tu, 1989; Rava e Sartorato, 1994; Rodriguez-Guerra et al., 2006).

Estudos de virulência em *C. lindemuthianum* são fundamentais para a identificação e seleção de fontes de resistência, no monitoramento de mudanças no comportamento patogênico de populações do fungo, bem como na determinação de quebra de genes de resistência de um determinado genótipo comerciais (Araya, 2003; Rodriguez-guerra et al., 2006). Em *C. lindemuthianum* diferenças contrastantes quanto a virulência tem-se observado entre isolados de raças diferentes bem como entre isolados de uma mesma raça quando inoculados em cultivares diferenciadoras e comerciais de feijão (Santos et al., 2008; Davide e Souza, 2009; Ishikawa, Ramalho, Souza, 2011; Ribeiro et al., 2016).

A elevada variabilidade patogênica dentro e dentre raças de *C. lindemuthianum* é atribuída a mecanismo de recombinação genética que ocorrem durante a fase assexuada como anastomoses de hifas, formação de tubos de conídios CATS e ciclo parasexual (Roca; Read e Wheals, 2005; Rodriguez-Guerra et al. 2005; Castro-Prado et al. 2007; Padder et al. 2017). Esses mecanismos podem promover inclusive o intercâmbio de genes entre conídios de diferentes populações ou raças (Roca; Read e Wheals, 2005; Ishikawa et al., 2012; Pinto et al., 2012) onde grandes níveis de variabilidade poderiam ser encontrados inclusive dentro de uma população massal proveniente de uma mesma lesão.

Outro agravante que contribui na variabilidade de *C. lindemuthianum* é o fato do mesmo ter nas sementes o seu principal meio de sobrevivência, disseminação e transmissão que favorece a introdução e dispersão de novas raças ou de isolados mais agressivos do fungo (Talamini et al., 2002; Rodriguez-guerra, et al., 2006; Yesuf; Sangchote, 2007)

Considerando que muitos dos trabalhos de melhoramento de feijão, são geralmente realizados mediante a inoculações de isolados de *C. lindemuthianum* provenientes de uma única cultura monospórica (Ishikawa; Souza e Davide, 2008), e que o nível de variabilidade de uma população massal podem ser elevados, o objetivo do estudo foi avaliar a variabilidade patogênica de isolados massais e monospóricos de *C. lindemuthianum* quando transmitidos via semente bem como em plântulas de feijão.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Patologia de Sementes e fungos fitopatogênicos (LPSFF), do Departamento de Fitossanidade pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Foram utilizados os isolados multiespóricos de *C. lindemuthianum*, LPSCP15+ (Raça 857), LPSCL16+ (Raça 81), LSPCL17+ e LPSCL18+, da coleção de fungos fitopatogênicos do Laboratório de patologia de sementes e fungos fitopatogênicos (LPSFF) pertencente ao Laboratório de Patologia de Sementes e fungos fitopatogênicos (LPSFF) FAEM/UFPel, preservados a 4°C em meio de cultura Mathur (2,0 gL<sup>-1</sup> de peptona; 2,8 gL<sup>-1</sup> de dextrose; 1,73 gL<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 2,72 gL<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; e 20 gL<sup>-1</sup> de Agar-Agar).da Universidade Federal de Pelotas.

A partir de cada isolado multiespórico foram obtidos nove monospóricos totalizando 40 isolados, incluindo os multiespóricos. Para isso, vagens previamente esterilizadas e dentro de tubos contendo agar-agar foram repicadas com cada isolado multispórico e incubadas em sala de crescimento a 23±1°C com fotoperíodo de 12h luz. Após 15 dias de incubação, com ajuda de um estilete com ponta estéril foi coletada a massa de conídios presentes na superfície das vagens e transferidas para Beckers previamente esterilizados contendo 3ml de água destilada e estéril. Uma vez diluído os esporos, foram coletadas alíquotas de 200 ul de cada suspensão e depositadas no centro de placas de Petri contendo Agar-Agar. Os conídios foram disseminados na superfície do meio com ajuda de uma alça de drigalski e as placas incubadas a 23±1°C com fotoperíodo de 12h luz por 48 horas. Com ajuda de lupa estereoscópica foram selecionados ao caso dez conídios germinados de cada isolado massal e transferidos individualmente para o centro de placas de Petri de 90 x 15cm contendo 15mL de meio Mathur. As placas com cada isolado monospórico foram mantidas em câmara de incubação a 23±1°C com fotoperíodo de 12h luz branca fluorescente até as colônias atingirem as bordas das placas. Os monospóricos de cada isolado multiespórico foram denominados como LPSCL com o número do respectivo multiespórico e acompanhado pela letra “m” com o número do monospórico (1 a 10).

Para a avaliação da transmissão semente-plântula, foram determinadas as variáveis de índice da doença (ID) e taxa de transmissão (TT). As variáveis foram analisadas utilizando delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 10 plântulas cada, sendo cada variável comparada dentre os isolados pertencentes ao mesmo isolado multiespórico.

Sementes da cultivar Pérola foram inoculadas artificialmente e separadamente com cada isolado utilizando o método de condicionamento osmótico descrito por Rey et al. (2009), afim de evitar a germinação das sementes durante a inoculação. Para isso, discos de 5mm de meio Mathur contendo

micélio do fungo foram transferidos para três pontos equidistantes de placas de Petri contendo meio Mathur modificado com sacarose a -1,0 Mpa. As placas foram incubadas a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h luz por 10 dias, em sala de incubação. Na sequência, cinquenta sementes/isolado previamente desinfestadas com hipoclorito 1% por 1min, foram depositadas sobre a colônia fúngica separadamente e em camada única, e incubadas a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h luz por um período de 96 h, em sala de incubação. Passado o período de inoculação, as sementes foram retiradas do meio Mathur modificado, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e secadas em temperatura ambiente por 48 h.

As sementes inoculadas com cada isolado foram semeadas em copos plásticos de 200 mL com mistura 1:1 de substrato para plantas e vermiculita estéril. Os copos foram mantidos em câmara úmida, e condicionados dentro de caixas plásticas com tampa contendo lâmina de água de 50 mL e incubados  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz, em sala de incubação. Após 10 dias da semeadura, foram realizadas as coletas das plântulas para avaliação dos sintomas do fungo. Com base nos sintomas observados, as plântulas foram separadas em diferentes escalas descritivas de severidade, sendo E0 (plântulas sem sintoma); E1 (plântulas com sintomas nos cotilédones); E2 (Sintomas no caule ou nas folhas); E3 (sintomas em cotilédones e no caule ou folha); E4 (sintomas em cotilédones, caule e nas folhas); E5 (morte-pós emergência).

Os valores obtidos das plântulas provenientes das sementes inoculadas foram utilizados para calcular a incidência de cada escala descritiva de severidade (0 a 5), índice de doença - ID (%), taxa de transmissão - TT (%).

O cálculo do índice da doença das plântulas foi realizado de acordo com a fórmula estabelecida por Mckinney (1923):

$$\text{ID (\%)} = \frac{\sum(\text{valor da escala} \times \text{número de plantulas com a nota})}{\text{Número de plântulas} \times \text{valor máximo da escala de notas}} \times 100$$

A taxa de transmissão TT (%), foi calculada seguindo a fórmula utilizada anteriormente por Malavolta et al. (2002):

$$\text{TT (\%)} = \frac{\text{Incidencia de plantulas com sintomas com sintoma}}{\text{Incidencia do patógeno na semente}} \times 100$$

Para determinar a variabilidade na virulência dos isolados, foram avaliadas as variáveis de índice da doença (ID%) e incidência de plântulas doentes (%). As variáveis foram analisadas utilizando

delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 10 plântulas cada, sendo cada variável comparada dentre os isolados pertencentes ao mesmo isolado multiespórico.

Para isso, cinquenta sementes de feijão da cultivar Pérola foram semeadas em copos plásticos de 200 mL contendo mistura 1:1 de substrato comercial para plantas e vermiculita previamente esterilizada. Os copos foram mantidos em sala de incubação a temperatura de  $23 \pm 1$  °C por sete a 8 dias até 50% das plântulas atingirem o estágio V2 (folhas primárias bem desenvolvidas ou estendidas).

Cinquenta plântulas em estágio V2 por isolado foram inoculadas utilizando uma suspensão de  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL com auxílio de um aspersor manual. O inoculo foi obtido a partir de vagens repicadas com o fungo dentro de tubos contendo 1 mL de Agar-Agar, previamente esterilizados conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2013). Após a inoculação, as plântulas foram acondicionadas dentro de caixas plásticas fechadas contendo uma lâmina de 50 mL de água para manter a umidade do ambiente e incubadas em sala de incubação a  $23 \pm 1$  °C com fotoperíodo de 12h por 8 dias até o aparecimento dos sintomas.

A severidade de cada plântula foi determinada utilizando a escala descrita por Pastor-Corrales (1992) e adaptada por Silva et al. (2013), onde: 1 - Ausência de sintomas; 2 - Até 1% da nervura apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; 3 - Maior frequência de sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 4 - Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; 5 - Maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; 6 - Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos; 7 - Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente, que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos; 8 - Manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos, pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas; 9 - Maioria das plantas mortas. A partir dos dados obtidos foi calculado o índice da doença (ID) com base formula de McKinney (1923) e incidência de plântulas com sintomas.

Os dados obtidos para as variáveis de índice da doença (ID) e taxa de transmissão quando inoculado nas sementes, e de índice da doença (ID) e incidência do patógeno quando inoculado em plântulas, foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homostacidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Para alguns grupos de isolados foi necessária a transformação  $\sqrt{x+1}$ . Os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F

( $p \leq 0,05$ ) e constatando-se significância estatística, as médias das variáveis de cada multiespóricos com seus respectivos monospóricos foram agrupadas e comparados pelo teste de Scott-Nott ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das sementes inoculadas foram observadas variações dentre monospóricos de uma mesma população multiespórica, ocorrendo diferenças estatísticas pelo teste de Scott- Knott ao nível 5% para as variáveis de ID (%), TT (%) (Tabela 1). Dentro do grupo de isolados de LPSCL15, as duas variáveis apresentaram a formação de três grupos estatisticamente diferentes. Os isolados LPSCL15M1, LPSCL15M3, LPSCL15M4 e LPSCL15M5 destacaram-se com as maiores taxas de transmissão (TT) e de índice da doença (ID). O multiespóricos LPSCL15+ e seu monospóricos LPSCL15M6, embora também conformaram o grupo de isolados com as maiores taxas de transmissão, ambos os isolados foram inseridos dentro do grupo com os menores índices da doença (ID) (Tabela 1). O monospóricos LPSCL15M9 foi o isolado menos agressivo do grupo de LPSCL15, sendo inserido dentro do grupo com as menores taxas de transmissão e índice da doença, de 44% e 10% respectivamente (Tabela 1).

Dentro do grupo de isolados LPSCL16, também houve variações quanto o comportamento quando transmitidos via semente, com formação de dois grupos estatisticamente diferentes. O multiespóricos LPSCL16+ e seus monospóricos LPSCL16M3, LPSCL16M5, LPSCL16M6, LPSCL16M9 e LPSCL16M7, apresentaram as taxas de transmissão estatisticamente mais elevadas, com percentuais de 80 e 90%. Os valores de ID, oscilaram entre 18 a 34,4%, sendo os isolados LPSCL16M2, LPSCL16M4, LPSCL16M6 e LPSCL16M8 os menos agressivos, com ID abaixo de 20% (Tabela 1).

Isolados do grupo LPSCL17, tiveram variações quanto o índice da doença (ID) mas não ocorreram diferenças significativas quanto a taxa de transmissão (TT). Os isolados LPSCL17+ e LPSCL17M4 destacaram-se com as maiores índice da doença (ID) comparado com os outros isolados, com valores de 32 e 44%, respectivamente. Em relação a taxa de transmissão, os isolados apresentaram elevados percentuais, acima de 62%.

Dentre os monospóricos provenientes do isolado multiespóricos LPSCL18+, ocorreram diferenças significativas em ambas as variáveis, sendo mais expressiva para a variável de índice da doença (ID) com formação de até três grupos estatisticamente diferentes (Tabela 1). O isolado LPSCL18M8 teve o maior índice da doença (ID) comparado com os outros isolados, e destacou-se com taxa de transmissão de 90%. Foi notório que para esse isolado houve elevada incidência de

plântulas com sintoma nos cotilédones (E2) e em cotilédones, caule e folha (E4) (Tabela 1). De forma contrastante, o monospórico LPSCLM18M3, foi inserido dentro do grupo de isolados com os menores valores de índice da doença (ID) e taxa de transmissão (TT), com percentuais de 8,4 e 45%, respectivamente.

De forma geral, foram observadas altas taxas de transmissão em todos os grupos de isolados multiespóricos com seus respectivos monospóricos avaliados, com percentuais de 40 a 90%. No entanto, ocorreram índices da doença baixos e altos, variando de 8,4 a 46,8%. Em relação a incidência de plântulas com cada escala de severidade, foram observadas todas as escalas, porém em menor frequência plântulas com escala E2 (sintomas só no caule ou folha). Foi frequente a presença de plântulas com lesões nos cotilédones (E1), sintomas nos cotilédones e no caule ou na folha (E3), e plântulas com lesões nos cotilédones, caule e folha (E3) (Tabela 1).

Elevadas taxas de transmissão de *C. lindemuthianum* também foram constatadas por Vechato et al. (1997); Santos et al. (1996); Yesuf e Sanchote (2005) e Rey et al. (2009), com percentuais de 60% a 100%, variando de acordo com fatores como raça do fungo, localização do patógeno na semente, condições ambientais, cultivar e nível de inoculo. Segundo Rey et al. (2009), não encontraram grandes variações quanto as taxas de transmissão comparadas entre as raças 65, 73 e 81, no entanto, no presente estudo foram observadas diferenças tanto na transmissão quanto a severidade em plântulas, entre isolados monospóricos e massais pertencentes a mesma população.

Na presente pesquisa foi evidenciada a capacidade de *C. lindemuthianum* de ter nas sementes um meio de transmissão e disseminação. Mesmo que alguns isolados apresentaram baixos índices da doença (ID), uma única lesão em campo representa uma fonte de inoculo onde são produzidos milhares de esporos suficientes para serem disseminados em outros pontos da mesma planta e em plantas vizinhas, favorecendo a introdução de novas raças ou populações do fungo mais agressivas, bem como o estabelecimento do patógeno desde a fase inicial da cultura podendo dar início a uma epidemia (SANTOS et al, 1996; YESUF; SANGHOTE, 2005; YESUF; SANGHOTE, 2007).

De fato, experimentos conduzidos por Yesuf; Sangchote (2007) demonstraram a correlação positiva dentre os níveis de inoculo primário e severidade de *C. lindemuthianum* em semente e plântulas de feijoeiro em campo. Os autores observaram que a severidade da doença na fase inicial da floração foi 10 vezes maior em lotes provenientes de sementes infestadas, comparado com lotes de plantas provenientes de sementes sadias; e que a severidade dos lotes de plantas aumento proporcionalmente com a severidade e nível de inoculo da semente.



Devido à agressividade do fungo quando dadas condições ambientais favoráveis e a importância das sementes como principal fonte de inoculo, o nível de tolerância recomendado em sementes de *C. lindemuthianum* é de Zero. Nesse sentido, uma semeadura de 400.000 sementes de feijão por hectare com percentual de ocorrência de 0,25% de *C. lindemuthianum*, significa a introdução de 1.000 focos primários de infecção na área (Machado, 1994; Rey et al., 2009).

Tabela 1- Incidência (%) de cada escala de severidade, Índice da doença (ID) e Taxa de Transmissão (TT) em plântulas de feijão c.v Pérola inoculadas com os isolados multiespóricos e monoespóricos de *C. lindemuthianum*.

Isolado	Incidência da escala de severidade (%)						ID (%)	TT (%)
	E0	E1	E2	E3	E4	E5		
LPSCL15+	22,0	66,0	0,0	4,0	8,0	0,0	22,0 c <sup>1/</sup>	85,0 a
LPSCL15M1	16,0	58,0	6,0	8,0	0,0	12,0	30,8 b	95,0 a
LPSCL15M2	22,0	18,0	0,0	26,0	32,0	2,0	46,8 a	75,0 b
LPSCL15M3	16,0	54,0	2,0	16,0	12,0	0,0	30,8 b	87,5 a
LPSCL15M4	16,0	56,0	0,0	4,0	22,0	2,0	33,2 b	84,0 a
LPSCL15M5	16,0	48,0	0,0	14,0	20,0	2,0	36,0 b	87,5 a
LPSCL15M6	12,0	72,0	0,0	12,0	0,0	0,0	24,8 c	92,5 a
LPSCL15M7	38,0	54,0	2,0	2,0	4,0	0,0	16,0 c	67,5 b
LPSCL15M8	32,0	46,0	2,0	12,0	8,0	0,0	23,6 c	72,5 b
LPSCL15M9	58,0	38,0	0,0	2,0	2,0	0,0	10,4 c	40,0 c
LPSCL16+	24,0	52,0	0,0	18,0	6,0	0,0	26,0 a	82,5 a
LPSCL16M1	32,0	44,0	0,0	24,0	0,0	0,0	23,2 a	68,0 b
PSCL16M2	42,0	44,0	0,0	10,0	4,0	0,0	18,0 b	70,0 b
LPSCL16M3	16,0	42,0	0,0	40,0	0,0	2,0	34,4 a	84,0 a
LPSCL16M4	30,0	60,0	2,0	8,0	0,0	0,0	17,6 b	65,0 b
LPSCL16M5	12,0	76,0	0,0	4,0	0,0	8,0	25,6 a	88,0 a
LPSCL16M6	30,0	62,0	4,0	4,0	0,0	0,0	16,4 b	80,0 a
LPSCL16M7	24,0	60,0	0,0	8,0	8,0	0,0	23,2 a	90,0 a
LPSCL16M8	50,0	48,0	0,0	0,0	0,0	2,0	11,6 b	62,5 b
LPSCL16M9	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	0,0	30,0 a	80,0 a
LPSCL17+	32,0	42,0	0,0	14,0	12,0	0,0	32,0 a	62,5 n.s
LPSCL17M1	24,0	62,0	0,0	8,0	6,0	0,0	28,7 b	85,0
LPSCL17M2	20,0	64,0	0,0	12,0	4,0	0,0	23,2 b	80,0
LPSCL17M3	28,0	66,0	0,0	6,0	0,0	0,0	15,0 b	72,0
LPSCL17M4	12,0	50,0	0,0	0,0	20,0	18,0	44,0 a	88,0
LPSCL17M5	24,0	58,0	0,0	12,0	6,0	0,0	25,5 b	70,0
LPSCL17M6	32,0	58,0	0,0	6,0	4,0	0,0	18,4 b	68,0
LPSCL17M7	22,0	68,0	0,0	8,0	2,0	0,0	19,0 b	78,0
LPSCL17M8	42,0	40,0	0,0	14,0	4,0	0,0	19,6 b	58,0
LSPCL17M9	38,0	56,0	0,0	4,0	2,0	0,0	13,0 b	70,0
LPSCL18+	32,0	66,0	0,0	0,0	2,0	0,0	13,0 c	72,5 a
LPSCL18M1	38,0	54,0	0,0	6,0	2,0	0,0	14,7 c	67,5 a
LPSLCL18M2	22,0	66,0	0,0	8,0	4,0	0,0	19,5 c	78,0 a
LPSLCL18M3	58,0	42,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4 c	45,0 b
LPSLCL18M4	34,0	66,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,2 c	70,0 a
LPSLCL18M5	26,0	44,0	0,0	24,0	2,0	4,0	28,8 b	74,0 a
LPSLCL18M6	22,0	52,0	14,0	6,0	6,0	0,0	22,5 b	82,5 a
LPSLCL18M7	28,0	58,0	0,0	2,0	2,0	10,0	24,4 b	72,0 a
LPSLCL18M8	16,0	50,0	0,0	6,0	26,0	2,0	42,7 a	90,0 a
LPSLCL18M9	30,0	60,0	0,0	4,0	2,0	4,0	20,0 c	70,0 a

<sup>1/</sup>Medias seguidas da mesma letra na coluna não difere, pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05). n.s não ocorreu diferenças significativas pelo teste F (p≤0,05)

A partir das inoculações de plântulas com o patógeno, também foi verificada a variabilidade na virulência entre isolados de uma mesma população massal (Tabela 2). Para o grupo de isolados LPSCL15, os valores de índice da doença (ID) e Incidência variaram de forma relevante com formação de até seis e três grupos estatisticamente diferentes, respectivamente. Os monospóricos LPSCL15M4 foi o isolado mais virulento, apresentando o maior Índice da doença (ID) de 75,1%, comparado com os outros isolados. Para esse isolado também foi expressiva a incidência em plântulas com valor de 100%. De forma contrastante o isolado LPSCL15M6 foi o menos severo quanto aos sintomas em plântula, apresentando o menor valor de índice da doença (ID) de 22,9% e inserido dentro do grupo de isolados com a menor incidência em plântula (Tabela 2).

Tabela 2- Índice da doença (ID%) e incidência (%) de plântulas de feijão da cultivar Pérola inoculadas com os isolados multiespóricos e monospóricos de *C. lindemuthianum*.

Isolados	ID (%)	Incidência (%)	Isolados	ID (%)	Incidência (%)
LPSCL15+	34,0 e <sup>1/</sup>	54,0 c	LPSCL17+	34,8 b	70,0 b
LPSCL15M1	61,9 c	75,0 b	LPSCL17M1	43,7 b	60,0 b
LPSCL15M2	61,1 c	84,0 b	LPSCL17M2	56,8 a	82,0 a
LPSCL15M3	54,2 d	88,0 b	LPSCL17M3	68,6 a	98,0 a
LPSCL15M4	75,1 a	100,0 a	LPSCL17M4	42,9 b	64,0 b
LPSCL15M5	68,1 b	92,0 a	LPSCL17M5	53,1 a	80,0 a
LPSCL15M6	21,7 f	62,0 c	LPSCL17M6	55,1 a	80,0 a
LPSCL15M7	52,5 d	82,5 b	LPSCL17M7	49,4 a	87,5 b
LPSCL15M8	33,6 e	60,0 c	LPSCL17M8	45,8 b	68,0 b
LPSCL15M9	56,9 d	84,0 b	LPSCL17M9	60,6 a	85,0 a
<hr/>					
LPSCL16+	59,8 a	88,0 a	LPSCL18+	35,3 c	85,0 n.s
LPSCL16M1	34,7 c	62,5 b	LPSCL18M1	52,4 a	87,5
LPSCL16M2	63,3 a	96,0 a	LPSLCL18M2	30,7 c	72,0
LPSCL16M3	63,3 a	96,0 a	LPSLCL18M3	46,4 b	74,0
LPSCL16M4	42,0 b	80,0 a	LPSLCL18M4	58,9 a	88,0
LPSCL16M5	45,8 b	70,0 b	LPSLCL18M5	43,8 b	64,0
LPSCL16M6	40,2 b	56,7 b	LPSLCL18M6	46,2 b	80,0
LPSCL16M7	66,2 b	98,0 a	LPSLCL18M7	56,6 a	84,0
LPSCL16M8	26,7 c	62,5 b	LPSLCL18M8	37,8 c	74,0
LPSCL16M9	43,1 b	67,5 b	LPSLCL18M9	47,6 b	85,0

<sup>1/</sup>Medias seguidas da mesma letra na coluna não difere, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). n.s não ocorreu diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ )

Para o grupo de LPSCL16 também foram observados isolados mais virulentos que outros, sendo mais expressiva as diferenças encontradas para a variável de índice da doença (ID). Os isolados LPSCL16+, LPSCL16M2, LPSCL16M3, foram os mais severos quanto sintomas em plântula, com índices da doença (ID) entre 59,8 a 63,3%. De forma contrastante, LPSCL16M1 e LPSCL16M8 apresentaram os menores valores de índice da doença (ID). De forma geral para esse grupo de isolado observou-se elevada incidência com percentuais que oscilaram entre 56,7 e 80%.

No grupo de isolados LPSCL17, ocorreram variações para ambas as variáveis avaliadas quanto virulência em plântula, com formação de até dois grupos estatisticamente diferentes. Os isolados LPSCL17M2, LPSCL17M3, LPSCL17M5, LPSCL17M6, LPSCL17M7 e LPSCL17M9, destacaram-se por serem os mais virulentos do grupo LPSCL17, apresentando os maiores valores tanto para o índice da doença (ID) como na variável de incidência, quando inoculados em plântula (Tabela 2).

Dentro do grupo de isolados do LSPCL18 houveram diferenças significativas unicamente para a variável de índice da doença (ID). Os monospóricos, LPSCL18M1, LPSCL18M4 e LPSCL18M7 foram os mais agressivos em plântula, com ID entre 52,4 e 58,9%. Em contrapartida, os monospóricos, LPSCL18M2 e LPSCL18M8 foram os menos agressivos, com os menores percentuais de índice da doença (ID), de 30,7 e 37,8%. Quanto a incidência em plântula, todos os isolados apresentaram elevados percentuais, com valores acima de 64%.

De forma geral, para as variáveis de índice da doença e de incidência quando inoculados em plântulas, todos grupos de isolados multiespóricos com seus respectivos monospóricos avaliados se mostraram virulentos para a cultivar Pérola, ocorrendo variações tanto para as variáveis de índice da doença como incidência. No entanto, o índice da doença (ID) foi a variável que mais variou entre monospóricos de um mesmo isolado multiespóricos, destacando-se as diferenças encontradas dentro do grupo LPSCL15 com formação de até seis grupos estatisticamente diferentes. O grupo de isolados LPSCL17 foram os que menos apresentaram variações entre indivíduos de uma mesma população multiespórica,

Para esse estudo era esperado que isolados multiespóricos pudessem apresentar maiores taxas de transmissão e ser mais virulentos quando inoculados em plântula comparado com seus monospóricos, mas foi observado o oposto onde alguns isolados tiveram uma severidade média e outros estiveram dentre os isolados da mesma população com menor severidade quanto transmissão e virulência.

Diferentes níveis de agressividade também foram observados por Serra; Coelho; Menezes (2008) entre isolados monospóricos de uma mesma população de multiespórica de *C. gloeosporioides*, em folhas destacadas de caju e manga. No entanto, isolados multiespóricos *C. gloeosporioides* se mostraram mais agressivos, induzindo lesões significativamente maiores que as dos seus monospóricos.

Em *C. graminicola*, isolados monoconidiais da mesma população multiespórica também exibiram instabilidade patogênica em cultivares diferenciadoras de sorgo, inclusive a variabilidade observada permitiu separar os isolados em diferentes fenótipos de virulência (Casela e Fredriksen,

1994). Os autores excluíram a influência do ambiente nessa variação, já que as diferenças foram sempre constatadas no longo de populações monoconídias diferentes, obtidas a partir da cultura e subcultura de dois isolados multiespóricos diferentes, para total de 120 isolados analisados.

Em relação a *C. lindemuthianum* são raros os trabalhos que abordem a variabilidade patogênica no nível de monospóricos de uma mesma população. Contrário ao observado no presente estudo, Pio e Chaves (1975) não encontraram variabilidade na virulência entre isolados monospóricos oriundos de 64 isolados massais, quando inoculados nas cultivares Michelite, Dark Red Kidney, Perry Marrow e Emerson 84.

Ampla variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum*, tem sido relatada acontecendo entre e dentro de raças do fungo. Nesse contexto, a partir de inoculações em mais de 24 genótipos comerciais de feijão, Santos et al. (2008), observaram variações na virulência entre dois isolado da raça 81 e entre três isolados da raça 65. Isolados da raça 65 apresentaram valores contrastantes quanto a reação de suscetibilidade e índices da doença na maioria das cultivares avaliadas.

Davide e Souza (2009) avaliou a variação patogênica de 6 isolados da raça 65 inoculados nas doze series diferenciadoras e em sete cultivares comerciais, e observou que ocorreram diferenças dentre os isolados quanto á agressividade (dois isolados se destacam pela sua agressividade) e virulência (algumas cultivares comerciais apresentam-se resistentes ou suscetíveis dependendo do isolado). De forma semelhante, Ishikawa; Ramalha, Souza (2011) e Ribeiro et al. (2016), observaram variações nas reações de suscetibilidade quando inoculadas séries diferenciadoras com vários isolados da raça 65. Com base a variabilidade patogênica, esses autores propuseram novo grupo de series diferenciadoras para serem aderidas as já existentes.

Os níveis de variabilidade dentro da população de um patógeno dependem de diversos fatores como o ambiente, o hospedeiro, fluxo gênico de novos genes de virulência vindos de populações distantes, mecanismos de variabilidade, pressão de seleção, etc (Matiello; Barbieri; Carvalho, 1997; Rodriguez-Guerra et al. 2006). Grande parte da variabilidade em *C. lindemuthianum* tem-se atribuído a mecanismos alternativos de recombinação genética durante a fase anamórfica como anastomoses de hifas, formação de tubos de conídios CATS e ciclo parasexual (Roca et al. 2005; Rodriguez-Guerra et al. 2005; Castro-Prado et al. 2007; Padder et al. 2017).

Para os programas de melhoramento de feijão, o constante conhecimento dos níveis de variabilidade de populações de *C. lindemuthianum* é fundamental no desenvolvimento e sucesso de cultivares comerciais resistentes à doença, bem como para a implementação de determinados genótipos

de feijão em uma zona de acordo com os genes de avirulência do patógeno presentes na mesma (Talamini et al., 2004; Rodriguez-Guerra et al., 2006; Souza et al., 2010).

Serra, Coelho, Meneses (2008), salientam a importância que a escolha de isolados de um fitopatógeno em estudos de controle seja precedida da comparação morfológica e patogênica entre isolados monospóricos e multispóricos. Culturas monospóricas sem prévia análise, podem garantir uniformidade genética, mas não representatividade do isolado na população do fungo, podendo se subestimar a virulência na população (Serra, Coelho e Meneses, 2008).

#### **4 CONCLUSÕES**

Na presente pesquisa foi evidenciada a variabilidade patogênica existente dentro de populações multiespóricas de *C.lindemuthianum*, destacando-se os grupos de isolados LSPCL15 e LPSCL18. Com base nos resultados se sugere reconsiderar o uso de uma única cultura monospórica por amostra e destaca-se a necessidade de uma maior exploração das populações multiespóricas de *C. lindemuthianum*, que permitam detectar genes de virulência para os quais ainda não se tem genes de resistência nos hospedeiros, dados esses essenciais para os programas de melhoramento de feijão.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores expressam seus agradecimentos à Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade; à EMBRAPA Clima Temperado pelo assessoramento e disponibilidade do material vegetal para o desenvolvimento da pesquisa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio e financiamento do projeto.

**REFERÊNCIAS**

- Alzate-marin, A.L.; Sartorato, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. Annual Report of Bean improvement cooperative, v. 47, p. 241-242, 2004
- Araya, C.M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en fríjol común. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 221-228, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300001>
- Balardin, R. S.; Goulart, C. Interação patógeno hospedeiro e a variabilidade de *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Pria, M. D.; Silva, O. C. (Org.). *Cultura do feijão: doenças e controle*. Ponta Grossa: UEPG, 2010. p. 171-1
- Casela, C. R.; Fredriksen, R. A. Pathogenic variability in monoconidial isolates of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* from single lesions and from monoconidial cultures. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, n. 2, p. 149–153, 1994.
- Castro-Prado, M.A.A; Querol, C.B.; Santana, J.R; Miyamoto, C.T.; Franco, C.C.S.; Mangolin, C.A.; Machado, M.F.P.S. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. *Genetics and Molecular Research*, v.6, n.3, p. 634-642, 2007.
- Davide, L. M. C.; De Souza, E. A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 23–29, 2009. <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8129491-54b2-6c0b.pdf>
- Hall, R. *Compendium of bean diseases*. APS: Saint Paul, 1994. 73 p.
- Ishikawa F.H., Souza E.A., Davide L.M.C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. *Biologia*, v.63, p. 156-161, 2008. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0039-6>
- Ishikawa, F.; Ramalho, M.; Souza, E. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Plant Pathology*, v.93, n.2, 2011. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i2.1202>
- Ishikawa, F.H.; Souza; E.A.; Shoji, J. Connolly, L.; Freitag, m.; read, n.d.; roca, G. Heterokaryon incompatibility is supresses following conidial anastomosis tibe fusion in fungal plant pathogen. *Plos One*, v.7, n.2, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031175>
- Malavolta, V.M.A.; Parisi, J.J.D.; Takada, H.M.; Martins, M.C. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. *Summa Phytopathologica*, v.28, n.4, p.336-340, 2002
- Machado, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à semente. *Revisão Anual de Patologia de Planta*, n.2, p.229-263, 1994.

Matiello, R.R.; BarberI, R.L.; Carvalho, I.F. Resistencia das a plantas a moléstias fúngicas. *Ciência rural*, v.2, n.1, p. 161-168, 1997.

Nunes, M. P., Gonçalves-Vidigal, M. C., LACANALLO, G. F., & COIMBRA, G. K. Comprehension of genetic variability and virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. Portland, OR: Biennial Meeting of the Bean Improvement Cooperativ, 2013

Padder, B. A.; Sharma, P.N.; Awale, H.E.; Kelly, J.D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3867>

Pastor-Corrales, M.A.; Tu, J.C. anthracnose. in: Schwartz, H.F.; Pastor-Corrales, M.A. *Bean Production Problems in the Tropics*, 2nd. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali, 1989, pp. 77–140.

Pinto, J.M.; Pereira, R., Mota, S.F., Ishikawa, F.H; Souza, E.A. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. *Phytopathology*, v. 102, n. 5. P. 490-497, 2012. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-06-11-0179>

Pio, G.; Chavez, G.M. Estudo sobre variabilidade de isolamentos e culturas monosporicas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Scrib. Experientiae*, v.19, p. 59-71, 1975.

Rava, C.A., Purchio, A.F.; Sartorato, a. Caracterização de Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorreram em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p167-172, 1994

Rey, M.S.; Lima, N.B.; Dos SantoS, J.; Pierobom, C.R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Arquivo Instituto Biológico, São Paulo*, v.76, n.3, p. 465-470, 2009

Ribeiro, T. Esteves, J.A.F. Silva, D.A; Gonçalves, J.G.R.; Carbonell, S.A.M.; Chiorato, A.F. Classification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in differential cultivars of common bean. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 38, n. 2, p. 179, 2016. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27866>.

Roca, M.; Read, N.D; Wheals, A.E. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *FEEMS Microbiology Letters*, v. 249, n. 2, p. 191-198, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.048>

Rodriguez-guerra; R.; Acosta-Gallego, J.; González-Chavaria, M.M.; Simpson, J. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de fríjol. *Agricultura Técnica en México*, v. 32, n. 1, p. 101-114, 2006.

Rodriguez-guerra; R.; Ramirez-Rueda, M.T.; Cabral-Enciso, M.; García-Serrano, M.; Lira-Maldonado, z.; Guevara-González, r.g. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia*, v. 97, n. 4, p. 793–803, 2005. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832771>

Santos, J.J.; Antunes, I.F.; Rey, M.S.; Rosseto, E.A. Virulência das raças 65, 73, e 81 de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Magn) Scrib. e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Agrociências*, v. 14, n.3-4, p. 115-124, 2008.

Santos, G.R. D; Costa, H.; Pelúzio, J.M.; Miranda, G.V. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres*, vol. XLIII, nº 249, 1996

Serra, I. M. R. D. S.; Coelho, R. S. B.; Menezes, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Summa Phytopathologica*, v. 34, n. 2, p. 113–120, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000200001>

Silva, K. J. D.; De Souza, E. A.; Ishikawa, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 155, n. 4, p. 241–247, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500002>

Souza, E.A.; Camargo, J.R, O.A.; Pinto, J.M.A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. *Genetics and Molecular Research*, 9:1759-1769, 2010

Silva, M. R.D.; Poletine, J.; Silva, A.F.M.; Sapia, J.G.; Maciel, C.D.G. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijoeiro comum em municípios do estado do paraná. *Journal of Agronomic Sciences*, v. 2, n. 2, p. 118–131, 2013

Talamini, V.; Pozza, E. A.; Machado, J. C.; Oliveira, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo*, v. 10, p. 219-248, 2002

Talamini, V.; Souza, E.A.; Pozza, E.A; Carrijo, F.R.F.; Ishikawa, F.H.; Silva, K.J.D.; Oliveira F.A. Identificao de raças patog nicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. *Summa Phytopathologica*, v. 30, n. 3, p.371-375, 2004.

Yesuf, M.; Sangchote, S. Seed transmission and epidemics of *Colletotrichum lindemuthianum* in the major common bean growing areas of Ethiopia. *Kasetsart Journal (Nat. Science)*, n. 39, p. 34-45, 2005.

Yesuf, M.; Sangchote, S. Survival and transmission of *Colletotrichum lindemuthianum* from naturally infected common bean seeds to the seedlings. *Tropical science*, v.4, n.2, p. 96-103, 2007.