



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**STÉLIO JORGE CASTRO GADAGA**

**INTERAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* COM O  
FEIJOEIRO E A DETECÇÃO DO PATÓGENO EM  
SEMENTES POR PCR**

**LAVRAS - MG  
2017**

**STÉLIO JORGE CASTRO GADAGA**

**INTERAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* COM O FEIJOEIRO E A  
DETECÇÃO DO PATÓGENO EM SEMENTES POR PCR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gadaga, Stélio Jorge Castro.

Interação de *Colletotrichum lindemuthianum* com o feijoeiro e  
a detecção do patógeno em sementes por PCR / Stélio Jorge Castro  
Gadaga. - 2017.

72 p. : il.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Coorientador(a): Carolina da Silva Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Patologia de sementes. 2. Antracnose. 3. Feijão. I. Machado,  
José da Cruz. II. Siqueira, Carolina da Silva. III. Título.

**STÉLIO JORGE CASTRO GADAGA**

**INTERAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* COM O FEIJOEIRO E A  
DETECÇÃO DO PATÓGENO EM SEMENTES POR PCR**

**INTERACTION OF *Colletotrichum lindemuthianum* WITH COMMON BEAN AND  
PATHOGEN DETECTION IN SEEDS BY PCR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de Junho de 2017.

Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira

UFLA

Dra. Carolina da Silva Siqueira

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA

Dr. José Maurício Pereira

MAPA

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2017**

*Aos meus pais, Fátima Joaquim e Celestino Checanhanza,  
às minhas filhas Alícia e Tessália,  
às minhas tias, tios, primas e primos.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

Aos meus pais pelo apoio incondicional sempre.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade em realizar o Doutorado, à Universidade Pedagógica de Quelimane e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José da Cruz Machado, pela orientação, paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Fitopatologia, pelos seus ensinamentos e disponibilidade.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite e suas valiosas contribuições.

Aos eternos colegas e amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: Carolina, Sueny, Poliana, Marina, Bárbara, Iara, Anny, Ângela, Hudson, Elenice e estagiários por todos os momentos vividos e regados a uma boa xícara de café.

Aos meus amigos e colegas africanos que estiveram sempre presentes e ajudaram a sanar a saudade de casa.

Para finalizar, agradeço a cada uma das pessoas que ajudaram direta ou indiretamente há concluir mais essa etapa. Muito obrigado!

## RESUMO

O feijão é uma cultura de grande importância para muitos países, podendo sua produtividade ser afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos, as doenças causadas por fungos destaca-se a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. O fungo tem a semente como um dos principais meios de disseminação a curta ou longas distâncias, sendo transmitido eficazmente por esta via. Sendo assim, existe uma necessidade de métodos mais rápidos e precisos na diagnose deste patógeno em lotes de sementes. Foram objetivos neste trabalho avaliar o efeito do *C. lindemuthianum* em sementes e plantas de feijoeiro, estudar a transmissão do fungo de sementes para plantas e sua detecção em amostras de sementes por técnicas moleculares, PCR convencional e PCR em tempo real (cPCR e qPCR) usando-se *primers* específicos descritos na literatura. Sementes de feijão cv. Pérola foram inoculadas por diferentes períodos de tempo 0, 36, 72, 108 e 144 horas correspondentes aos diferentes potenciais de inóculo denominados de P0, P36, P72, P108 e P144 horas. Também foram usadas sementes sadias e com diferentes níveis de incidência do fungo em relação ao número total de sementes. Para avaliar os efeitos do fungo em sementes e plantas de feijoeiro, foram considerados: germinação, índice de velocidade de emergência, estandes inicial e final, peso fresco e seco da parte aérea, incidência e a condutividade elétrica em dois ambientes de cultivo (20 e 26 °C). Já para os testes da transmissão avaliaram-se as taxas de transmissão em plantas assintomáticas, sintomáticas e transmissão total. Para os testes de detecção molecular quantificou-se o DNA de *C. lindemuthianum* nas amostras de sementes nos diferentes potenciais de inóculo e níveis de incidência. Observou-se que o fungo foi capaz de provocar efeitos negativos sobre o vigor de sementes e sua qualidade. Os outros parâmetros foram influenciados negativamente por maiores potenciais de inóculo. As taxas de transmissão foram mais elevadas no P144 em plantas que foram cultivadas a temperatura de 20 °C. Os métodos moleculares foram eficazes na detecção do fungo nas amostras de sementes desde os menores potenciais de inóculo, assim como, nas menores incidências do fungo em amostras de sementes demonstrando assim que essas técnicas podem ser usadas com segurança em laboratórios de rotina de análise de sementes.

**Palavras-chave:** Qualidade de sementes. Feijão. Antracnose. Métodos Moleculares.

## ABSTRACT

Common bean is a crop of great importance to many countries and their population. However, the productivity of the crop is affected by several biotic and abiotic factors. Among the biotic factors, the anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* is known to lead to considerable losses of production. The fungus has the seed as one of the major means of transmission and dissemination to short or long distances. Thus, there is a need for faster and more accurate methods in the diagnosis of seed lots. The objective of this work was to evaluate the effect of *C. lindemuthianum* on seeds and common bean plants, to study the transmission of fungi from seeds to plants and their detection in seed samples by molecular techniques, conventional and real time PCR (cPCR and qPCR) using specific primers. Seeds of bean cv. Pearl were inoculated for different periods (P0, P36, P72, P108 and P144 hours). Healthy seeds with different levels of fungus incidence were also used in relation to the total number of seeds. Germination, emergency speed index, initial and final stands, fresh and dry weight, incidence and electrical conductivity in two growing environments (20 and 26 °C) were evaluated to study the fungus effects on both seeds and plants. Transmission tests were evaluated in asymptomatic and symptomatic plants. For the molecular detection tests, *C. lindemuthianum* DNA was quantified in seed samples at different potentials and incidence levels. It was observed that the fungus has an effect on seed vigor and its quality. The variables were negatively influenced by the higher inoculum potential. Transmission rates were higher in P144 in plants growing at 20 °C. The molecular methods were effective in detecting the lowest inoculum levels in both seed and plant samples, demonstrating that these techniques can be used in routine seed laboratory analysis.

**Keywords:** Seed quality. Common Beans. Anthracnose. Molecular Methods.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Aspectos econômicos da cultura do feijão e da antracnose.....	11
2.2 Características e variabilidade do agente causal da antracnose.....	11
2.3 Sintomatologia e aspectos epidemiológicos .....	12
2.4 Medidas gerais de manejo da doença.....	13
2.5 Aspectos da detecção de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em sementes de feijão.....	15
REFERÊNCIAS .....	17
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	20
<b>ARTIGO 1- RELAÇÃO ENTRE POTENCIAL DE INÓCULO DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> E O DESEMPENHO DE SEMENTES DE FEIJÃO</b> .....	20
RESUMO .....	21
ABSTRACT .....	22
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
CONCLUSÕES.....	36
AGRADECIMENTOS.....	36
REFERÊNCIAS .....	36
<b>ARTIGO 2 - TRANSMISSÃO POTENCIAL DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (raça 65) EM ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE FEIJÃO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS</b> .....	40
RESUMO .....	41
ABSTRACT .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS .....	52
<b>ARTIGO 3 - DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE FEIJÃO</b> .....	54
RESUMO .....	55
ABSTRACT .....	56
INTRODUÇÃO .....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
CONCLUSÕES.....	67
AGRADECIMENTOS.....	67
REFERÊNCIAS .....	68
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	71

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos legumes de maior importância e valor econômico em todo o mundo. A cultura fornece 30% das calorias requeridas para o consumo humano, além de representar 50% dos legumes consumidos mundialmente, sendo o Brasil o maior consumidor (McCONNELL et al., 2010). Para grande parte da população da América Latina, Ásia e África Oriental este legume é de extrema importância e representa mais de 70% da proteína consumida na dieta alimentar diária (BITOCCHI et al., 2012). Estima-se que cerca de 3.418,3 mil toneladas de feijão serão produzidas no Brasil na safra 2016/2017, com área plantada de 3.179,8 mil hectares, o que representa um acréscimo de produção de 36% em relação à safra 2015/2016 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017).

Entretanto, a produção desta cultura tem estado abaixo do seu máximo potencial de produtividade devido a vários fatores, dentre os quais se destacam as doenças de plantas causadas por uma vasta gama de microrganismos que englobam os fungos, bactérias, vírus e nematóides. Destes grupos pode-se destacar os fungos devido ao grande número de espécies, sendo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. o agente etiológico da antracnose do feijoeiro, um dos principais fungos que tem causado elevadas perdas de produção em regiões tropicais. As perdas podem chegar a 100% quando são usadas variedades de feijão suscetíveis e as condições ambientais são favoráveis ao patógeno, a exemplo de temperaturas moderadas a frias, precipitação frequente e alta umidade relativa (BALARDIM; JAROSZ; KELLY, 1997; FERNÁNDEZ et al., 2000). Sendo assim, o uso de sementes saudáveis e o tratamento de sementes representam medidas de grande relevância para o controle da antracnose de maneira preventiva. A detecção do patógeno em sementes torna-se, por conseguinte indispensável, sendo os métodos moleculares os mais promissores.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi entender as interações de *Colletotrichum lindemuthianum* com sementes de feijão tendo-se como balizamento os efeitos desta associação no desempenho das sementes infectadas, a transmissão do patógeno a partir das sementes e sua detecção mais segura em amostras de sementes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos econômicos da cultura do feijão e da antracnose

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie herbácea pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), que possui ciclo de cultivo em torno de 95 dias e que tem como um dos principais fatores limitantes de produção, o déficit hídrico (LOPES et al., 1986). Trata-se de uma leguminosa, de baixo custo de produção, que é uma fonte importante de proteína consumida na dieta humana em diversos países do mundo sendo cultivada extensivamente no Brasil, com grande importância do ponto de vista econômico e social e sendo explorada em grande escala no sistema de agricultura familiar (BENIN et al., 2002).

Os maiores produtores mundiais de feijão são Índia, Mianmar, Brasil, China e EUA (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO, 2015). Para o Brasil, estima-se que na safra 2016/17 sejam produzidos 3.418,3 mil toneladas de feijão (acréscimo de 36%), sendo os maiores Estados produtores, o Paraná (761,5 mil toneladas de feijão), Minas Gerais (520,0), Mato Grosso (368,9), Goiás (306,5) e Bahia (288,6) (CONAB, 2017).

Em campos produtores o uso de variedades suscetíveis associadas ao ambiente favorável ao fungo, as perdas causadas pela doença podem chegar a 100% (CHAVES, 1980). A antracnose é também um fator depreciador da qualidade final do produto e é considerada uma das principais doenças do feijoeiro, devido a grande variabilidade genética de seu agente causal. É uma cultura que se encontra em diversas regiões produtoras do Brasil, especialmente nas regiões Sul, Sudeste e em áreas serranas (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; VIEIRA et al., 2005)

### 2.2 Características e variabilidade do agente causal da antracnose

A antracnose do feijoeiro é uma doença que tem como agente causal o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, pertencente ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Sordariomycetes; Ordem Phylachollares e Família Phylachoreacea (ISAAC, 1992). Além de *P. vulgaris*, o fungo também afeta outras leguminosas do gênero *Phaseolus*, sendo também, patogênico a elas, a exemplo de *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (ZAUMEYER; MEINERS, 1975). A sua fase perfeita correspondente à *Glomerella cingulata*, que dificilmente se desenvolve em condições de campo, entretanto, é considerada responsável por proporcionar alta variabilidade ao patógeno, devido às diferentes combinações alélicas, resultantes de mutações (DARBEN, 2010).

O fungo *C. lindemuthianum* produz micélio septado e ramificado, de coloração hialina chegando quase à negra com o envelhecimento. Os conídios também são hialinos, unicelulares de formato oblongo a cilíndricos com as duas extremidades arredondadas, ou uma delas podendo ser pontiaguda. Os conídios variam de dimensão que vai entre 4,4 µm a 5,3 µm por 13 µm a 22 µm, os quais são formados em acérvulos e sobre conidióforos também hialinos, eretos e ramificados, que com medidas que variam entre os 40 µm a 60 µm de comprimento. Os conidióforos/conídios apresentam-se encobertos por uma massa gelatinosa de coloração que varia de salmão, ocre ou rosa, agregados em 30 a 50 conidióforos por acérvulo, as setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas. Em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na sua extremidade (SUTTON, 1992).

A espécie *C. lindemuthianum* apresenta variabilidade patogênica, com populações amplamente distribuídas pelo mundo, onde plantas hospedeiras são encontradas. Mahuku e Riascos (2004) relataram em seus trabalhos a existência de mais de 90 raças, demonstrando assim a sua alta capacidade de patogenicidade. Entretanto, para o Estado de Minas Gerais, Damasceno e Silva, Souza e Ishikawa (2007) observaram que de 48 isolados estudados foi possível identificar 10 raças diferentes, das quais a mais frequente foi a raça 65 (18 isolados), seguida das raças 81 e 73.

### **2.3 Sintomatologia e aspectos epidemiológicos**

Os sintomas da antracnose podem ser observados em todos os órgãos da parte aérea da planta, desde as folhas, caules e vagens. As sementes, quando infectadas, apresentam lesões levemente deprimidas, de cor marrom com bordos escuros facilmente observados nas sementes que possuem tegumentos de coloração mais clara. Entretanto, nas vagens podem ser observadas mais lesões características da doença, sendo elas arredondadas, deprimidas e de coloração escura, onde, quando as mesmas se encontram em condições de elevada umidade relativa do ar, pode se desenvolver uma massa de coloração rósea de esporos. Já nas nervuras das folhas, no caule e pecíolo, apresentam-se como manchas necróticas, de coloração marrom escura e com bordos avermelhados (ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

A sobrevivência do fungo (*Colletotrichum lindemuthianum*) de uma estação de cultivo de feijão para outra pode ocorrer de maneiras diferentes: a) micélio, que permanece dormente em sementes infectadas; b) esporos nos cotilédones infectados; ou c) micélio ou acérvulos em restos culturais das safras anteriores. Entretanto, sementes infectadas, principalmente quando são de cultivares suscetíveis ao fungo, são as fontes primárias de inóculo além de serem

responsáveis pela disseminação do patógeno a longas distâncias em locais onde esteja ausente (VIEIRA, 1988). Já a curtas distâncias, a disseminação do fungo ocorre por respingos da água da chuva ou irrigação aérea, que dissolvem a biotina onde os esporos estão envolvidos, projetando-os a certa distância; por insetos e animais, sendo o homem o principal e mais eficiente meio de disseminação e transporte das sementes infectadas ou infestadas e de restos culturais entre as lavouras, principalmente quando se faz uso de máquinas e implementos agrícolas no preparo do solo, e esses não passam por qualquer tipo de lavagem entre e após as operações (ZAUMEYER; THOMAS, 1957). Entretanto, no que diz respeito às condições meteorológicas consideradas ideais para o fungo e desenvolvimento da doença são a umidade relativa do ar acima de 95%, chuvas frequentes a baixa intensidade, além da temperatura entre 18 e 22 °C (GUZMÁN; DONADO; GÁLVEZ, 1979). Em temperaturas acima dos 30 °C ou abaixo dos 13 °C a infecção é limitada bem como o crescimento do fungo (CRISPIN; SIFUENTER; AVILA, 1976). Quando a temperatura se encontra entre os 14 e 18 °C ocorre a abundante esporulação do fungo nas vagens (ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

Temperatura média de 17 °C a partir do mês de junho, quando associada a chuvas frequentes nesse mesmo período são fatores favoráveis ao progresso da antracnose em campos de produção de feijão (GARCIA et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados por Dalla Pria, Amorim e Bergamim Filho (2003) que verificaram que o progresso da doença é maior quando a temperatura se situa no intervalo entre os 13 e 27 °C, tendo os mesmos, observado que a temperatura ótima é 17 °C e a umidade relativa estar acima de 91%, quando ocorrem precipitações frequentes. No tocante a dispersão da antracnose em campo de produção, a mesma pode variar de 1,63 a 3,15 metros de distância aos 26 e 61 dias após o plantio, respectivamente, sendo observado um padrão de dispersão espacial contínuo e radial com maior severidade no centro da parcela e próxima a fonte de inóculo primário tipo ponto (ALVES et al., 2006).

Nkalubo et al. (2007) quando estudaram três cultivares de feijão em Uganda observaram uma correlação entre os valores da AACPD e as perdas de colheita, tendo constatado ainda que nas cultivares suscetíveis essa perda é dobrada quando comparada com as tolerantes ou com resistência desejável. Entretanto, ainda assim persistem os problemas para os produtores no tocante a obtenção de sementes livres de patógenos, pois existe uma co-evolução dos microrganismos com os seus hospedeiros.

## **2.4 Medidas gerais de manejo da doença**

O controle da antracnose do feijoeiro ainda é considerado um grande desafio, pois tem

sido dificultado devido a eficiente transmissão do patógeno pela semente e da capacidade que o mesmo possui de sobreviver durante 24 meses, tanto no solo quanto em restos de cultura contaminados (DILLARD; COBB, 1993; DOURADO NETO; FANCELLI, 2000; SUTTON, 1992). Dentre as várias estratégias de controle da antracnose, recomenda-se a aplicação de medidas integradas como: utilização de sementes sadias, tratamento químico de sementes, remoção e/ou revolvimento dos restos culturais, rotação de culturas com plantas não hospedeiras, aplicações foliares de fungicidas e a utilização de cultivares resistentes (ALZATE-MARIN et al., 2005; MOHAMMED; AYALEW; DECHASSA, 2013; RAVA, 2002; SARTORATO; RAVA, 1994).

Muitos patógenos de plantas têm como seu principal meio de disseminação as sementes, em particular devido ao fato de que o homem transporta estes insumos para novas áreas de cultivo. Neste caso há uma necessidade crescente do uso do processo de tratamento de sementes com produtos, sejam eles químicos ou biológicos. Pela literatura nota-se que há um aumento expressivo do número de trabalhos que aplicam os dois tipos de produtos com a finalidade de criar um bom sistema de manejo e assim, garantir uma semente de qualidade no campo de produção. Este fato tem uma correlação positiva, principalmente quando se empregam cultivares susceptíveis.

Ao se empregar o método apropriado de tratamento de sementes, bem como a aplicação de outros métodos de manejo em momentos adequados para o controle da antracnose do feijoeiro, os resultados são positivos e observa-se um incremento na produtividade, entretanto, devem ser levados em consideração o tratamento adequado de sementes, a origem da semente, as condições ambientais e o momento da aplicação dos fungicidas foliares (GUILLARD; RANATUNGA; CONNER, 2012).

O tratamento de sementes com uma mistura de produtos a base de DCT (diazon + captan + tiofanato metílico) e MFA (metalaxil + fludioxonil + azoxistrobina) e duas aplicações de fungicidas foliares a base de piraclostrobina e azoxistrobina, em Ontário (Canadá), foram eficientes no controle da antracnose do feijoeiro quando aplicados com surfactantes, pela redução da severidade e aumento da produção de sementes, além de ter garantido o retorno financeiro do investimento (GUILLARD; RANATUNGA, 2013; PYNENBURG; SIKKEMA; GUILLARD, 2011).

Estudos de transmissão de patógenos de plantas infectadas para as sementes vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos, para melhor compreender a dinâmica desse processo e assim elaborar estratégias de manejo eficientes e menos onerosas para o agricultor, entretanto, nos últimos anos surgiu a necessidade de uma melhor compreensão do processo de

transmissão do patógeno a partir de semente infectadas ou infestadas para plântulas ou plantas.

## **2.5 Aspectos da detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão**

A diminuição dos custos de produção pelo baixo, ou até inexistência, do uso de produtos químicos para o controle de doenças de plantas será benéfico tanto para o consumidor final quanto para o meio ambiente, pois deixarão de ser contaminados rios, córregos e solos, além do aplicador desses produtos.

A associação de sementes com microrganismos pode influenciar a sua qualidade e pode causar severos danos em campo de produção de feijão. Muitos organismos fitopatogênicos, de forma geral, podem ser transportados pela semente. Esse fato implica num conhecimento aprofundado sobre os mecanismos de interação e associação entre semente e patógeno, isso implica no estudo de mecanismos de detecção eficientes e rápidos para cada patossistema.

Os principais métodos de detecção de fungos em sementes atualmente em uso são: a) inspeção visual da amostra de sementes, que diz respeito a contagem do número de sementes com sintomas/sinais típicos dos agentes fitopatogênicos e as unidades de cada tipo de inóculo; b) incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro "*blotter test*" que diz respeito a incubação de sementes em papel de filtro umedecido que são acondicionadas sob temperatura, umidade e luz adequada para o crescimento dos patógenos e depois é realizada a identificação dos microrganismos, c) método do rolo de papel-toalha e d) plaqueamento em meio ágar sólido, metodologia de incubação com as sementes em placas contendo meio de cultura, as quais são colocadas em câmara de incubação, sob luz fluorescente branca a temperatura de  $20 \pm 2$  °C durante 7-8 dias e depois realizada a análise visual das colônias desenvolvidas em volta das sementes para identificação dos patógenos (BRASIL, 2009; INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 1976, 2002).

Nas últimas décadas, a partir de 1980, foi desenvolvida a técnica da PCR (reação da polimerase em cadeia), para identificação de patógenos entre outras finalidades, constituindo-se em uma ferramenta das mais poderosas. Os métodos de diagnóstico biológicos foram um marco da revolução na identificação de patógenos tanto em animais como em sementes de plantas, entretanto, só a partir de 2005 é que foram desenvolvidos trabalhos relacionados à detecção molecular com o uso da PCR para mais de 100 espécies patogênicas (HENSON; FRENCH, 1993; MUNKVOLD, 2009; PEARCE, 1998).

Sendo assim, vários pesquisadores estudaram essa interação, as regiões de

amplificação por PCR e sequenciamento do rDNA da região ITS para esses estudos tem lançado mão de *primers* universais ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), Wang, Tang e Wang (2008) foram capazes de detectar as infecções de *C. lindemuthianum* em amostras de feijão. Outros trabalhos já foram desenvolvidos por alguns pesquisadores, a exemplo de Torres-Calzada et al. (2011), com o objetivo de desenvolver métodos mais acurados e sensíveis baseados no PCR convencional para detectar e identificar outras espécies do gênero *Colletotrichum*, foram estudadas 17 espécies com o intuito de desenhar *primers* que possam amplificar as regiões ITS1 e ITS2 do rDNA.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. et al. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 557-63, nov./dez. 2006.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South Central, and North America. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1184-1191, 1997.
- BENIN, G. et al. Identificação da dissimilaridade genética entre genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo preto. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 179-184, set./dez. 2002.
- BITOCCHI, E, N. L. et al. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, p. 788-796, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. **Problemas de producción del frijol**. Cali: Centro internacional de agricultura tropical, 1980. p. 37-53.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasília, 2017. Acesso em: 13 mar. 2017.
- CRISPIN, M. A.; SIFUENTER, J. A.; AVILA, J. C. **Enfermedades y plagas del frijol en México**. México: INIA, 1976. 42 p. (Folheto de Divulgacion, 39).
- DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.
- DAMASCENO E SILVA, K. J.; SOUZA, E. A. de; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **J. Phytopathology**, Saint Paul, v. 155, p. 241-247, 2007.
- DARBEN, L. M. **Identificação de genótipos de feijoeiro comum resistentes à antracnose por meio de avaliação das reações de incompatibilidade e marcadores moleculares SCAR**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.
- DILLARD, H.; COBB, A. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 12. p. 1233-1238, 1993.
- DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Principais doenças fúngicas da parte aérea**. In: \_\_\_\_\_. **Produção de feijão**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 269-275.

FERNÁNDEZ, M. T. et al. Bean germplasm evaluation for anthracnose resistance and characterization of agronomic traits: a new physiological strain of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L. in Spain. **Euphytica**, Wageningen, v. 114, p. 143-149, 2000.

GARCIA, A. et al. Influence of the environmental variables in the progress of anthracnose of bean and efficiency of thiophanate methyl+ chlorothalonil in the control of the disease. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1709-1715, 2007.

GILLARD, C.; RANATUNGA, N.; CONNER, R. The control of dry bean anthracnose through seed treatment and the correct application timing of foliar fungicides. **Crop Protection**, Guildford, v. 37, p. 81-90, 2012.

GILLARD, C.; RANATUNGA, N. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Crop Protection**, Guildford, v. 45, p. 22-28, 2013.

GUZMÁN, P.; DONADO, M. R.; GÁLVEZ, G. E. Pérdidas económicas causadas por la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Colombia. **Turrialba**, San Jose, v. 29, p. 65-67, 1979.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. C. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Papers in Plant Pathology**, Berkeley, v. 31, n. 2, p. 81-109, 1993.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 152-155, 1976.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Seed-born fungi**: a contribution to routine seed health analysis. Switzerland, 2002. 138 p.

ISAAC, S. **Fungal plant interaction**. London: Chapman and Hall, 1992. 115 p.

LÓPES, N. et al. Crescimento e conversão de energia solar em *Phaseolus vulgaris* submetido a três densidades de fluxo radiante e dois regimes hídricos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 33, p. 142-151, 1986.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 253-263, 2004.

McCONNELL, M. et al. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, p. 1103-1116, 2010.

MOHAMMED, A.; AYALEW, A.; DECHASSA, N. Effect of integrated management of bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. and Magn.) through soil solarization and fungicide applications on epidemics of the disease and seed health. Hararghe Highlands, Ethiopia. **Plant Pathology & Microbiology**, Riverside, v. 4, n. 6, p. 2-7, 2013.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 285-311, 2009.

NKALUBO, S. et al. Yield loss associated with anthracnose disease on Ugandan market-class dry bean cultivars. In: AFRICAN CROP SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 8., 2007, El-Minia. **Proceedings...** Kampala: National Crops Resources Research Institute, 2007. v. 8, p. 869-874.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

PEARCE, D. PCR as a tool for the investigation of seed-borne. In: \_\_\_\_\_. **Applications of PCR in mycology**. New York: CAB International, 1998. 309 p.

PYNENBURG, G. M.; SIKKEMA, P. H.; GILLARD, C. L. Agronomic and economic assessment of intensive pest management of dry bean (*Phaseolus vulgaris*). **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 340-348, 2011.

RAVA, C. A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 65-69, 2002.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1994. 317 p. (Documentos).

SUTTON, B. C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum – Biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-16.

TORRES-CALZADA, C. et al. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 49, p. 48-55, 2011.

VIEIRA, C. et al. Melhoramento de feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 301-391.

VIEIRA, C. *Phaseolus* genetics resources and breeding in Brazil. In: GEPTS, P. **Genetics resources of Phaseolus beans**. Dordrecht: Kluwer, 1988. p. 467-483.

WANG, W.; TANG, J.; WANG, Y. Molecular detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by duplex PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 431-437, 2008.

ZAUMEYER, W. J.; MEINERS, J. Disease resistance in beans. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 313-334, 1975.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington: U. S. Department of Agriculture, 1957. 255 p.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**RELAÇÃO ENTRE POTENCIAL DE INÓCULO DE *Colletotrichum lindemuthianum* E  
O DESEMPENHO DE SEMENTES DE FEIJÃO**

RELATIONSHIP BETWEEN INOCULUM POTENTIAL OF *Colletotrichum  
lindemuthianum* AND THE PERFORMANCE OF BEAN SEEDS

Preparado de acordo com a Revista PAB, Pesquisa Agropecuária Brasileira (Versão preliminar)

Stélio Jorge Castro Gadaga<sup>(1)</sup>, José da Cruz Machado<sup>(1)</sup> e Carolina da Silva Siqueira<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brazil. E-mail: steliogadaga@gmail.com, machado@dfp.ufla.br e kerolpet@gmail.com

## RESUMO

A antracnose do feijoeiro, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das principais doenças desta cultura, que sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento causa danos severos. Trata-se de uma doença cujo patógeno é disseminado pelas sementes as quais podem ser afetadas de diferentes maneiras. Uso de sementes livres de patógenos é uma das principais medidas de manejo de doenças, evitando sua disseminação e introdução do inóculo em áreas de cultivo. Neste trabalho o objetivo foi avaliar os efeitos causados por *C. lindemuthianum* a partir de sua associação com sementes de feijão, bem como no seu desenvolvimento inicial. Sementes de feijão (cv. Pérola) foram inoculadas para obtenção de cinco potenciais de inóculo (P0, P36, P72, P108 e P144 horas) do isolado LV238 de *C. lindemuthianum*, raça 65. Os experimentos foram conduzidos em dois ambientes de cultivo, com temperaturas de 20 e 26 °C durante 28 dias. Os efeitos do patógeno no desempenho das sementes de feijão foram avaliados por meio de teste de germinação, incidência do patógeno em sementes, condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência (IVE), altura, peso fresco e seco da parte aérea, estande inicial e final e índice de doença. Observou-se que o aumento dos valores de potencial de inóculo do fungo nas sementes provocou reduções graduais da germinação, IVE, estandes inicial e final, altura e peso fresco e seco da parte aérea das plantas avaliadas em condições controladas. Para algumas destas variáveis, IVE, estande inicial e final, os baixos valores do coeficiente de determinação indicam que houve uma baixa correlação entre elas e os potenciais de inóculo utilizados. Por outro lado, observou-se alta correlação entre os potenciais de inóculo e as variáveis, incidência do patógeno nas sementes, produção de lixiviados e índice de doença.

Termos para indexação: Patologia de sementes, antracnose do feijoeiro, teste de vigor.

## ABSTRACT

The anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is one of the main diseases of common bean, causing severe damages under favorable conditions. Since the pathogen is disseminated through infested seeds, the use of pathogen free seeds is the main method of disease management, avoiding its dissemination and introduction of the pathogen in the field. The objective in this work was to evaluate the effects of *C. lindemuthianum* from its association with common bean seeds, as well as its initial development. Common bean seeds were inoculated to obtain five inoculum potentials (P0, P36, P72, P108 and P144 hours) of the isolate LV238 from *C. lindemuthianum*, race 65. The experiments were conducted in two growing environments, with temperatures of 20 and 26 ° C for 28 days under controlled conditions. The effects of the pathogen on the seeds were evaluated by germination test, seed pathogen incidence, electrical conductivity, emergence speed index, plant height, fresh and dry weight of plants, initial and final stands and Disease index. It was observed that the increase of the potential values of the fungus in the seeds caused gradual reductions of germination, IVE, initial and final stands, height and dry and fresh weight of the plants evaluated. On the other hand, there was an increase in the incidence of the pathogen, electrical conductivity and disease index.

Index terms: Seed pathology, common bean anthracnose's, vigor tests.

## INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos legumes de maior importância e valor econômico no Brasil, representando 50% dos legumes consumidos mundialmente (McConnell, 2010).

Atualmente a produtividade do feijoeiro tem sido afetada por vários fatores, dentre eles destacam-se as doenças causadas por fungos, dos quais *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. é um dos mais importantes. Esse microrganismo pode causar perdas de até 90% quando se faz uso de lotes com sementes infectadas e as condições ambientais sejam favoráveis à sua infecção (Balardin et al., 1997; Fernández et al., 2000).

O principal método de disseminação e transmissão de grande número de patógenos para novas áreas de cultivo geralmente é por meio de sementes infectadas, ou, contaminadas. A quantidade de inóculo inicial nas sementes influencia na epidemia de doenças, podendo assim não só reduzir a qualidade fisiológica deste insumo como constituir focos primários de infecção no cultivo (Danielli et al., 2011). A associação de fitopatógenos com sementes é responsável pela transmissão de doenças tanto para a parte aérea quanto para o sistema radicular o que pode levar a morte de plântulas (Machado, 2000). Sendo assim, o uso de sementes das culturas com alto padrão de sanidade é uma das principais medidas de controle de doenças (Silva et al., 2008).

A qualidade de sementes é definida por um somatório entre os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de desempenhar funções vitais que estão relacionados à sua germinação, vigor e produtividade (Carvalho & Nakagawa, 2000). Portanto, na qualidade de semente de feijão, deve-se levar em consideração o seu estado fitossanitário, relacionado à presença de microrganismos como fungos, bactérias e vírus que afetam a germinação e vigor de sementes culminando no decréscimo de produção e produtividade (Freitas, 2005). Neste sentido, sementes de feijão infectadas por *C. lindemuthianum* têm a sua qualidade comprometida durante o estabelecimento da cultura e, também, na transmissão do fungo, uma vez que já é conhecido que a semente é o principal mecanismo de sobrevivência e dispersão do fungo que pode sobreviver como micélio dormente no tegumento e cotilédones e na forma de esporos (Maffia et al., 1988; Rava et al., 1994).

No âmbito de melhoramento genético, existem algumas variedades de cultivares de feijão que estão distribuídas entre os principais grupos comerciais (Preto, Carioca, Vermelho e Manteigão). A cultivar Pérola, que pertence ao grupo carioca, é uma das recomendadas

para o Estado de Minas Gerais, possui porte semi-ereto, grão graúdo e alta produtividade, entretanto também é suscetível ao *C. lindemuthianum* (Carneiro et al., 2015; Paula Júnior et al., 2010).

Diante da escassez de informações sobre eventos que ocorrem na interação de *C. lindemuthianum* com sementes de feijão, a proposta neste trabalho foi avaliar com mais profundidade e detalhes os efeitos pontuais deste fungo em associação com sementes da referida leguminosa, tendo-se como referências diferentes potenciais de inóculo do patógeno e duas temperaturas de cultivo do feijoeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Origem e multiplicação de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65) e perfil das sementes**

Para este estudo foi usado um isolado de *C. lindemuthianum* (LV238), raça 65, fornecido pelo laboratório de Resistência de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. Este isolado foi cultivado em meio M3 [10 g de sacarose, 20 g de ágar, 2 g de  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 g de neopeptona/peptona, 4 mL de panvit e 1 mL de cloranfenicol por litro de água destilada], em placas de Petri de 15 cm e mantido em câmara BOD a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Como representante do feijoeiro foi usada a cultivar Pérola do grupo Carioca que é considerada suscetível a *C. lindemuthianum* (raça 65), tendo as sementes apresentado um percentual de germinação de 95,5% (Brasil, 2009a) e incidências de 0,5% de *Aspergillus flavus* e 0,5% de *Penicillium* sp., detectados por teste de sanidade (Brasil, 2009b).

### **Obtenção de sementes infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* com diferentes potenciais de inóculo**

Para a obtenção de sementes infectadas foi utilizada a metodologia de condicionamento osmótico proposta por Machado et al. (2012). As sementes foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e submetidas à tríplice lavagem em água destilada, com posterior secagem sobre duas folhas de papel *Germitest* dentro de bandejas plásticas, em ambiente de laboratório por 48 horas. Colônias do fungo com sete dias de idade foram obtidas em placas de Petri contendo meio M3, adicionado de manitol com potencial ajustado para -1,0 MPa (Michel & Radcliffe, 1995). Sobre este meio foram distribuídas as sementes em camada simples e de forma homogênea. As placas com

sementes foram mantidas em câmara do tipo BOD a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, e expostas às colônias fúngicas por períodos de 0, 36, 72, 108 e 144 horas, que corresponderam aos diferentes potenciais de inóculo denominados: P0, P36, P72, P108 e P144, respectivamente. Após cada período de contato entre fungo e sementes, estas foram transferidas para bandejas de plástico contendo duas folhas de papel *Germitest*, permanecendo em temperatura ambiente por 48 horas.

### **Testes de laboratório - Avaliação de efeitos de *Colletotrichum lindemuthianum* no desempenho de sementes inoculadas**

Para os testes a seguir foi realizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições.

**a) Teste de Germinação (Rolo de papel):** conduzido com quatro repetições de 50 sementes. Estas foram distribuídas sobre duas folhas de papel *Germitest*, que foram previamente umedecidas (2,5 vezes o peso do papel) com água destilada, e depois recobertas por uma terceira folha de papel umedecida, sendo em seguida, feitos rolos que foram acondicionados em sacos de polietileno de coloração preta com perfurações no topo. Este conjunto foi mantido em sala de incubação a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro contínuo durante nove dias. As leituras foram realizadas aos cinco e aos nove dias de incubação, de acordo com RAS (Brasil, 2009a) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

**b) Teste de sanidade (Rolo de papel):** Foi realizado o mesmo procedimento do teste de germinação, com duzentas sementes, sendo que após os nove dias de incubação, o tegumento de cada semente foi removido para exame a olho nu dos cotilédones, para detectar lesões, necróticas circulares, pardo-escuras com bordos, bem definidos e deprimidas, de coloração avermelhada, típicas de *C. lindemuthianum* (Brasil, 2009b).

**c) Condutividade elétrica:** para este teste foram usadas quatro repetições de 50 sementes, previamente pesadas e imersas em 75 mL de água deionizada e mantidas em câmara BOD durante 24 horas a  $25^\circ\text{C}$ . A condutividade elétrica da solução foi determinada por condutivímetro mCA150. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de sementes (Kryzanowski et al., 1999).

### **Testes de emergência em substrato de solo**

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), índice de doença (ID), estandes inicial e final e Peso fresco e seco de parte aérea, foi usado o delineamento em blocos

casualizado (DBC) com quatro repetições por tratamento.

**a) Avaliação do índice de velocidade de emergência (IVE):** cem sementes foram semeadas, individualmente, em copos plásticos de 200 mL contendo substrato comercial PLANTMAX<sup>®</sup>, areia e solo na proporção de 1:1:1. Os copos foram distribuídos em quatro bandejas plásticas contendo 25 copos, cada bandeja correspondia a uma repetição. O experimento foi conduzido em duas câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz. Desde a emergência da primeira plântula foi feita a contagem diária até a estabilização do estande por três dias consecutivos quando os cotilédones apareciam acima do substrato. As plantas foram mantidas nestas condições por até 28 dias após semeadura (D.A.S.). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado de acordo com Maguire (1962).

$$IVE = \frac{E1}{N1} + \frac{E2}{N2} + \dots + \frac{En}{Nn}$$

Sendo: IVE = índice de velocidade de emergência. E1, E2,... En = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem. N1, N2,... Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

**b) Estandes, inicial e final (%):** os estandes inicial e final foram avaliados aos 5 e 28 dias após a semeadura, respectivamente, e o valor absoluto de plantas estabelecidas em relação ao número de sementes utilizadas.

**c) Altura de plantas (cm):** foram consideradas 10 plantas aleatórias por parcela, no estande final, as quais foram medidas desde a base do colo até o ápice foliar com o uso de uma régua graduada com precisão de milímetros.

**d) Peso fresco e seco da parte aérea de plantas:** após os 28 dias de semeadura, as plantas foram cortadas na base da haste e pesadas ainda frescas; em seguida foram levadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a  $70^\circ\text{C}$  por 7 dias e depois novamente pesadas. Os resultados foram expressos em  $\text{g.planta}^{-1}$ .

**e) Índice de doença (ID):** a ocorrência da antracnose foi avaliada ao longo dos 28 dias utilizando-se uma escala arbitrária com as seguintes notas: 0 – plantas assintomáticas; 1 – plantas emergidas com sintomas de antracnose nos cotilédones, hastes e/ou folhas e 3 – sementes ou plantas mortas em pré- emergência. Os valores anotados foram inseridos na fórmula de índice de doença proposta por McKinney (1923):

$$ID = \frac{\sum(f.v)}{n.x} . 100$$

Onde: ID = Índice de doença (%); f = número de plantas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plantas avaliadas e x = grau máximo de infecção.

Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas infectadas por *C. lindemuthianum*.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi com o programa Sisvar<sup>®</sup> versão 5.6 (FERREIRA, 2011). Quando a variável foi significativa no teste F, as médias entre os tratamentos foram comparadas por teste de regressão a 5% de probabilidade (IVE, estande inicial e final, altura, peso fresco e seco da parte aérea de plantas e índice de doença).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em relação a germinação de sementes, não houve diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos deste ensaio, o que não ocorreu com as variáveis sanidade e vigor, cujas diferenças foram significativas (Tabela 1). Para IVE, estandes, inicial e final, altura, peso fresco e seco da parte aérea de plantas e ID, a análise de variância não apresentou significância ( $p \leq 0,05$ ) entre estas variáveis estudadas (Tabela 2).

Durante a condução dos ensaios, observou-se que as sementes incubadas no meio de cultura contendo o restritor hídrico e sem a presença do fungo, não sofreram interferência do manitol.

**Tabela 1.** Resultados de regressão das médias, significância e coeficiente de variação (CV) dos testes conduzidos com sementes inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, em diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h).

Testes em laboratório			
Tratamentos	Germinação (%)	Incidência (%)	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )
P0	96	0*	65*
P36	92	0*	71,19*
P72	91	8*	78,63*
P108	90	13*	89,41*
P144	87	41*	97,44*
CV (%)	3,32	18,99	3,51

\*Significante 0,05%

**Tabela 2.** Resultados de regressão das médias, significância e coeficiente de variação (CV) dos testes conduzidos com sementes inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, em diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), e cultivadas a temperatura de 20 e 26°C.

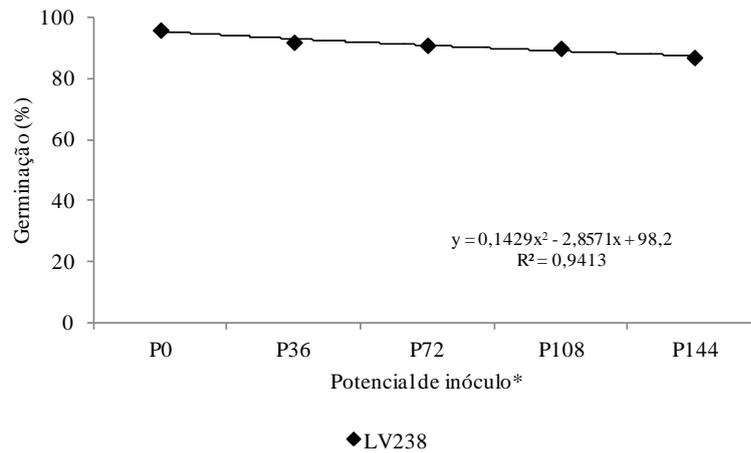
Testes em câmara de crescimento vegetal							
Tratamentos	IVE*	Estande Inicial (%)	Estande Final (%)	Altura (cm)	Peso fresco de PA (g)	Peso seco de PA (g)	ID (%)
P0 - 20°C	4	38	80	30,02	52,37	4,7	0
P36 - 20°C	3,25	26	64	26	51,64	4,44	1,99
P72 - 20°C	3,24	19	67	20,83	51	3,31	3
P108 - 20°C	3,99	22	85	20,75	46,54	2,96	8,33
P144 - 20°C	3,64	27	71	17,9	36,69	2,22	9,66
P0 - 26°C	7,2	95	95	73,2	57,03	5,7	0
P36 - 26°C	6,69	89	87	64,82	57,19	4,64	3
P72 - 26°C	5,49	72	73	58,71	52,46	4,8	2,33
P108 - 26°C	6,5	83	84	57,31	46,31	4,58	4
P144 - 26°C	6,26	82	77	43,65	40,47	3,95	8,67
CV (%)	25,91	39,66	21,84	23,73	32,22	17,01	25,86

\*IVE- Índice de velocidade de emergência

\*\*Significante 0,05%

No teste de germinação em laboratório (Figura 1), foi possível observar um resultado inverso entre os percentuais de germinação de sementes da cultivar usada e os potenciais de inóculo. Neste caso a tendência dos efeitos em relação aos potenciais pode ser considerada menos acentuada em comparação com outros trabalhos deste tipo de investigação com outros patossistemas. A menor porcentagem de plântulas normais, 87%, ocorreu quando as sementes

de feijão foram expostas ao fungo no maior potencial de inóculo P144. Já a maior porcentagem de plantas normais, 96%, ocorreu quando as sementes não foram expostas ao fungo, potencial P0. No menor potencial de inóculo P36, o percentual de germinação foi de 92%, não se diferenciando estatisticamente do tratamento da testemunha, P0.

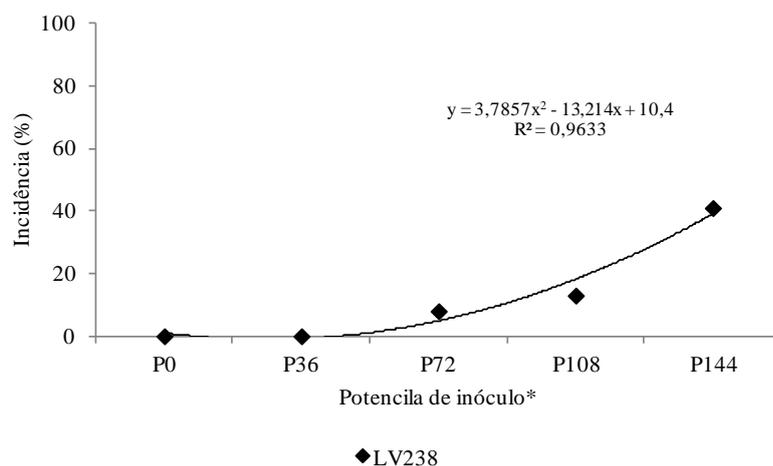


**Figura 1.** Porcentagem de plântulas normais da germinação de sementes de feijão, cultivar Pérola, inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob a temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Estes resultados corroboram os resultados observados por Carvalho (1999), que demonstrou que o fungo exerceu uma leve influência na germinação das sementes com base na formação de plântulas normais. Importante ressaltar que a presença de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão, mesmo em altos potenciais de inóculo não provocam danos iniciais tão drásticos na germinação como verificado em outros patossistemas, cuja ação inicial dos patógenos determina em grande escala ao colapso de plantas em fase de pré-emergência. Embora as relações de comportamento em outros patossistemas sejam variáveis, observa-se que os resultados deste estudo apresentam uma tendência semelhante com outros trabalhos desenvolvidos nesta linha de abordagem. Em estudos com o patossistema *S. sclerotiorum* e sementes de feijão, Botelho et al. (2013) observaram que este patógeno foi capaz de afetar drasticamente o desempenho de sementes de feijão em condições favoráveis para sua atuação. Houve um decréscimo no percentual de germinação das sementes na ordem de 66,0% entre os potenciais P36 para P96. Rey et al. (2008) observaram também que a germinação de sementes de feijão avaliadas por teste padrão de germinação foi influenciada negativamente quando inoculadas por *C. lindemuthianum* em três diferentes potenciais osmóticos (- 0,6, -0,8 e -1,0 MPa) e dois solutos (NaCl e sacarose) com tempo de exposição das sementes ao patógeno por

96 e 168 horas. Por sua vez Fernandes et al. (2016) concluíram que sementes de milho de cultivar suscetível tem sua qualidade fisiológica comprometida quando inoculadas com o complexo *Stenocarpella* sp. em diferentes potenciais de inóculo, tendo observado efeitos dos fungos a partir de P24, correspondente ao tempo de 24 horas de exposição das sementes ao patógeno.

No teste de sanidade (Figura 2) ficou claro que o maior valor percentual de ocorrência do fungo observado foi de 41%, referente às sementes infectadas no maior potencial de inóculo, P144. Por outro lado sementes infectadas com os menores potenciais de inóculo, P0 e P36, não apresentaram ocorrência do patógeno estudado. Resultados semelhantes foram observados por Carvalho (1999) quando trabalhou com o mesmo patossistema em condições de laboratório. Estes resultados revelam que a infecção das sementes por *C. lindemuthianum* em baixo potencial de inóculo não produz sintomas típicos da antracnose nas plântulas oriundas de sementes inoculadas. Provavelmente nas condições do teste de sanidade, rolo de papel, o nível de infecção correspondente ao menor potencial de inóculo é insuficiente para provocar lesões de coloração marrom-escuras ou negras deprimidas nos cotilédones (Carneiro et al., 2015). Vale salientar que o teste de sanidade, rolo de papel, para detecção de *C. lindemuthianum* é um teste de natureza patogênica e não baseado na observação de estruturas do fungo sobre as sementes, conforme é o caso do blotter teste.

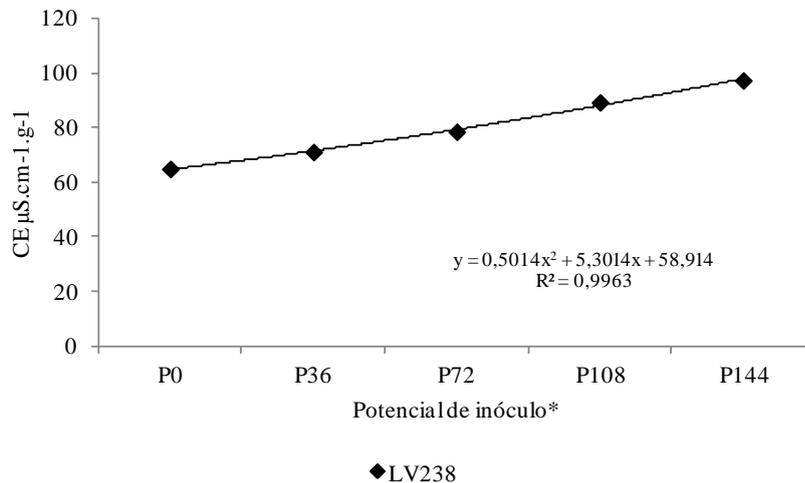


**Figura 2.** Porcentagem de incidência de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, em sementes de feijão, cultivar Pérola, inoculadas em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h) sob a temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  de acordo com o teste de rolo de papel.

Para outros patossistemas como: *Bipolaris sorokiniana* - trigo e *Colletotrichum*

*gossypii* var. *cephalosporioides* – algodão, percebe-se que há uma alta correlação inversa entre os níveis de potencial de inóculo dos patógenos e os percentuais de incidência observados nos testes de sanidade (Barrocas et al., 2014; Farias et al., 2010).

Em relação aos efeitos do patógeno no vigor de sementes de feijão, avaliado por condutividade elétrica, foi observado que em todas as sementes inoculadas com os diferentes potenciais de inóculo (P36, P72, P108 e P144) houve comprovação da ação de *C. lindemuthianum* (Figura 3). O menor valor observado em sementes com a presença do fungo foi no potencial P36 (71,19) quando comparado com os demais potenciais. O maior nível de deterioração e danos às membranas das sementes (97,44) ocorreu no maior potencial de inóculo (P144) representado por elevados índices das leituras da condutividade elétrica, indicando perdas de eletrólitos lixiviados que refletem em diminuição do vigor das sementes.

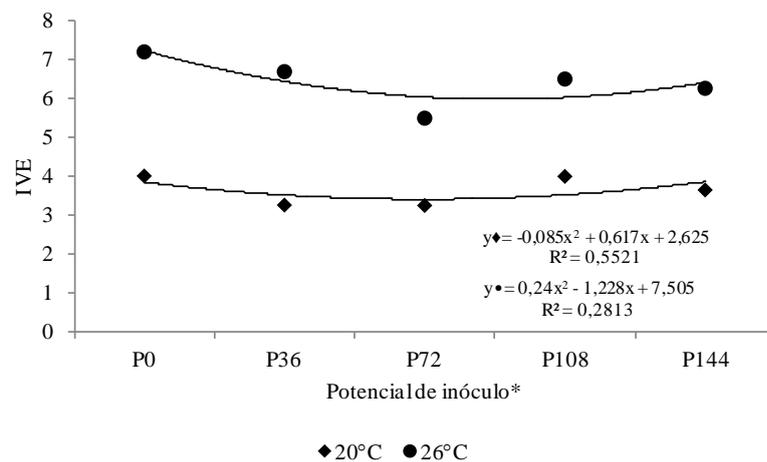


**Figura 3.** Valores médios de condutividade elétrica de sementes de feijão, cultivar Pérola, inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h).

Para outros patossistemas, como *Stenocarpella maydis* - milho (Siqueira et al., 2014), observou-se que há um mesmo padrão de correlação dos resultados conforme encontrados neste estudo. Estes evidenciam a alta sensibilidade do método de condutividade elétrica como indicador da ação de patógenos que infectam sementes, como é o caso de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão.

De acordo com as variáveis utilizadas para avaliação do desempenho das plantas, originadas de sementes inoculadas com diferentes potenciais de inóculo do agente da antracnose do feijoeiro, em cultivo controlado, foi possível comprovar e dimensionar os efeitos danosos e limitantes causados nesta interação. Observando o índice de velocidade de

emergência (Figura 4) verificou-se que plantas desenvolvidas a partir de sementes com potencial de inóculo P0, cultivadas à temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas apresentaram um maior índice de vigor (IVE - 7,20), em relação aos demais tratamentos, cujas sementes foram inoculadas. Em condições de temperatura mais baixa,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, os índices de vigor foram em geral menores do que em temperatura de  $26^\circ\text{C}$ . Esses resultados reafirmam o conhecimento que se dispõe sobre a epidemiologia da antracnose do feijoeiro, com o qual se sabe que esta doença é mais favorecida por temperaturas mais amenas e alta umidade ambiente (Carvalho, 1999; Pinto et al., 2001; Talamini et al., 2001). Embora não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos no teste de vigor em substrato de solo (IVE), para as duas temperaturas de cultivo, contudo, foi possível observar sintomas característicos da antracnose em plantas emergidas.



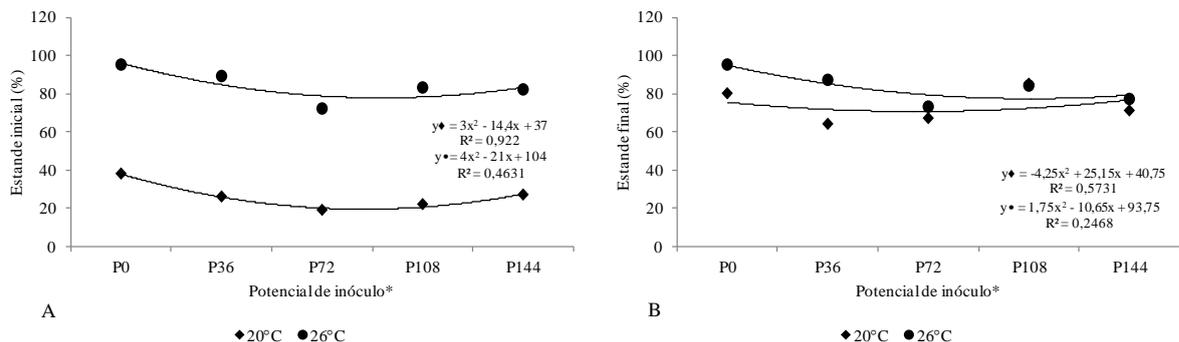
**Figura 4.** Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de feijoeiro, cultivar Pérola, originadas de sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob duas temperaturas de cultivo (20 e  $26^\circ\text{C}$ ).

No cultivo a  $20^\circ\text{C}$ , além da diminuição do vigor, foram observadas lesões nos cotilédones, hastes/caules e folhas, desde os primeiros estádios até a morte de plantas em pós-emergência, principalmente para as plantas originadas de sementes com potencial de inóculo P144, o que não foi verificado nas plantas cultivadas a  $26^\circ\text{C}$ . Em estudos com murcha de fusarium em algodoeiro, Araújo et al. (2016) observaram que sementes desta cultura inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em diferentes tempos de contato do fungo com as sementes, apresentaram danos severos em relação ao vigor. Semelhante a este estudo, Rocha et al. (2014) observaram também que sementes de soja submetidas a diferentes

potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* apresentaram IVE comprometido, tendo ocorrido colapso das plantas oriundas de sementes contaminadas com o fungo nos potenciais de inóculo mais elevados.

Embora o ajuste das curvas de regressão tenha sido feito de acordo com os princípios da estatística, percebe-se que pelos baixos coeficientes de determinação, houve uma correlação alta entre as duas variáveis comparadas neste estudo.

Em relação aos estandes, inicial e final, foram observadas variações na população de plantas em todos os tratamentos, e principalmente, entre as duas temperaturas de cultivo. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os potenciais de inóculo para plantas cultivadas em ambas as temperaturas (Figura 5A e 5B). Para estande inicial observou-se que plantas cultivadas à temperatura de 26°C apresentaram maior crescimento quando comparadas as plantas que foram cultivadas à 20°C. Contudo, vale ressaltar que *C. lindemuthianum* pode permanecer nas plantas até o fim do ciclo da cultura e nas sementes produzidas, e essas podem representar fonte de disseminação de inóculo para novos cultivos.



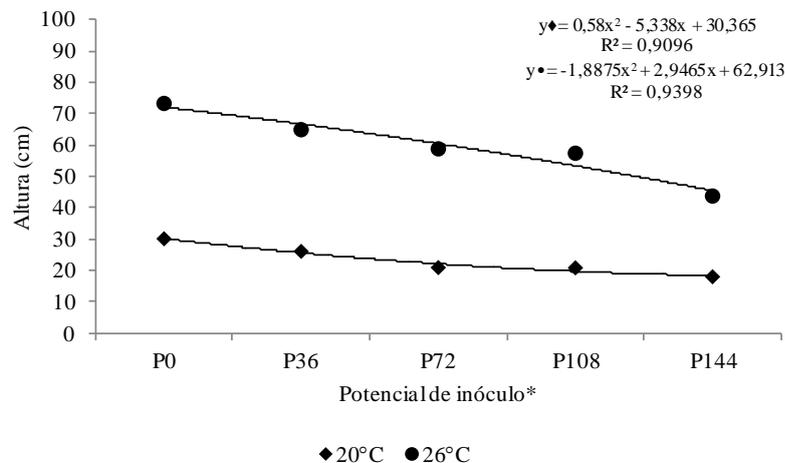
**Figura 5.** Estande inicial (A) e Estande final (B) de plantas de feijoeiro, cultivar Pérola, originadas de sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob duas temperaturas de cultivo (20 e 26°C).

Diferente dos resultados deste estudo, outros trabalhos envolvendo outros patossistemas, como *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão e soja, *Stenocarpella maydis* em milho, têm demonstrado que o desempenho das sementes infectadas por estes patógenos é afetado severamente na proporção dos potenciais de inóculo (Siqueira et al., 2014; Zancan et al., 2015).

Em relação ao índice de morte de plântulas/plantas em pós-emergência ao longo dos 28 dias, verificou-se que *C. lindemuthianum* não provocou reduções significativas desta variável, ao contrário do que ocorre em outros casos já relatados em literatura (Sousa et al.,

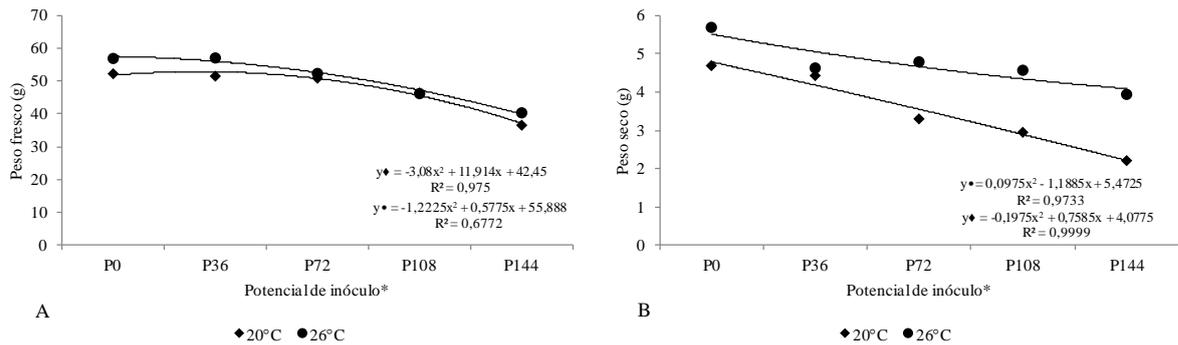
2008; Siqueira et al., 2014; Zancan et al., 2015).

A altura média das plantas avaliadas a 20 e 26°C sofreu decréscimos de acordo com o aumento do potencial de inóculo das sementes inoculadas e em função da temperatura de cultivo (Figura 6). Os maiores valores de altura foram observados em plantas provenientes de sementes sem infecção (P0) (73,2 e 30,02 cm, para 26 e 20°C de cultivo, respectivamente) e os menores ocorreram nas plantas que ficaram expostas ao fungo no P144 (43,65 e 17,9 cm) respectivamente e cultivadas à 26 e 20°C.



**Figura 6.** Altura média (cm) de plantas de feijoeiro, cultivar Pérola, originadas de sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob duas temperaturas de cultivo (20 e 26°C).

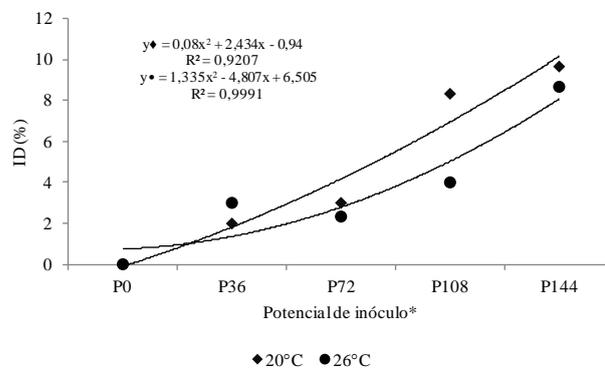
À semelhança de outros indicadores de desempenho usados neste trabalho observou-se, também, decréscimo dos pesos fresco e seco da parte aérea das plantas de feijão com o aumento dos potenciais de inóculo. Os tratamentos com potencial P144 provocaram reduções de pesos de plantas inferiores às médias, independentemente da temperatura. Os pesos frescos variaram entre 52,37 e 57,03 g para o menor potencial P0 e os menores foram 36,69 e 40,47 g, para o maior potencial P144 para as plantas que foram cultivadas a 20 e 26°C respectivamente (Figuras 7A e B).



**Figura 7.** Valores médios do peso fresco (A) e seco (B) (g) da parte aérea de plantas de feijoeiro, cultivar Pérola, originadas de sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob duas temperaturas de cultivo (20 e 26°C).

É importante salientar que as reduções das variáveis utilizadas neste estudo, em função dos potenciais de inóculo, foram em geral inferiores aos valores observados em outros patossistemas (Botelho et al., 2013; Araújo et al., 2016).

O aumento dos valores de índice de doença (ID) observado nas plantas de feijão avaliadas foi proporcional ao aumento dos potenciais de inóculo, porém em menor intensidade comparado a outros patossistemas. No presente estudo apenas uma pequena fração das sementes inoculadas produziram plantas com sintomas da antracnose, não havendo, portanto proporcionalidade entre os índices de doença e a formação de plantas com antracnose, mesmo em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Os maiores índices, 9,66 e 8,67% foram observados no potencial P144 para 20 e 26°C, respectivamente (Figura 8).



**Figura 8.** Índice de doença (ID) de plantas de feijoeiro, cultivar Pérola, originadas de sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, em \*diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h), sob duas temperaturas de cultivo (20 e 26°C).

Os valores dos indicadores de efeitos da raça 65 de *C. lindemuthianum* neste trabalho deixam claro que a ação deste patógeno é menos drástica do que outros patossistemas, para os quais foi utilizada a mesma metodologia seguida neste trabalho.

## CONCLUSÕES

A germinação e o vigor de sementes de feijão e demais indicadores do crescimento de plantas foram afetadas negativamente por *Colletotrichum lindemuthianum* no potencial de inóculo mais elevado.

A baixa correlação entre os valores de potencial de inóculo e o desempenho de sementes observada nesse trabalho, indica que *Colletotrichum lindemuthianum* não é um patógeno determinante de mortes de feijoeiro em pré-emergência no solo.

Os efeitos deletérios do patógeno no desempenho das sementes de feijão são mais pronunciados em temperatura mais baixa, 20°C, sendo observado que os maiores índices de doença ocorreram em plantas originadas de sementes com os potenciais de inóculo mais elevados nesta temperatura.

Os sintomas da antracnose oriundos de sementes infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* não ocorrem proporcionalmente aos potenciais de inóculo do patógeno associado às sementes de feijão.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras. À Universidade Pedagógica de Quelimane. À CAPES e CNPq por apoio financeiro. À Seprotec por fornecer as sementes utilizadas neste estudo.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D.V.; MACHADO, J.C.; PEDROZO, R.; PFENNING, L.H.; KAWASAKI, V.H.; NETO, A.M.; PIZATTO, J.A. Transmission and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on cotton seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.20, p.1815-1823, 19 May, 2016.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and Molecular Diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South Central, and North America. **Phytopathology**, v.87, n.12, p.1184-1191, 1997.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J. C.; ALVES, M. C.; CORRÊA, C.L. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.30, n.2, p.421-428, Mar./Apr., 2014.

BOTELHO, L.S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.153-160, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

CARNEIRO, J.E.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: ED. UFV, 2015. 384p

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

DANIELLI, A.L.; FIALLOS, F.R.G.; TONIN, R.B.; FORCELINI, C.A. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja em função do tratamento químico de sementes e foliar no campo. **Ciencia y Tecnología**, v.4, n.2, p.29-37, 2011.

FARIAS, C.R.J.; Del PONTE, E.M.; CORRÊA, C.L.; AFONSO, A.P.; PIEROBOM, C.R. Infecção de sementes de trigo com *Bipolaris sorokiniana* pela técnica de restrição hídrica. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.4, July-August, 2010.

FERNANDES, J.S; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; TEIXEIRA e SILVA, G.S.; PAIVA, A.L.C.; CARVALHO, E. R. Inoculum potential of *Stenocarpella* complex and its relation with physiological quality of corn seeds. **Científica**, Jaboticabal, v.44, n.3, p.362-370, 2016.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FREITAS, R.A. **Patologia de semente de feijão**. 2005. Disponível em: <<http://orbita.starmedia.com/fitopatologia/patofeijao.htm>>. Acesso: 7 jun. 2017.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEP, 2000. 138p.

MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M; MACHADO, C. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.20, p.37-63, 2012.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madson, v.2, n.75, p.22-34, mar., 1962.

MAFFIA, L.A.; CARMO, M.G.F.; KATSURAYAMA, Y. **Epidemiologia e controle das principais doenças do feijoeiro**. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 3., 1998. Piracicaba. *Anais...*Campinas: IAC, 1998. p.103-126.

MCKINNEY, H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, n.3, p.195-217, jan., 1923.

McCONNELL, M.; MAMIDI, S, LEE R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M.; PAPA, R.; McCLEAN, P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.1103-16, 2010.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, n.1, p.131-136, 1995.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO. **Guia técnico produção de feijão**. EPAMIG. Viçosa, MG. 2010. 102p.

PINTO, A.C.S.; POZZA, E.A.; TALAMINI, V.; MACHADO, J.C.; SALES, N.L.P.; GARCIA JÚNIOR, D.; SANTOS, D.M. Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.392-398, 2001.

RAVA, A.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C.R.; BALARDIN, R.S. Inoculação de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Colletotrichum lindemuthianum* usando diferentes níveis de restrição hídrica. **R. Bras. Agrobiologia**, Pelotas, v.14, n 4-4, p.112-116, out-dez, 2008.

- REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C.R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.3, p.465-470, jul./set., 2009.
- ROCHA, F.S.; CATÃO, H.C.R.M.; BRANDÃO, A.A.; GOMES, L.A.A. Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, n.6, p.2895-2904, nov./dez., 2014.
- SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.1, p.29-34, jan./mar., 2008.
- SIQUEIRA, C.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; SILVA, U.A.; DIAS, I.E. Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. **Journal of Seed Science**, v.36, n.1, p.079-086, 2014.
- SOUSA, M.V.; MACHADO, J.C.; PFENNING, L.H.; KAWASAKI, V.H.; ARAÚJO, D.V.; SILVA, A.A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.041-048, January- February, 2008.
- 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**, v.10, p.219-248, 2001.
- ZANCAN, W.L.A; MACHADO, J.C.; BAUTE, N.L.; SOUSA, B.F.M. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.31, n.3, p.775-784, May/June, 2015.

**ARTIGO 2****TRANSMISSÃO POTENCIAL DE *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65) EM ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE FEIJÃO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

POTENTIAL TRANSMISSION OF *Colletotrichum lindemuthianum* (race 65) IN ASSOCIATION WITH BEAN SEEDS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Preparado de acordo com a Revista de Ciência Agronômica (versão preliminar)

**Stélio Jorge Castro GADAGA<sup>1\*</sup>, José da Cruz MACHADO<sup>1</sup> e Carolina da Silva SIQUEIRA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil. \* Autor para correspondência steliogadaga@gmail.com.

## RESUMO

A antracnose do feijoeiro, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* é uma das principais doenças que ocorre no feijoeiro e as perdas podem chegar a 100%. A transmissão deste patógeno de sementes para plântulas/plantas pode variar de acordo com as condições ambientais e nível de inóculo, dentre outros fatores. O objetivo deste trabalho foi quantificar a taxa de transmissão de *C. lindemuthianum*, raça 65, a partir de sementes de feijão (cv. Pérola) infectadas para plântulas/plantas em condições favoráveis. A inoculação das sementes foi realizada pela técnica de condicionamento osmótico com o intuito de se conseguir sementes com diferentes potenciais de inóculo, em função do tempo de exposição das sementes com o fungo em cultura pura, sendo os potenciais denominados: 0, 36, 72, 108 e 144. Sementes não inoculadas e inoculadas foram semeadas individualmente e mantidas em câmaras de crescimento vegetal com duas temperaturas de crescimento, 20 e 26 °C por um período de 28 dias. Foi possível observar que, tanto as plantas assintomáticas quanto as sintomáticas apresentaram a transmissão do patógeno, e plantas sintomáticas, os sintomas típicos da doença nas duas temperaturas de cultivo. A maior taxa de transmissão total (92%) ocorreu nas plantas em que suas sementes ficaram expostas por 144 horas e cresceram a 20 °C.

**Palavras-chave:** Transmissão. Antracnose do Feijoeiro. Potencial de Inóculo.

## ABSTRACT

The anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, in common bean is one of the main diseases affecting this crop in Brazil. Field losses can reach 100%. The pathogen transmission from seeds to seedlings/plants may vary according to the environmental conditions, initial inoculum level among other factors. The objective in this work was to quantify the transmission rate of *C. lindemuthianum*, race 65, from infected bean seeds (Pérola cv.) to seedlings/plants under controlled conditions. Seeds were infected by the pathogen following methodology described in literature, by which different levels of inoculum potential are obtained. In this work 4 inoculum levels named P0, P36, P72, P108 and P144 were used. Inoculated and non-inoculated seeds were sown in two growth chambers at 20 and 26 °C for a period of 28 days. It was observed that in both asymptomatic and symptomatic plants for anthracnose transmission and production of typical symptoms of the disease were observed at both temperature conditions. The highest transmission rate (92%) occurred in plants emerged from seeds with the highest level of inoculum potential at 20 °C.

**Keywords:** Transmission. Common bean anthracnoses. Inoculum Potential.

## INTRODUÇÃO

A antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. é uma das mais graves doenças do feijoeiro no Brasil, sendo este fungo transmitido pelas sementes que constituem focos importantes de inóculo nas áreas de cultivo, além de constituir-se em veículo eficaz para disseminação deste organismo (MARINGONI; BARROS, 2002; SARTORI *et al.*, 2004; VECHIATO *et al.*, 1997; VIEIRA, 1988). Diante destes conhecimentos percebe-se que uma das principais estratégias de controle da antracnose é o uso de sementes livres de patógenos, sendo possível assim evitar sua disseminação entre as plantas de uma mesma população e entre regiões produtoras (SARTORI; REIS; CASA, 2004; VIEIRA, 1988). No que diz respeito à transmissão de *C. lindemuthianum* de sementes para plântulas sabe-se que ela ocorre de forma rápida e eficaz; Rey *et al.* (2009) observaram que sementes de feijão da cultivar Líder, pertencente a classe de feijão branco, que ficaram expostas a *C. lindemuthianum* (raças 65, 73 e 81) por 96 horas, mesmo as sementes não tendo sido recobertas em 100% da área total, apresentaram altas taxas de transmissão do fungo, que variaram entre 70 e 80%. Além disso, observaram os sintomas típicos do fungo em todas as partes das plantas desde cotilédones, hastes e folhas. Anteriormente, já havia sido observada a reprodução de sintomas típicos da antracnose por Carvalho (1999), em ensaios de inoculação do fungo, por restrição hídrica, em sementes de feijão.

A presença do patógeno em sementes constitui fonte de inóculo primário, podendo provocar danos ao desempenho das sementes de maneira variável. Diversos fatores podem interferir no estabelecimento da cultura e causar reduções da população de plantas, diminuindo a produtividade e ainda permanecer nas sementes, que constituem fonte de inóculo para os novos cultivos (TALAMINI *et al.*, 2001).

Estudos de transmissão de *C. lindemuthianum* a partir de sementes de feijão não têm levado em conta a presença do patógeno em tecidos das plantas emergidas assintomáticas e sementes ou plântulas mortas, em pré-emergência. Estas avaliações ao lado da presença do patógeno em plantas sintomáticas são de extrema importância, em particular, do ponto de vista epidemiológico.

A probabilidade de transmissão do fungo aumenta com a colonização dos tecidos internos das sementes, em particular no embrião (AGARWAL; NEEGARD, 1979).

Diante deste cenário, o objetivo neste trabalho foi avaliar a transmissibilidade de *C. lindemuthianum* (raça 65) de sementes de feijão para plantas tendo-se como base diferentes níveis de potencial de inóculo e condições ambientais de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

### **Origem, multiplicação de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65) e perfil das sementes**

Para este estudo foi usado um isolado de *C. lindemuthianum* (LV238), raça 65, concedido pelo laboratório de Resistência de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. Este isolado foi cultivado em meio M3 [10 g de sacarose, 20 g de ágar, 2 g de  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 g de neopeptona/peptona, 4 mL de panvit e 1 mL de cloranfenicol por litro de água destilada], em placas de Petri de 15 cm e mantido em câmara BOD a  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Foi usada a cultivar Pérola do grupo Carioca que é suscetível a *C. lindemuthianum*, tendo as sementes apresentado um percentual de germinação inicial de 95,5%, avaliados de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009a) e incidências de *Aspergillus flavus* 0,5% e *Penicillium* sp. 0,5% detectados por teste de sanidade (BRASIL, 2009b).

O delineamento utilizado para a condução dos experimentos foi o de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento e duas temperaturas de cultivo.

### **Obtenção de sementes infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* com diferentes potenciais de inóculo**

Para a obtenção de sementes de feijão, cultivar “Pérola”, com diferentes níveis de potencial de inóculo do patógeno, seguiu-se a metodologia de condicionamento osmótico proposta por Machado *et al.* (2012). As sementes foram desinfectadas inicialmente com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e submetidas à tríplice lavagem em água destilada, com secagem posterior sobre duas folhas de papel *Germitest* dentro de bandejas plásticas, em ambiente de laboratório por 48 horas. Colônias do fungo com sete dias de idade foram obtidas em placas de Petri contendo meio M3 adicionado de manitol com potencial ajustado para -1,0 MPa (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Sobre este meio agarizado foram distribuídas as sementes em camada simples e de forma homogênea. As placas com sementes foram mantidas em câmara do tipo BOD a  $20 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas, por períodos de 0, 36, 72, 108 e 144 horas, que corresponderam aos diferentes potenciais de inóculo denominados: P0, P36, P72, P108 e P144, respectivamente. Após cada período de contato entre fungo e sementes, estas foram transferidas das placas de Petri para bandejas de plástico contendo duas

folhas de papel *Germitest*, permanecendo em temperatura ambiente por 48 horas.

### **Plantio em condições controladas e avaliações**

O delineamento utilizado para a condução dos experimentos foi o de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento e duas temperaturas de cultivo.

Por tratamento foram semeadas 100 sementes inoculadas, individualmente, em copos plásticos de 200 mL contendo mistura de substrato comercial PLANTMAX®, terra e solo na proporção de 1:1:1. Os copos foram acomodados em quatro bandejas plásticas contendo 25 copos, cada bandeja correspondia a uma repetição. O experimento foi conduzido em duas câmaras de crescimento vegetal com temperaturas ajustadas para  $20 \pm 2$  °C e  $26 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. As plantas foram mantidas nestas condições por até 28 dias após semeadura (D.A.S.). Diariamente foram contadas as plantas sintomáticas e assintomáticas.

Fragmentos de 2 cm de plantas sintomáticas e assintomáticas, retirados da altura do colo (C) e da última inserção foliar (IF), foram colocados em placas de petri contendo meio M3 a temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 h por sete dias para a confirmação da presença de *C. lindemuthianum* nos seus tecidos. Os fragmentos foram previamente desinfestados por 1 minuto em cada um dos seguintes produtos: álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e água destilada e esterilizada, posteriormente foram secos em papel esterilizado a temperatura ambiente. Após este período, os fragmentos foram avaliados individualmente em microscópio estereoscópico para observação das estruturas características de *C. lindemuthianum*.

A confirmação da transmissão do fungo de sementes para plantas foi assumida quando ao menos um dos fragmentos (colo ou última inserção foliar) indicava a presença *C. lindemuthianum*. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados com 1 cultivar, 2 temperaturas, e 4 potenciais de inóculo com 4 repetições por tratamento.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida com ajuda do programa Sisvar® versão 5.6 (FERREIRA, 2011). Para a morte em pré-emergência e variáveis de taxa de transmissão com observação de plantas sintomáticas e assintomáticas, as análises de variância foram corrigidas através da transformação dos dados em raiz quadrada ( $\text{dados}+1$ ). Quando a variável foi significativa no teste F, as médias entre os tratamentos foram comparadas por teste de regressão a 5% de probabilidade. Para o cálculo da taxa de transmissão total foram consideradas as plantas sintomáticas, assintomáticas e plantas mortas em pré-emergência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de variância para as variáveis, morte de sementes/plântulas em pré-emergência, taxas de transmissão em plantas sintomáticas e assintomáticas (incidência do fungo em partes das plantas assintomáticas) e a taxa de transmissão total de sementes para plantas emergidas, quando as sementes foram inoculadas com *C. lindemuthianum* (raça 65), revelaram diferenças não significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 1 e 2).

De acordo com os tratamentos testemunhas, não houve interferência do restritor hídrico manitol no desempenho das sementes.

**Tabela 1** - Resultados de regressão das médias, significância e coeficiente de variação (CV) das taxas de transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, para plantas a partir de sementes inoculadas com diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h).

Testes em câmara de crescimento vegetal				
Tratamentos	Morte em pré-emergência (%)	Taxa de transmissão em plantas sintomáticas (%)	Taxa de transmissão em plantas assintomáticas (%)	Taxa de transmissão total (%)
P0 - 20°C	5	0	0	5
P36 - 20°C	15	6	11	32
P72 - 20°C	24	9	14	47
P108 - 20°C	30	25	20	75
P144 - 20°C	35	29	28	92
P0 - 26°C	3	0	0	3
P36 - 26°C	8	5	1	14
P72 - 26°C	11	8	5	24
P108 - 26°C	15	10	7	32
P144 - 26°C	19	26	11	56
CV (%)	40,60	33,41	23,81	35,55

\*Significante 0,05%

**Tabela 2** - Resultados de regressão das médias, significância e coeficiente de variação (CV) da incidência de *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 65, isolado LV238, em duas regiões analisadas de plantas assintomáticas oriundas de sementes inoculadas com diferentes tempos de contato semente-fungo, correspondentes aos potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P72 (72h), P108 (108h) e P144 (144h).

Tratamentos	Plantas assintomáticas	
	Incidência em C* (%)	Incidência em IF* (%)
P0 - 20°C	0	0
P36 - 20°C	25	0
P72 - 20°C	75	0
P108 - 20°C	75	0
P144 - 20°C	74	25
P0 - 26°C	0	0
P36 - 26°C	81	19
P72 - 26°C	83	52
P108 - 26°C	89	36
P144 - 26°C	97	54
CV (%)	36,57	47,88

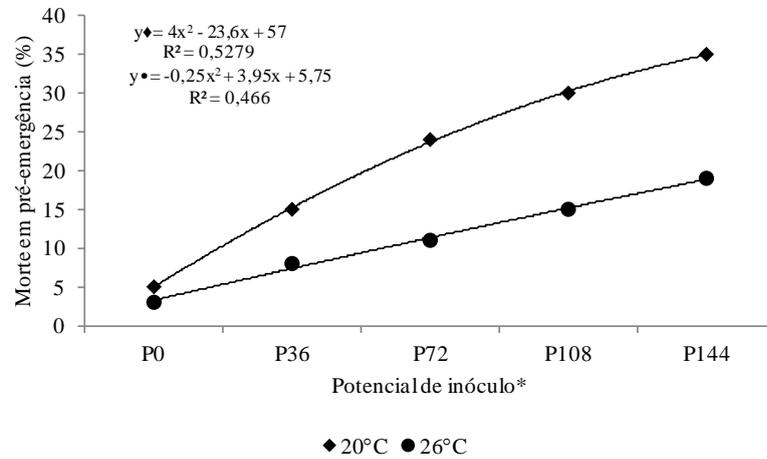
\*C- colo de planta assintomática; IF- última inserção de folhas de planta assintomática.

\*\*Significante 0,05%

Os resultados observados neste trabalho deixaram claro que o fungo *C. lindemuthianum* não causa efeitos muito significativos na morte de sementes em pré- emergência e plântulas de feijão, embora seus efeitos possam ser observados posteriormente com o aparecimento dos sintomas da antracnose em plantas emergidas, nos cotilédones, caule e folhas, o que constitui fontes de inóculo que podem disseminar o patógeno na cultura e a outros cultivos.

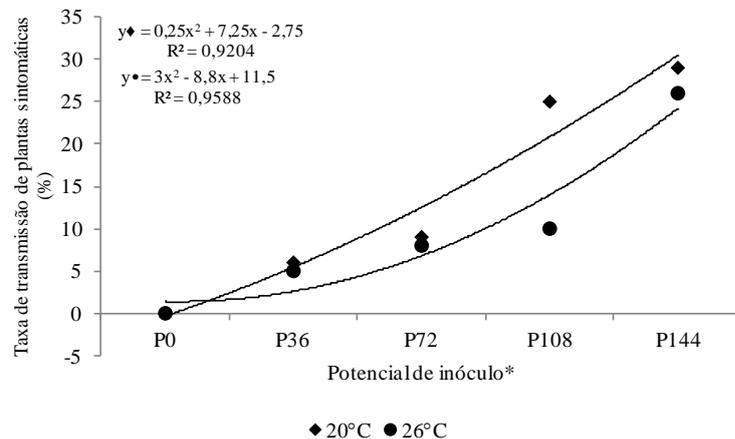
Houve o aumento de morte em pré- emergência em função do potencial de inóculo com a temperatura de 20 °C que é um fator que favorece o desenvolvimento da antracnose (Figura 1). A morte em pré- emergência de sementes e plantas variou entre 16 e 30%. Em trabalhos com outros patossistemas foi demonstrado que alguns patógenos são mais danosos às sementes em pré- emergência, a exemplo de, *Stenocarpella macrospora* que causou a morte em pré- emergência de sementes de milho em uma faixa entre 61 e 73,5% nos potenciais de inóculo mais elevados (SIQUEIRA *et al.*, 2014). Os resultados deste estudo demonstram que *C. lindemuthianum* não causa morte significativa do seu hospedeiro em pré- emergência lembrando que este patógeno não é considerado um organismo habitante de solo (HALL, 1991).

**Figura 1** - Percentual de morte em pré-emergência de sementes/plântulas de feijão (cultivar Pérola) inoculadas, com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65), em \*diferentes tempos de contato semente-fungo (0h, 36h, 72h, 108h e 144h), correspondentes aos potenciais de inóculo P0, P36, P72 P108 e P144, e cultivadas em duas temperaturas (20 e 26 °C).



Em relação à taxa de transmissão de *C. lindemuthianum* de sementes a plantas sintomáticas (Figura 2), as maiores taxas foram observadas nas plantas oriundas de sementes com potenciais de inóculo mais elevados, P108 e P144. Plantas cultivadas a temperatura de 20 °C apresentaram maior taxa de transmissão em plantas sintomáticas quando comparadas com plantas cultivadas a 26 °C, tendo os maiores potenciais de inóculo proporcionados maior taxa de transmissão do fungo, chegando a 29% (P144) enquanto a testemunha (P0) não apresentou transmissão.

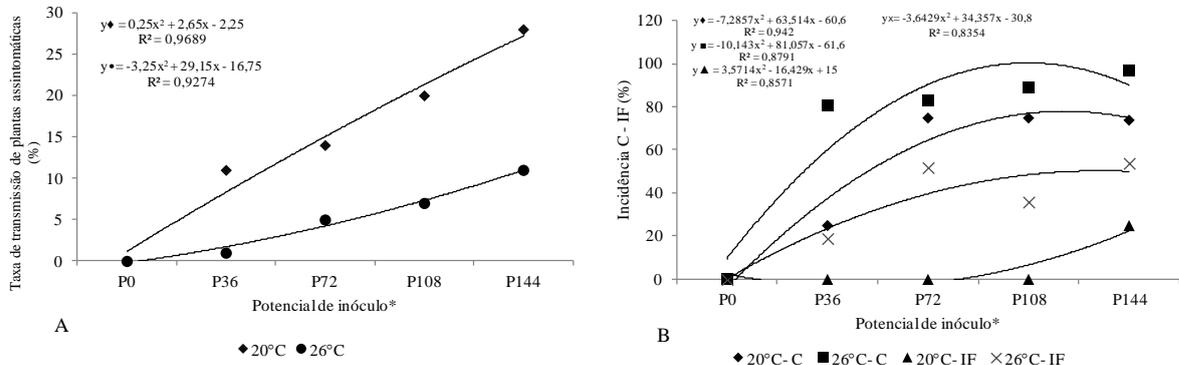
**Figura 2** - Taxa de transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65), isolado LV238, em plantas sintomáticas de feijoeiro (cultivar Pérola), originadas de sementes inoculadas em \*diferentes tempos de contato semente-fungo (0h, 36h, 72h, 108h e 144h), correspondentes aos potenciais de inóculo P0, P36, P72 P108 e P144, e cultivadas em duas temperaturas (20 e 26 °C).



Por esses resultados fica evidente que a temperatura de 20 °C é mais favorável à transmissão do fungo quando comparada a 26 °C. Exemplos nesta mesma linha de pesquisa revelam padrões diferentes deste tipo de transmissão embora haja uma tendência similar aos resultados deste estudo. Neste sentido, Venturoso *et al.* (2015) verificaram uma alta taxa de transmissão de *S. sclerotiorum* de sementes para plântulas de algumas oleaginosas. Por sua vez, Siqueira *et al.* (2014a, 2016b) em seus trabalhos de transmissão de *S. macrospora* e *S. maydis* em milho, observaram que as taxas de transmissão dos fungos foram proporcionalmente mais elevadas embora tenha havido uma proporcionalidade de efeitos inversos entre os potenciais de inóculo e desempenho de sementes. Percebe-se, portanto que há uma variação nos padrões de transmissão dos patógenos em função dos potenciais de inóculo inicial nas sementes. Essas variações entre valores de potencial de inóculo para cada patossistema faz com que estratégias de manejo das doenças correspondentes sejam consideradas para cada caso.

Pela exame de plantas assintomáticas (Figura 3A e 3B) emergidas das sementes inoculadas, observou-se que *C. lindemuthianum* estava associado aos tecidos da região do colo da planta e da última inserção foliar de algumas plantas. Esta constatação comprova a necessidade de exames mais cautelosos nestes tipos de estudo, uma vez que os tecidos infectados não sintomáticos podem garantir a introdução do fungo na lavoura ou em plantações distantes com consequências desastrosas para os produtores envolvidos nesta cultura. Vale lembrar que em trabalho clássico realizado por Tiffany em 1951, citado por Mendes (2014), nos Estados Unidos sobre transmissibilidade de *Colletotrichum truncatum* em soja, o inóculo deste patógeno foi capaz de atingir as sementes oriundas de sementes infectadas, sem apresentar sintomas aparentes.

**Figura 3** - Taxa de transmissão (A) e Incidência de *Colletotrichum lindemuthianum* (B) (raça 65), isolado LV238, na região do colo (C) e última inserção foliar (IF), em plantas assintomáticas de feijoeiro (cultivar Pérola), originadas de sementes inoculadas em \*diferentes tempos de contato semente-fungo (0h, 36h, 72h, 108h e 144h), correspondentes aos potenciais de inóculo P0, P36, P72, P108 e P144, e cultivadas em duas temperaturas (20 e 26 °C).



A maior taxa de transmissão do patógeno em plantas assintomáticas (28%) foi observada nas plantas cultivadas a temperatura de 20 °C e nos maiores potenciais de inóculo. A menor taxa (zero) foi observada no potencial de inóculo P0 em plantas cultivadas em ambas temperaturas utilizadas. Quando se compara, apenas, as incidências nas regiões do colo da planta e última inserção foliar, observou-se que as maiores ocorrências do fungo foram nos fragmentos oriundos da região do colo de plantas que cresceram a temperatura de 26 °C, com valor de 97% no potencial P144, e com valor de 74% no potencial P144 para 20 °C. Notou-se ainda que com o aumento dos potenciais de inóculo a incidência do fungo nos fragmentos examinados (C e IF) houve, também, aumento nas duas condições de temperatura, 20 e 26 °C. Siqueira *et al.* (2014a, 2016b) relatam que as maiores taxas de transmissão dos fungos *S. macrospora* e *S. maydis* em plantas assintomáticas de milho ocorreram na região do colo de plantas quando comparada com a região da última inserção de folhas. Por outro lado, Zancan *et al.* (2015) não observaram a presença de *S. sclerotiorum* em tecidos de plantas de girassol assintomáticas, partindo-se de sementes infectadas.

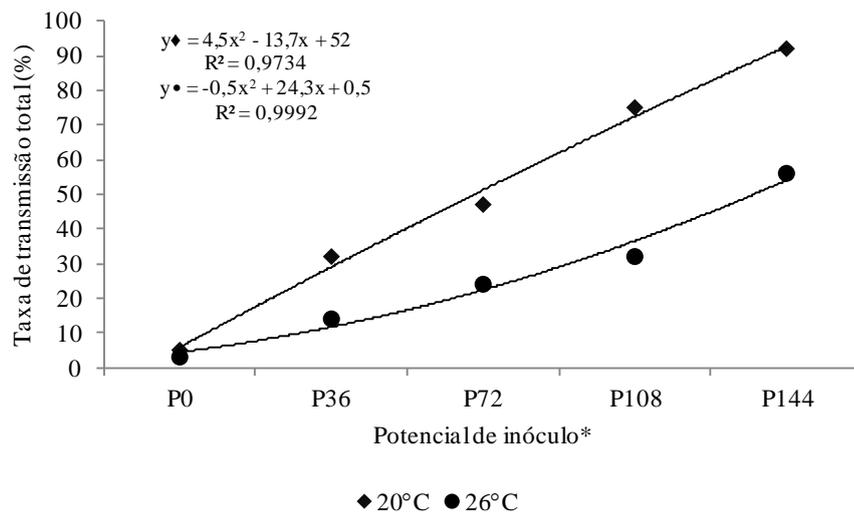
Com base no exame de plantas emergidas, nota-se que a média da taxa de transmissão de plantas assintomáticas com *C. lindemuthianum* em cultivo a 20 °C foi da ordem de 28% e a 26 °C este valor foi de 11%.

No que diz respeito à transmissão total de *C. lindemuthianum* (92%), em sementes de feijão, o maior valor percentual ocorreu no potencial de inóculo mais elevado, P144 a temperatura de 20 °C. À temperatura de 26 °C a taxa de transmissão total foi de 56% (Figura 4). Em outros patossistemas como *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, *S.*

*macrospora* e *S. maydis* em sementes de milho foi demonstrado que que estes patógenos proporcionaram uma taxa de transmissão total em níveis variados em função da temperatura de cultivo e do potencial de inóculo (SIQUEIRA *et al.*, 2014a, 2016b; ZANCAN *et al.*, 2015).

Diante destes resultados fica evidente que a taxa de transmissão de patógenos via sementes de espécies hospedeiras apresenta padrões variáveis, que são condicionados a diversos fatores, entre os quais o potencial de inóculo inicial nas sementes é crucial neste tipo de interação.

**Figura 4** - Taxa de transmissão total de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 65) de sementes de feijão (cultivar Pérola), inoculadas em \*diferentes tempos de contato semente-fungo (0h, 36h, 72h, 108h e 144h), correspondentes aos potenciais de inóculo P0, P36, P72, P108 e P144, para plantas cultivadas em duas temperaturas (20 e 26 °C), considerando-se as avaliações de mortes em pré-emergência e taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas.



Vale salientar que, embora as metodologias empregadas, em outros estudos, para avaliar a transmissão de patógenos via sementes tenham sido diferentes, conforme evidencia a literatura sobre este assunto, percebe-se que as taxas de transmissão em outros patossistemas seguem um padrão semelhante, com variações pontuais para cada caso. Conforme demonstrado neste trabalho, a influência de fatores climáticos constitui, também, um fator decisivo para a concretização da transmissão dos patógenos em quaisquer patossistemas.

## CONCLUSÕES

1. A taxa de transmissão de *C. lindemuthianum* de sementes de feijão infectadas é variável e diretamente proporcional aos potenciais de inóculo do patógeno nas sementes e a

temperaturas próximas a 20 °C.

2. Os maiores percentuais de taxas de transmissão total do fungo são observados nos potenciais de inóculo mais elevados e em cultivos a temperatura de 20 °C.
3. Sob ambas as condições de cultivo, 20 e 26 °C, *C. lindemuthianum* foi detectado em tecidos de partes de plantas assintomáticas, tendo as maiores taxas de transmissão sido observadas a temperatura de 20 °C.
4. A incidência de *C. lindemuthianum* nas sementes infectadas foi maior na região do colo de plantas assintomáticas a temperatura de 20 °C, tendo apresentando valores crescentes na proporção do aumento dos potenciais de inóculo.

### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras. À Universidade Pedagógica de Quelimane. À CAPES por apoiar financeiramente com bolsa de estudos. Ao CNPq pelo apoio na condução desta pesquisa e à Seprotec por ter fornecido sementes para este estudo.

### REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.K; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton, Florida CRC Press, Vol. 1. 1987. 176p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.
- CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- HALL, R. **Compendium of Bean Diseases**. St Paul: The American Phytopathological Society Press, 1991. 71p.
- MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M; MACHADO, C. **Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de**

sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.20, p.37-63, 2012.

MARINGONI, A. C; BARROS, E. M. de. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, n.2, p.197-200, 2002.

MENDES, M.P. **Relação entre potencial de inóculo de *Colletotrichum truncatum* e desempenho de sementes de soja tratadas e não tratadas com fungicidas**. 2014. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, n.1, p.131-136, 1995.

NEEGARD, P. **Seed Pathology**. 2 ed. London, The MacMillan Press. Vol. 1. 1979. 839p.

REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, D.R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.3, p.465-470, jul./set., 2009.

SARTORI, A.F; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.29, n.4, p.456-458, 2004.

SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; ALMEIDA, M.F. Potential for transmission of *Stenocarpella macrospora* from inoculated seeds to maize plants grown under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, v.36, n.2, p.154-161, 2014a.

SIQUEIRA, C.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; CORRÊA, C. L. Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. **Rev. Ciênc. Agron.**, v.47, n.2, p.393-400, abr-jun, 2016b.

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**, v.10, p.219-248, 2001.

VECHIATO, M.H.; CASTRO, J.L. de; ISHIMURA, I.; SABINO, J.C.; MENTEN, J.O.M. Antracnose do feijoeiro: correlação entre severidade em vagens e a incidência do patógeno nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.22, n.2, p.159-163, 1997.

VENTUROSOS, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; VENTUROSOS, L.A.C.; PONTIM, B.C.A.; REIS, G.F. dos. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.5, p.788-793, mai, 2015.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1988. 231p.

ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BAUTE, N.L.; SOUSA, B.F.M. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.31, n.3, p.775-784, May/June, 2015.

**ARTIGO 3****DETECÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum lindemuthianum* EM AMOSTRAS DE  
SEMENTES DE FEIJÃO****MOLECULAR DETECTION OF *Colletotrichum lindemuthianum* IN BEAN SEEDS  
SAMPLES**

Preparado de acordo com a Revista Journal of Seed Science (Versão preliminar)

**Stélio Jorge Castro Gadaga<sup>1\*</sup>, José da Cruz Machado<sup>1</sup> e Carolina da Silva Siqueira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. \*Autor para correspondência <steliogadaga@gmail.com>

## RESUMO

*Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro, tem a semente como uma forma de disseminação sendo transmitido por esta via de maneira eficaz. O uso de sementes de feijão livres do patógeno é uma das estratégias de manejo da antracnose, e o uso de técnicas de detecção acuradas e rápidas torna-se indispensável para prévia análise sanitária de sementes. Neste estudo a técnica de PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR) foi utilizada para a detecção e quantificação de *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijão artificialmente infectadas pela técnica de condicionamento osmótico. Foram preparadas amostras de 400 sementes, com incidências de 0,25%, 0,50%, 1%, 10% e 100% de sementes expostas ao patógeno por diferentes períodos de tempo, correspondentes aos potenciais de inóculo P0 (0 horas de contato), P36 (36 h), P72 (72 h), P108 (108h) e P144 (144 h). Tanto a técnica de cPCR como a qPCR foram eficientes na detecção do fungo. A partir das amostras de sementes com 10% de incidência do fungo e com P36 já foi possível detectar a presença do fungo por cPCR, e também, nas amostras subsequentes. Pela técnica de qPCR a sensibilidade na detecção do fungo foi observada em amostras com incidência de 0,25% e no potencial de inóculo P36. Concluiu-se que a técnica qPCR pode ser utilizada com segurança em análise de sementes de feijão para a detecção de *C. lindemuthianum*.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, antracnose, técnicas moleculares.

## ABSTRACT

*Colletotrichum lindemuthianum* is the causal agent of the anthracnose disease of common bean. Infected seeds are the main source for the spread of the disease. The use of common bean seeds free of *C. lindemuthianum* is one of the major measure to manage the disease. Rapid and accurate detection techniques are required to ensure high seed quality. In this study the conventional and quantitative PCR (cPCR and qPCR) techniques were used for the detection and quantification of *C. lindemuthianum* in samples of artificially infected common bean seeds using the osmotic conditioning technique. Seed samples were prepared with 0.25%, 0.50%, 1%, 10% and 100% of incidences of seeds exposed for different periods of time, corresponding to inoculum potentials P0 (0 contact hours), P36 (36 h), P72 (72 h), P108 (108 h) and P144 (144 h). Both cPCR and qPCR techniques were efficient in detecting the fungus. By cPCR the highest sensibility of this technique, 10% incidence of the fungus, was registered on seed samples infected at the lowest inoculum potential, P36. By the qPCR technique the sensitivity in the detection of the fungus was observed in samples with incidence of 0.25% of the fungus and at inoculum potential P36. It was concluded that the qPCR technique can be safely used in common seed analysis for detection of *C. lindemuthianum*.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, anthracnose, molecular techniques.

## INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro, amplamente difundida no Brasil, é suscetível a muitas doenças, como a antracnose, murcha de fusarium, ferrugem, crestamento bacteriano, dentre outras. Das doenças fúngicas, a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav., é atualmente a que mais preocupa, por diversas razões. Além de sua importância econômica, trata-se de uma doença capaz de dizimar lavouras em curtos períodos de tempo, sob condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Perdas de produção têm sido relatadas em níveis que oscilam entre 20- 50%, havendo casos de perda total da cultura (Santana e Mahuku, 2002). A semente é um dos principais meios de sobrevivência e disseminação do fungo a longas distâncias. Este fato faz com que a análise de sanidade de sementes seja de suma importância, pois fornece informação sobre a presença ou ausência de *C. lindemuthianum* nas amostras de sementes. Damasceno e Silva et al. (2007) afirmaram que no Brasil já foram identificadas aproximadamente 50 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, tendo destacado as raças 65, 73 e 81 como as mais frequentes no tocante a sua virulência.

Pela literatura a detecção de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão foi inicialmente relatada no Brasil, tendo-se como metodologia a incubação de sementes em meio agarizado, contendo o sal 2,4 diclorofenoxiacetato de sódio, concentração de 50 ppm. O método de rolo de papel foi proposto por Anselm; Champion (1981) o qual foi oficializado pela ISTA (1985). Este método tem sido utilizado com sucesso em diversos países fazendo parte do Manual de Análise Sanitária de Sementes no Brasil (Brasil, 2009b). Apesar de sua reconhecida especificidade e sensibilidade, como método biológico, o método de rolo de papel apresenta algumas dificuldades na sua avaliação, que é baseada nos sintomas formados nos cotilédones de sementes portadoras do referido patógeno.

Devido a necessidade de se obter resultados mais rápidos, sensíveis e confiáveis para a detecção de *C. lindemuthianum* em lotes de sementes de feijão, os métodos moleculares surgem como alternativa dos mais promissores, principalmente em análises de rotina. O uso de técnica PCR convencional já tem sido relatada para a diagnose da antracnose em tecidos de plantas de feijão (Coêlho et al., 2016; Chen et al., 2007; Chen et al., 2013; Barcelos et al., 2014; García- Serrano et al., 2008; Wang et al., 2008).

Neste trabalho o objetivo foi avaliar a viabilidade da detecção de *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijão por meio das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real, tendo-se como foco pontual avaliar a sensibilidade destas técnicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade federal de Lavras (UFLA).

### Origem e multiplicação de fungos e perfil das sementes

Para este estudo foi usado o isolado LV238 de *C. lindemuthianum*, raça 65, concedido pelo Laboratório de Resistência de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. O isolado foi crescido em placas de Petri de 15 cm contendo o meio M3 [10 g de sacarose, 20 g de ágar, 2 g de  $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 g de neopeptona/peptona, 4 mL de panvit e 1 mL de cloranfenicol por litro de água destilada], mantido em câmara incubadora BOD a  $20 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Isolados obtidos de sementes de feijão como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani*, provenientes da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA, também, foram multiplicados em condições semelhantes ao descrito acima, entretanto, o meio de cultura utilizado foi o BDA (batata, dextrose e ágar).

Foram usadas sementes da cultivar Pérola, pertencente ao grupo Carioca, suscetível a *C. lindemuthianum*. No perfil realizado das sementes foi observado um percentual de germinação de 95,5% avaliados de acordo com as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009a), e no teste de sanidade foram detectados apenas os fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp. em índices abaixo de 0,5%, quando analisados de acordo com o Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009b).

### Inoculação de sementes para obtenção de diferentes potenciais de inóculo

Para a obtenção de sementes de feijão infectadas por *C. lindemuthianum*, utilizou-se a metodologia de condicionamento osmótico proposta por Machado et al. (2012). As sementes foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e submetidas à tríplice lavagem em água destilada, com posterior secagem sobre duas folhas de papel *Germitest* dentro de bandejas plásticas, em ambiente de laboratório por 48 horas. Colônias do fungo com sete dias de idade foram crescidas em placas de Petri contendo meio M3 adicionado de manitol, com potencial ajustado para - 1,0 Mpa (Michel e Radcliffe, 1995). As sementes foram distribuídas de forma homogênea em camada simples e mantidas em incubadora do tipo BOD a  $20 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas, e expostas às colônias fúngicas por períodos de 0, 36, 72, 108 e 144 horas, que corresponderam aos diferentes potenciais de

inóculo P0, P36, P72, P108 e P144, respectivamente, conforme descrito por Machado et al. (2004). Após cada período de contato entre fungo e sementes, estas foram transferidas das placas de Petri para bandejas de plástico contendo duas folhas de papel *Germitest*, permanecendo em temperatura ambiente por 48 horas.

### **Extração de DNA**

Primeiramente, para a extração do DNA de culturas puras de *C. lindemuthianum*, o fungo foi crescido em placas de Petri de 15 cm contendo meio M3, por sete dias. O micélio fúngico foi raspado cuidadosamente com uma lâmina de bisturi (Solidor) colocado em almofariz onde foi macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Foram transferidos 40 mg do macerado para microtubos de 1,5 mL. Seguindo os mesmos procedimentos, também, foram preparadas amostras de outros fungos encontrados naturalmente em sementes de feijão como, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* f. sp *phaseoli* e *R. solani*.

Para a extração do DNA fúngico das amostras de sementes artificialmente infectadas, foram realizadas, previamente, as devidas misturas de sementes inoculadas (com os diferentes potenciais de inóculo) e sementes saudas, para obtenção de variados níveis de incidência de sementes contaminadas dentro de uma amostra (Tabela 1).

Após a mistura de sementes nas proporções descritas a seguir, cada amostra foi macerada individualmente em moinho A11 Basic IKA, com adição de nitrogênio líquido. Iniciou-se a maceração pelas amostras que possuíam os menores níveis de incidência até os maiores para evitar contaminação, a cada maceração o moinho foi limpo e desinfestado com álcool 70%. Ao final, foram retiradas três subamostras, de 40 mg cada, e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Amostras de sementes saudas, também, foram maceradas.

Todas as extrações de DNA, de culturas puras e amostras de sementes foram realizadas com Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 1. Níveis de incidência, obtidos de misturas de sementes sadias de feijão (cultivar Pérola) com sementes inoculadas com o isolado LV238 de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 65, em diferentes tempos de contato semente-fungo correspondendo aos potenciais de inóculo P0 - 0h, P36 - 36h, P72 - 72h, P108 - 108h, P144 - 144h.

Potencial de inóculo*	Níveis de incidência (%)	Nº de sementes infectadas	Nº de sementes sadias	Total de sementes
P36	0,25	1	399	400
	0,5	2	398	400
	1	4	396	400
	10	40	360	400
	100	400	0	400
P72	0,25	1	399	400
	0,5	2	398	400
	1	4	396	400
	10	40	360	400
	100	400	0	400
P108	0,25	1	399	400
	0,5	2	398	400
	1	4	396	400
	10	40	360	400
	100	400	0	400
P144	0,25	1	399	400
	0,5	2	398	400
	1	4	396	400
	10	40	360	400
	100	400	0	400

\*Para cada potencial de inóculo foram realizados todos os níveis de incidência, separadamente.

A qualidade do DNA das amostras foi checada em gel de agarose 1% em tampão 1xTBE (40mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0), corado com Gel Red (Biotium) e visualizado no transluminador UV L-PIX (Loccus- Biotecnologia, Brasil). O DNA foi quantificado no espectrofotômetro Nano Drop 3300 (Thermo Scientific).

### PCR convencional e PCR em tempo real

Para a detecção *C. lindemuthianum*, tanto por cPCR como qPCR, foram utilizados *primers* específicos anteriormente descritos na literatura (Tabela 2). Para a amplificação dos fragmentos de 638 pares de base para cPCR e quantificação por qPCR foram seguidos os procedimentos para reações e condições dos ciclos descritos por Wang et al. (2008) e Chen et al. (2013), respectivamente.

Tabela 2. Sequências de *primers* utilizadas nas reações de PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão artificialmente inoculadas.

Técnica	<i>Primers</i>	Sequências	Referências
cPCR	CD1	5'-ACC TGG ACA CAT AAG TCA AAG-3'	Wang; Tang; Wang (2008)
	CD2	5'-CAA CAA TGC CAG TAT CAG AG-3'	
qPCR	CIF432	5'-GGA GCC TCC TTT GCG TAG TAAC-3'	Chen et al. (2013)
	CIR533	5'-ACC TGA TCC GAG GTC AAC CTT GTT-3'	

As ampliações de cPCR foram feitas utilizando o termociclador Multigene (Labnet, NJ, USA). Avaliou-se por eletroforese cada produto da PCR em gel de agarose a 1% contrastado com Gel Red (Biotium), sendo estes observados em transiluminador UV L-PIX (Loccus- Biotecnologia, Brasil). Para a PCR em tempo real, foi utilizado o termociclador Rotor-Gene 6500 (Corbett Research, Mortlake, Austrália) e o software Rotor-Gene versão 1.7.75 (Corbett).

#### **Avaliação da especificidade e sensibilidade na detecção da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* para PCR convencional e PCR em tempo real**

Após a extração do DNA de cultura pura de *C. lindemuthianum* e dos outros fungos encontrados em sementes de feijão (*S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *R. solani*), foram realizados testes com a finalidade de confirmar a especificidade dos *primers* CD1 e CD2 em cPCR na detecção do isolado da raça 65 de *C. lindemuthianum*. Estes *primers*, também, foram utilizados, para verificação da sensibilidade na detecção do patógeno em amostras de sementes de feijão com diferentes níveis de incidência (Tabela 1). O controle negativo utilizado foi água ultrapura estéril e DNA de sementes sadias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para a PCR em tempo real, para os testes de detecção da raça 65 de *C. lindemuthianum* quanto a especificidade e a sensibilidade, utilizando o par de *primers* CIF432 e CIR533, foram geradas curvas de calibração padrão com diluições seriadas de DNA de *C. lindemuthianum*, nas concentrações de 200 ng/μL a 0,0002 ng/μL. O controle negativo foi água ultrapura estéril e os testes foram realizados com duas repetições.

### Detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* por PCR em tempo real em sementes dissecadas

Foi realizado por qPCR a quantificação de *C. lindemuthianum* raça 65 em sementes de feijão, inteiras e dissecadas artificialmente inoculadas com diferentes potenciais de inóculo (P36, P72, P108 e P144 horas). Para dissecação, quarenta sementes de feijão foram colocadas em placas de Petri de 15 cm, contendo papel de filtro umedecido em água destilada e esterilizada, durante 18 horas, e posteriormente separadas em tegumento e embrião. Imediatamente, após a dissecação, essas frações foram maceradas separadamente, com nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de um pó. O DNA foi extraído e a qPCR foi realizada seguindo os mesmos procedimentos, descritos anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Especificidade, sensibilidade e detecção limite de *Colletotrichum lindemuthianum* em cultura pura para PCR convencional e PCR em tempo real

Observou-se neste trabalho que o par de *primers* utilizados na cPCR convencional foi específico na detecção do isolado de *C. lindemuthianum* raça 65 e não para outros patógenos que também infectam sementes de feijão. Os produtos da cPCR observados geraram bandas únicas de 638 pares de base para a detecção positiva do patógeno em foco (Figura 1).



Figura 1. Especificidade do par de *primers* CD1/CD2 para detecção de *Colletotrichum lindemuthianum*, por PCR convencional. M: Marcador de 1 Kb (Qiagen GelPilot<sup>®</sup>); Colunas 1-3: *Sclerotinia sclerotiorum*; 4-6: *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*; 7-9: *Rhizoctonia solani*; 10-12: controle negativo; e 13-15: controle positivo.

Por estes resultados, a técnica de cPCR pode ser recomendada e utilizada em laboratórios de análise de rotina pela rápida e alta reprodutibilidade, diminuindo assim o

tempo em que os resultados são disponibilizados de forma segura. Resultados semelhantes foram anteriormente relatados por outros autores (Chen et al., 2007; Gutiérrez et al., 2014; Mesquita et al., 1998; Pacheco et al., 2014).

Para a detecção limite de DNA de cultura pura de *C. lindemuthianum* raça 65, foi observado que o par de *primers* CD1/CD2 consegue verificar concentrações muito baixas do fungo, chegando ao limite de detecção de 0,02 ng/μL, de diluições a partir de 200 ng/μL (Figura 2).

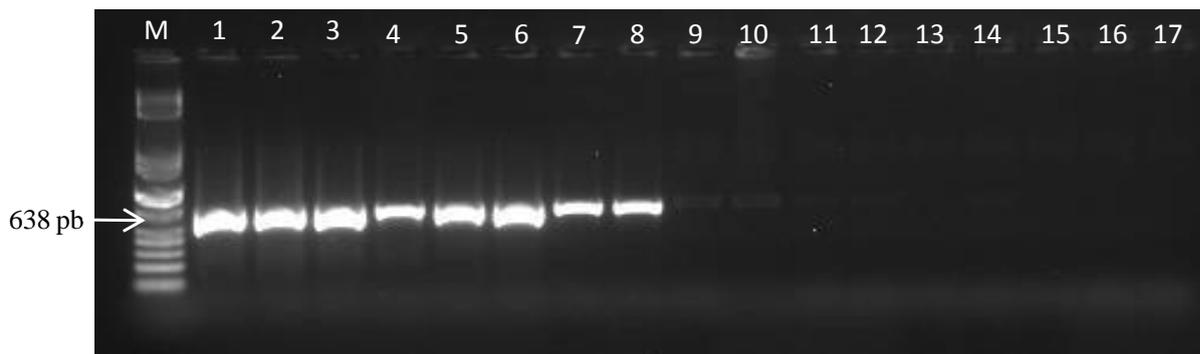


Figura 2. Detecção limite de *Colletotrichum lindemuthianum* com o par de *primers* CD1/CD2 por PCR convencional. M: Marcador de 1 Kb (Qiagen GelPilot<sup>®</sup>). Colunas 1-2: 200 ng/μL; 3-4: 20 ng/μL; 5-6: 2 ng/μL; 7-8: 0,2 ng/μL; 9-10: 0,02 ng/μL; 11-12: 0,002 ng/μL; 13-14: 0,0002 ng/μL; 15-16: 0,00002 ng/μL; e 17: controle negativo.

Em relação aos resultados da sensibilidade do par de *primers* CD1/CD2 na detecção por cPCR de *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijão com diferentes níveis de incidência, originados das misturas de sementes inoculadas com sementes saudáveis, observou-se que a partir da incidência de 10% de sementes com potencial de inóculo P36 foi possível detectar a presença do fungo nas amostras, contudo, para os outros níveis de incidência com sementes com P72, P108 e P144, já foi possível detectar o patógeno a partir de 0,25% de incidência (Tabela 3). Os resultados apresentaram repetibilidade nas três vezes realizadas, como forma de comprovação das análises verificadas.

Observou-se que o par de *primers* CD1/CD2 em cPCR é eficiente na detecção de *C. lindemuthianum*, raça 65, em amostras de sementes de feijão, sendo que, em todos os potenciais de inóculo foi possível detectar a presença do fungo, verificando-se assim a sensibilidade do par de *primers*. Outros autores em trabalhos com *Stenocarpella* sp. e *Corynespora cassiicola* observaram que os *primers* utilizados foram específicos na detecção dos patógenos em milho e soja, respectivamente (Barrocas et al., 2012; Sousa et al., 2016).

Tabela 3. Amplificação do DNA genômico de *Colletotrichum lindemuthianum* por PCR convencional (cPCR) usando o par de *primers* CD1/CD2 em amostras de 400 sementes de feijão com diferentes níveis de incidência de sementes inoculadas com diferentes potenciais de inóculo P0 - 0h, P36 - 36h, P72 - 72h, P108 - 108h, P144 - 144h.

Potencial de inóculo*	Incidência de sementes inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (%)	Detecção cPCR em sementes (resultados positivos/repetição)
Controle negativo	-	0/3
Controle positivo	+	3/3
P36	0,25	0/3
	0,5	0/3
	1	0/3
	10	3/3
	100	3/3
P72	0,25	3/3
	0,5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3
P108	0,25	3/3
	0,5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3
P144	0,25	3/3
	0,5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3

\*Refere-se aos diferentes tempos de contato semente-fungo.

Para qPCR, o par de *primers* CIF432 e CIR533 demonstrou-se específico e sensível para a detecção de *C. lindemuthianum* raça 65 em amostras de sementes de feijão com diferentes níveis de incidência do patógeno. Os resultados da curva de calibração e dos valores de Ct (Cycle threshold) demonstram uma linearidade da curva em função da diluição do DNA de *C. lindemuthianum* (Figura 3 A e B). A eficiência da qPCR foi de 1,03 que foi determinada pela equação de regressão linear com valores médios das amplificações correspondentes, seu coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,99 e a sensibilidade da técnica foi verificada através da curva de dissociação por meio da equação  $Y=-3,25+12,58$ .

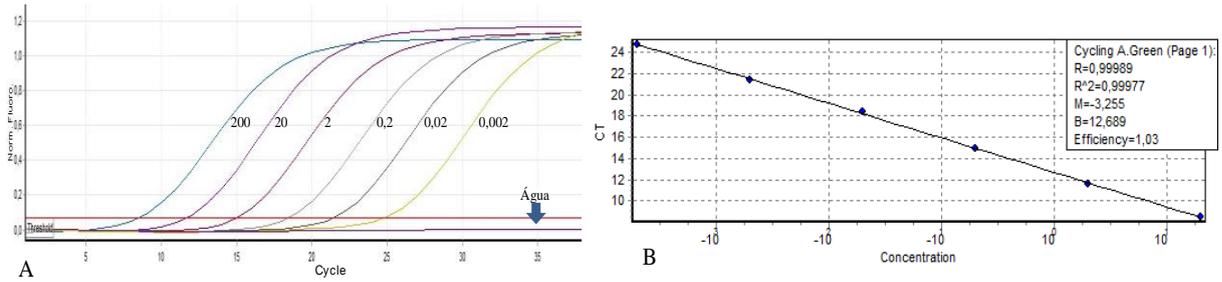


Figura 3. PCR em tempo real para detecção e quantificação de *Colletotrichum lindemuthianum*. A- Curva de amplificação com diluição seriada do DNA alvo de 200 ng/μL a 0,002 ng/μL. B - Curva padrão; Ciclos threshold (CT) representados graficamente em função do log da diluição e da detecção da fluorescência emitida no decorrer da reação.

Os resultados da Figura 3 ficaram evidenciando que a partir da curva padrão e dos valores de Ct obtidos, foi possível quantificar o DNA nas amostras diluídas do DNA de *C. lindemuthianum* raça 65, elucidando assim, a sensibilidade do par de *primers* utilizado em detectar até baixas concentrações. O maior valor de Ct foi observado na menor diluição de 0,002 ng/μL.

Este estudo demonstra que a qPCR é uma técnica bastante útil, viável e sensível para ser usada como rotina em laboratórios de análise sanitária de sementes para a detecção de *C. lindemuthianum*, pois existem muitas vantagens como a confiabilidade e redução do tempo para a disponibilização dos resultados sobre a presença/ausência do fungo em lotes de amostras de sementes de feijão bem como em outros patossistemas (Chen et al., 2013; Wang et al., 2008; Botelho, et al., 2015; Vanegas-Berrouet et al., 2014).

Em termos comparativos, ficou claro que a técnica de qPCR foi mais sensível que a cPCR. Isto faz com que a adoção desta análise seja recomendada para programas de certificação do país para detecção de *C. lindemuthianum* em amostras comercializadas de sementes de feijão.

No que diz respeito a quantificação do DNA de *C. lindemuthianum* em amostras com variados níveis de incidência do fungo em sementes de feijão inoculadas com diferentes potenciais de inóculo, observou-se que na relação potencial P36 e incidência do fungo de 0,25% já foi possível quantificar o DNA do fungo em 0,161 ng/μL. A maior concentração do patógeno observada foi em amostras com incidência de 100% de sementes com P144 tendo-se quantificado 842 ng/μL (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação de *Colletotrichum lindemuthianum* por PCR em tempo real (ng/ $\mu$ L\*1000), em amostras de sementes de feijão com diferentes níveis de incidência (0,25%; 0,5%; 1%; 10%; 100%) de sementes inoculadas com diferentes tempos de contato semente-fungo correspondendo aos potenciais de inóculo P0 - 0h, P36 - 36h, P72 - 72h, P108 - 108h e P144 - 144h.

Níveis de incidência* (%)	Quantificação de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ng/ $\mu$ L)			
	P36	P72	P108	P144
0,25	0,161	3,24	5,25	8,71
0,5	0,354	6,22	11,44	19,1
1	0,443	12,33	19,6	27,4
10	14,9	41,8	99,3	131
100	120	204	443	842

\*Níveis de incidência em lotes de 400 sementes.

Observou-se que com o aumento do potencial de inóculo bem como o aumento da incidência entre sementes artificialmente inoculadas com *C. lindemuthianum* e sementes saudáveis também ocorreu o aumento da quantidade de DNA detectado nas reações de qPCR. Isso demonstra que o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo aumenta a capacidade do mesmo de penetrar e colonizar os tecidos das sementes. Outros autores em trabalhos com detecção molecular de diferentes fungos em outros hospedeiros observaram pela técnica de qPCR essa mesma relação de aumento do potencial de inóculo e incidência com a quantidade de DNA do fungo detectado nas amostras (Botelho et al., 2015; Vanegas-Berrouet et al., 2014; Sousa et al., 2015).

#### **Quantificação de *Colletotrichum lindemuthianum* por PCR em tempo real em partes da semente**

Observou-se que quando as sementes foram dissecadas, separando-se o tegumento do embrião, em todos os potenciais de inóculo, a concentração de DNA de *C. lindemuthianum* foi maior na semente inteira, com o maior potencial de inóculo (P144), chegando a 60,3 ng/ $\mu$ L, seguido do tegumento com 20,4 ng/ $\mu$ L e por último do embrião com 0,15 ng/ $\mu$ L no mesmo potencial de inóculo (Tabela 5).

Esse resultado demonstra que com o tempo, o fungo consegue colonizar o interior da semente e afetar os tecidos internos vitais, o que vai causar a deterioração das membranas internas e assim diminuir o vigor e a qualidade da semente. Portanto, conclui-se que o tempo de exposição de sementes com os fungos é fator determinante para a sua qualidade, Rocha et al. (2014) em seu trabalho com soja e *Aspergillus ochraceus* observaram que quando estas

sementes ficaram em contato com o fungo tiveram a sua qualidade e vigor comprometidos.

Tabela 5. Concentração de DNA de *Colletotrichum lindemuthianum* (ng/ $\mu$ L\*100), quantificado por PCR em tempo real, em sementes de feijão inoculadas, com diferentes tempos de contato semente-fungo correspondendo aos potenciais de inóculo P0 - 0h, P36 - 36h, P72 - 72h, P108 - 108h e P144 - 144h, inteiras e dissecadas em tegumento e embrião.

<b>Estrutura</b>	<b>P36</b>	<b>P72</b>	<b>P108</b>	<b>P144</b>
Semente inteira	0,987	5,835	48,35	60,3
Tegumento	0,513	0,792	6,497	20,433
Embrião	0,021	0,017	0,081	0,145

## CONCLUSÕES

Os *primers* utilizados neste estudo foram específicos na detecção de *C. lindemuthianum* raça 65 em amostras de sementes de feijão artificialmente inoculadas, tanto por cPCR quanto por qPCR.

Por meio da cPCR foi possível detectar *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijão com incidência mínima de 10% no menor potencial de inóculo do patógeno.

Por sua vez, por meio da qPCR foi possível detectar *C. lindemuthianum* em amostras de sementes de feijão na incidência de 0,25% no menor potencial de inóculo atingindo o tegumento e seu embrião.

Por qPCR foi possível quantificar 0,161 ng/ $\mu$ L de *C. lindemuthianum* raça 65 na menor incidência de sementes com o menor potencial de inóculo.

Com base nas avaliações pela qPCR, *C. lindemuthianum* coloniza o interior das sementes.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras. À Universidade Pedagógica de Quelimane. À CAPES e CNPq por apoio financeiro e à Seprotec por fornecer as sementes utilizadas neste estudo. Ao Laboratório de Resistência de Plantas e à Professora Elaine Souza pelo constante apoio.

## REFERÊNCIAS

- ANSELME, C.; CHAMPION, R. *Bean anthracnose – Phaseolus vulgaris, Colletotrichum lindemuthianum*. In: ISTA Handbook in seed health testing. Zurich: International Seed Testing Association (ISTA), 1981/1982 (Working sheet N° 45).
- BARCELOS, Q.L.; PINTO, J.M.A.; VAILLANCOURT, L.J.; SOUZA, E.A. Characterization of glomerella strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. *PLoS ONE*, v.9, n.3, P.900-919, 2014.  
<http://journal.ashspublications.org/content/123/6/1038.abstract>
- BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; ALMEIDA, M.F.; BOTELHO, L.S.; VON PINHO, E.V.R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, v.34, n.2, p.218-224, 2012.  
<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n2/05.pdf>
- BOTELHO, L.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; MARTINS, R.S. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. *Journal of Seed Science*, v.37, n.1, p.055-062, 2015.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2317-15372015000100055](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372015000100055)
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.
- CHEN, Y.Y.; CONNER, R.L.; GILLARD, C.L.; BOLAND, G.J.; BABCOCK, C.; CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; BALASUBRAMANIAN, P.M. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant Disease*, v.91, n.10, October, 2007.  
[http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2007/October/Pages/91\\_10\\_1271.aspx](http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2007/October/Pages/91_10_1271.aspx)
- CHEN, Y.Y.; CONNER, R.L.; GILLARD, C.L.; McLAREN, D.L.; BOLANDE, G.J.; BALASUBRAMANIAN, P.M.; STASOLLAG, C.; ZHOUH, Q.X.; HWANGH, S.F.; CHANGH, K.F.; BABCOCK, C. A quantitative real-time PCR assay for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in navy bean seeds. *Plant Pathology*, v.62, p.900–907, 2013.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2012.02692.x/epdf>
- COELHO, M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; SOUSA, L.L.; NUNES, M.P.B.A.; AZEVEDO, R.F.; GALVÁN, M.Z. Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Maringá, v.38, n.4, p. 429-438, Oct.-

Dec., 2016. <http://www.scielo.br/pdf/asagr/v38n4/1807-8621-asagr-38-04-00429.pdf>

DAMASCENO e SILVA, K.J.; 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.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2007.01226.x/epdf>

GARCÍA-SERRANO, M.; RODRÍGUEZ-GUERRA, E.A.L.R.; SIMPSON, J. Analysis of the MAT1-

2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mycoscience*, v.49, p.312–317, 2008.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10267-009-0484-2>

GUTIÉRREZ, P.; YEPES, M.S.; RESTREPO, J.F.A.; BERROUET, K.V.; MONTOYA, M.M. The

CD1/CD2 marker for specific detection of *Colletotrichum lindemuthianum* is an iron transporter pseudogene. *Tropical Plant Pathology*, v.39, n.4, p.275-283, 2014.

<http://www.scielo.br/pdf/tpp/v39n4/v39n4a02.pdf>

ISTA (International Seed Testing Association). *Handbook on Seed Health Testing*. Switzerland. Second edition. 1985. 45 sheets.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.1, p.62-67, 2004.

<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v26n1/a10v26n1.pdf>

MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M; MACHADO, C. Uso

da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes.

*Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.20, p.37-63, 2012.

MESQUITA, A.G.G.; PAULA Jr., T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G de.

Identification of

Races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the Aid of PCR-Based Molecular Markers.

*Plant Disease*, v.82, n.10, p.1084-1087, 1998.

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1998.82.10.1084>

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, v.87, n.1, p.131-136, 1995.

PACHECO, L.M.; BERROUET, K.V.; YEPES, M.S.; ÁNCHEZ, P.G.y

MONTOYA, M.M.

Detección por PCR de *Colletotrichum lindemuthianum* em cultivos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica*. v.63, n.4, p.377-387, 2014.

<http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v63n4/v63n4a10.pdf>

ROCHA, F.S.; CATÃO, H.C.R.M.; BRANDÃO, A.A.; GOMES, L.A.A. Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja.

*Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.35, n.6, p.2895-2904, nov./dez. 2014. DOI:

<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p2895>

SANTANA, E.; MAHUKU, G. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* em Antioquia y evaluación de germoplasma de frijol crema-rojo por resistencia a antracnosis. *Agronomía Mesoamericana*, v.13, p.95-103, 2002. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v13n02\\_095.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v13n02_095.pdf)

SOUSA, M.V.; SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. *Journal of Seed Science*, v.38, n.2, p.085-091, 2016. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v38n2/2317-1545-jss-v38n2152049.pdf>

SOUSA, M.V.; MACHADO, J.C.; SIMMONS, H.E.; MUNKVOLD, G.P. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. *Plant Pathology*, v.64, p.478–488, 2015. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12257/epdf>

VANEGAS-BERROUET, K.; MARTÍNEZ-PACHECO, L.; SALAZAR-YEPES, M.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, P.; MARÍN-MONTOYA, M. Detección y cuantificación por qPCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en tejidos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. *Bioagro*, v.26, n.1, p.13-20, 2014. <http://www.redalyc.org/pdf/857/85730396002.pdf>

WANG, W.; TANG, J.H.; WANG, Y.C. Molecular Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. *J. Phytopathology*, v.156, p.431-437, 2008. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2007.01386.x/epdf>

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A antracnose do feijoeiro é uma doença de grande importância em todos os países produtores de feijão, sendo considerada um fator limitante de produção e produtividade.

O uso de sementes livres de microrganismos é considerado a principal forma de prevenção de introdução, disseminação e transmissão de patógenos em áreas de produção. Sendo assim, o mesmo é recomendado para o patossistema feijoeiro vs. *C. lindemuthianum*, pois já foi relatada e comprovada a capacidade que o fungo tem de se disseminar em ambientes favoráveis.

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir no entendimento da interação entre *C. lindemuthianum* e sementes de feijão, levando-se em consideração os efeitos sobre o vigor a qualidade de sementes, plântulas e plantas, a importância da compreensão sobre os fatores determinantes da transmissão semente-planta e também estudar os métodos moleculares como mais uma ferramenta laboratorial na detecção rápida e confiável do fungo em amostras de sementes.

Os resultados destes estudos demonstram de forma prática que na interação *C. lindemuthianum* e sementes de feijão a temperatura e o potencial de inóculo são fatores determinantes no estabelecimento da doença e seus danos. Observou-se que em cultivos em ambientes diferentes (20 e 26 °C), a temperatura de 20 °C foi mais favorável ao fungo e desfavorável a planta, o que leva a concluir que em áreas de produção onde as temperaturas são mais baixas o microrganismo poderá causar mais danos a cultura. No que diz respeito aos potenciais de inóculo, os potenciais mais elevados causaram mais danos às sementes e plantas, principalmente quando associadas a temperatura de 20 °C. Por estes estudos ficou evidente também que o fungo provoca um menor percentual de mortes em pré- emergência de plantas da cultivar utilizada, Pérola, a partir das sementes infectadas em comparação com outros patógenos como a maioria dos fungos de solo.

Em relação aos resultados do estudo de transmissão de *C. lindemuthianum* pelas sementes de feijão, ficou comprovado que as sementes constituem a principal via de introdução do fungo em áreas de cultivo e as plantas emergidas e infectadas ainda jovens representam fontes de inóculo importantes para a ocorrência explosiva da antracnose em condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Um aspecto de suma importância revelada neste estudo, é que plantas assintomáticas de antracnose podem conter em seus tecidos inóculo de *C. lindemuthianum*, o que faz com que inspeções sanitárias de campo levem em consideração este fato.

Os estudos sobre a detecção do fungo em amostras de sementes de feijão, deixaram claro a relevância do uso das técnicas moleculares por meio de PCR para a sua adoção pelos sistemas de controle de qualidade de sementes, principalmente em programas de certificação. É importante salientar que para a detecção de *C. lindemuthianum* amostras de sementes de feijão, recomenda-se atualmente em todo o mundo o método de rolo de papel. No entanto, ressalta-se que por ser um método que é baseado em sintomas da doença nos cotilédones, pode não revelar a real ocorrência do fungo na amostra examinada considerando se que plântulas assintomáticas podem estar infectadas. Este fato faz com que avaliações complementares sejam necessárias. No presente caso o uso da técnica de PCR, convencional e em tempo real, mostrou ser segura e sensível nos menores percentuais de incidência em amostras de sementes utilizadas. Além da comprovada especificidade, esta técnica é de execução rápida e objetiva, embora revele apenas resultados qualitativos em termos de presença ou ausência do patógeno nas sementes analisadas. Percebe-se que a combinação dos dois métodos, um biológico e outro molecular, representa a estratégia mais segura de detecção do fungo em sementes de feijão. Estas informações devem ser levadas ao conhecimento dos laboratórios de análise sanitária de sementes com o intuito de se ter maior segurança e precisão para patógenos considerados quarentenários não regulamentados como *C. lindemuthianum*.

No computo geral, os resultados destes estudos levantam a preocupação sobre o desenvolvimento e aprofundamento de metodologias adequadas a realidade de cada patossistema, com o objetivo de se chegar a resultados confiáveis. A presunção de que os testes de sanidade de sementes de feijão e de outros patossistemas ainda apresentam deficiências para a sua adoção em programas de certificação de qualidade de sementes não procede uma vez que a precisão, rapidez e aspectos econômicos dos mesmos comprovam a viabilidade destes métodos em termos de custos e benefícios.