



**LUANA DA SILVA BOTELHO**

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E EFEITOS DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**LUANA DA SILVA BOTELHO**

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E EFEITOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*  
EM SEMENTES DE SOJA**

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

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Botelho, Luana da Silva.

Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja / Luana da Silva Botelho. – Lavras : UFLA, 2011. 156 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Glycine max* (L.). 2. Sanidade de sementes. 3. Detecção molecular. 4. Taxa de transmissão. 5. Transformação genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título

CDD –633.34943

**LUANA DA SILVA BOTELHO**

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E EFEITOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*  
EM SEMENTES DE SOJA**

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

APROVADA em 18 de março de 2011.

|                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| Dr. Hudson Teixeira           | EPAMIG              |
| Dra. Silvânia Helena Furlan   | Instituto Biológico |
| Dr. Mário Sobral de Abreu     | UFLA                |
| Dr. Antônia dos Reis Figueira | UFLA                |

Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2011**

*Com amor, aos meus pais, Maria Aparecida e José Botelho, as minhas irmãs,  
Luciana e Lucimara e minha sobrinha, Laura.  
Ao Diorny Reis,*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, pela orientação, valiosos ensinamentos, oportunidade, paciência e disposição que sempre me dedicou em todo o doutorado.

À professora Dra. Antônia dos Reis Figueira, pelos ensinamentos e colaboração neste trabalho.

Ao Dr. Hudson Teixeira, Dra. Silvânia Furlan e professor Mário Sobral, pela participação na banca examinadora e ajuda.

Ao professor Greg Boland, pela oportunidade concedida em seu grupo de pesquisa na Universidade de Guelph, no Canadá.

À Heloísa Moraes, da Esalq/USP, por sua amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, Vivian, Luiza Nunes, Ângela, Eloísa (Biotita), Úrsula, Cristiano (Pepe), Luizinho, Sebastião Guilherme (Tião), Chicão, Cláudio, Elenice, Rayanna, Marcela, Bruno Sousa, Flavinha, Rodrigo Pedrozo, Mirian, Willian e Gisele que ajudaram com tanta disposição para a realização deste trabalho e pela amizade. Em especial, às grandes companheiras Carolina Siqueira e Mirella Almeida, pela presença e ajuda constantes em algumas etapas deste trabalho.

A Ellen Barrocas, por toda ajuda, colaboração e amizade durante a realização deste trabalho e pelas sugestões.

A Carlinha e ao Éder, pela amizade, ajuda e excelente convivência durante o curso.

A Élide Correa pelo carinho e amizade em uma fase especial do doutorado.

Aos amigos Cláudia Labory, Adriana de Barros e Leandro Costa, por grandes momentos compartilhados sempre.

A minha família, meus pais José Antônio e Maria Aparecida e minhas irmãs, Luciana, Lucimara e minha sobrinha, Laura, minha eterna gratidão.

As minhas tias Carla e Isabel

Ao meu adorável cunhado Bruno Martins.

À família Reis, pelo carinho e acolhimento.

Ao Diorny Reis (Bigud), pelo companheirismo e por todo seu amor e carinho.

A todos outros tantos amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

## RESUMO

Entre as doenças de maior destaque na cultura da soja encontra-se o mofo-branco, cujo agente etiológico é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da “podridão-de-esclerotinia”, “murcha-de-esclerotinia” ou “mofo-branco,” em muitas espécies cultivadas e de plantas daninhas. A associação deste fungo com sementes de espécies tão diversas é epidemiologicamente importante, uma vez que essa interação constitui uma via das mais efetivas de introdução e disseminação de inóculo em novas regiões. A implementação de padrões de tolerância em programas de certificação de sementes é uma alternativa que pode auxiliar no controle do mofo-branco. Para que estes padrões sejam estabelecidos são necessários testes de diagnose precisos e eficientes e o conhecimento das taxas de transmissão do patógeno via sementes, além de outros aspectos importantes neste processo. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as relações de *Sclerotinia sclerotiorum*, na forma sua micelial, a partir de sementes de soja com diferentes potenciais de inóculo, no desempenho das mesmas. Foram utilizadas duas cultivares de soja, Conquista e Tucunaré e dois isolados de *S. sclerotiorum* pertencentes à coleção micológica do laboratório de patologia de sementes. A qualidade sanitária e fisiológica inicial das amostras foi determinada de acordo com métodos descritos nas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). Foram conduzidos ensaios visando à detecção molecular de *S. sclerotiorum* em sementes infectadas artificialmente e sementes contaminadas naturalmente com o patógeno, por meio da técnica de PCR convencional e o PCR quantitativo, usando *primers* específicos descritos para este patógeno. Foram utilizadas sementes com níveis de incidência e intensidade de inóculo variáveis para os trabalhos de detecção molecular do patógeno. Para verificar o efeito do patógeno no desempenho das sementes de soja e mensurar a taxa de transmissão de *S. sclerotiorum*, a partir de sementes, estas foram inoculadas via condicionamento osmótico, conforme descrito na literatura, que permite a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo. Os dados relativos à transmissão foram expressos com base na relação entre percentagem de ocorrência do fungo na semente, conforme determinado no teste de sanidade e o número de plântulas/plantas infectadas pelo patógeno. A partir das sementes inoculadas, foram feitas observações em microscopia eletrônica de varredura, por meio eletromicrografias, sobre a ultraestrutura das sementes, relacionadas com os efeitos causados nas sementes, no que tange à qualidade fisiológica das mesmas. Neste ensaio foram aplicados testes moleculares (PCR convencional) para a confirmação de *S. sclerotiorum* nas sementes nos diferentes potenciais de inóculo. Para os estudos de transformação gênica, via marcador tipo *green fluorescent protein gene* (GFP), foi utilizado um isolado de *S. sclerotiorum*,



sendo seguidos protocolos já descritos com modificações propostas. Somente a técnica de qPCR foi capaz de detectar *S. sclerotiorum* em todos os níveis de incidência e nos diferentes potenciais de inóculo nas sementes de soja, embora a BIO-PCR convencional tenha se revelado promissora para detectar níveis do referido patógeno em incidência e potenciais mais baixos. Verificou-se que nos potenciais de inóculo mais elevados houve efeito mais pronunciado na qualidade das sementes. A taxa de transmissão elevou-se proporcionalmente com aumento do potencial de inóculo, havendo índices de 100% no potencial mais elevado. Pela análise ultraestrutural ficou evidente que *S. sclerotiorum* foi capaz de colonizar as camadas protetoras e o embrião das sementes na forma micelial. Estas informações relacionaram a má qualidade das sementes à desorganização celular dos tecidos parasitados pelo patógeno. As adaptações realizadas no protocolo para a transformação de *S. sclerotiorum* com o marcador GFP, revelaram-se eficazes na transformação do isolado utilizado. Neste caso, houve maior rendimento na produção de protoplastos, bem como na incorporação do referido gene utilizado neste estudo, e ainda foram mantidas as características de virulência e morfológicas do fungo.

Palavras-chave: Mofo-branco. Sementes. Detecção Molecular. Taxa de transmissão. GFP. Microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

The white mold disease in soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is one of the most threatening factor in this crop, being matter of increasing concern in Brazil during the last years. The pathogen is considered a soil-borne organism, being also seed transmitted in soybean and several other crops. The association of this fungus with soybean seeds is an important fact from the epidemiological view, since this interaction is one of the most effective way of introduction and spread of inoculum to new regions. Implementation of tolerance standards for that pathogen in certification programs is therefore an important control measure to help in the prevention of the disease. For establishment of that standard in this pathosystem seed health testings which are more accurate and sensible are demanded, in addition to the transmission rate of the pathogen by seeds. In this study the major objectives were to evaluate the relationship between *Sclerotinia sclerotiorum*, in the mycelial form, and soybean seeds with different inoculum potentials of the pathogen, looking at the calculation of the seed transmission rate and the effects of the pathogen on seed quality under controlled conditions. In all trials different cultivars of soybean and isolates of *S. sclerotiorum* were used. The physiological and health quality of the seed lots used were determined according to methods described in the current Rules for Seed Analysis. The experiments on molecular detection of *S. Sclerotiorum* in artificially and naturally infected seeds were conducted by using conventional PCR and quantitative PCR using specific primers described for this pathogen in literature. Seeds with different levels of incidence and intensity of inoculum were prepared for the detection trials using molecular techniques. To check the effect of the pathogen in the performance of soybean seeds and to measure the rate of transmission of *S. sclerotiorum* on seeds, infected seed batches were prepared by the inoculation method based on osmopriming principle as described in literature for that aim. Transmission rates of the pathogen were calculated based on the mathematics relation between percentage of occurrence of the fungus in the seed as determined by health test and the number of seedlings / plants infected by the pathogen. Infected and non infected soybean seeds were submitted to analysis by scanning electron microscopy, to look at the relationship between seed performance and the ultrastructure of colonized seed tissues. In this test molecular tests (PCR) were applied for confirmation of *S. sclerotiorum* in the seeds at different inoculum potentials. For the genetic transformation of *S. sclerotiorum*, the gene marker type GFP (*Green Fluorescent Protein*) was used following protocols previously described with proposed changes. Only the qPCR technique was able to detect *S. sclerotiorum* in all levels of incidence and inoculum potential in soybean seed samples, although the BIO-PCR tests have proved promising for detecting levels of this

pathogen in lower incidence and potential. It was found that the higher inoculum potentials of *S. sclerotiorum* in seeds caused an increased damage in the seed performance as determined under controlled conditions. The transmission rate was affected proportionally with increased inoculum potential, reaching rates of 100% in the highest potential tested. From the ultrastructural analysis it was clear that *S. sclerotiorum* was able to colonize both protective layers of the seeds and the embryo in the mycelial form. This information proved the correlation between poor seed quality and seed performance due to the disorganization of cell tissues infected by the pathogen. The adaptations in the protocol for transformation of *S. sclerotiorum* with the GFP gene marker, proved effective for the transformation of the strain used in this study. In this case there was a higher yield of protoplasts, as well as the incorporation of that gene used in this study and the maintenance of the characteristics of the fungus in terms of virulence and morphology.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Seeds. Molecular detection. Transmission rate. GFP. Scanning electron microscopy.

## SUMÁRIO

|              |   |    |
|--------------|---|----|
|              | <b>CAPÍTULO 1 Detecção, transmissibilidade e efeitos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja</b> .....                     | 14 |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 14 |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 17 |
| <b>2.2</b>   | <b>Aspectos gerais do mofo-branco da soja causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....   | 17 |
| <b>2.2.1</b> | <b>Importância econômica da doença na cultura da soja</b> .....   | 17 |
| <b>2.2.2</b> | <b>Hospedeiros do patógeno</b> .....  | 19 |
| <b>2.2.3</b> | <b>Etiologia, epidemiologia, sintomatologia e diagnose do mofo-branco</b> .....   | 20 |
| <b>2.2.4</b> | <b>Disseminação e transmissão do patógeno</b> .....   | 25 |
| <b>2.2.5</b> | <b>Controle da doença</b> .....   | 27 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 31 |
|              | <b>CAPÍTULO 2 Detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja por meio da técnica de pcr quantitativo e pcr convencional</b> ..... | 39 |
| <b>3</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 41 |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 43 |
| <b>4.1</b>   | <b>Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos</b> .....   | 43 |
| <b>4.2</b>   | <b>Inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja e extração de DNA</b> .....   | 43 |
| <b>4.3</b>   | <b>Condições do PCR convencional e qPCR</b> .....   | 45 |
| <b>4.4</b>   | <b>Avaliação da eficiência, da sensibilidade e da especificidade do ensaio de qPCR</b> .....  | 46 |
| <b>4.5</b>   | <b>Detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja naturalmente infectadas</b> .....   | 47 |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 49 |
| <b>5.1</b>   | <b>Avaliações da especificidade dos primers em detectar <i>S. sclerotiorum</i></b> .....  | 49 |
| <b>5.2</b>   | <b>Eficiência e sensibilidade da técnica de qPCR</b> .....  | 51 |
| <b>5.3</b>   | <b>Comparação entre PCR convencional e qPCR na detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja</b> .....                           | 53 |
| <b>5.4</b>   | <b>Avaliação de sementes de soja naturalmente infectadas</b> .....  | 57 |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 61 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 62 |
|              | <b>CAPÍTULO 3 Transmissão e efeitos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja</b> .....                                      | 68 |
| <b>3</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 70 |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 73 |
| <b>4.1</b>   | <b>Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos</b> .....   | 73 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 4.2 | Perfil dos lotes de sementes utilizados .....   | 73  |
| 4.3 | Preparo e inoculação das sementes .....   | 74  |
| 4.4 | Efeitos na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> .....  | 75  |
| 4.5 | Determinação da taxa de transmissão de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a partir de sementes de soja inoculadas artificialmente .....                              | 77  |
| 4.6 | Análise dos dados .....   | 78  |
| 5   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 79  |
| 5.2 | Determinação da taxa de transmissão de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja inoculadas artificialmente .....                                       | 97  |
| 6   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 104 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 105 |
|     | <b>CAPÍTULO 4 Ultraestrutura de sementes de soja infectadas artificialmente por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....   | 109 |
| 3   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 111 |
| 4   | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 113 |
| 4.1 | Sementes e isolados utilizados .....  | 113 |
| 4.2 | Procedimentos de inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja .....   | 113 |
| 4.3 | Testes aplicados para avaliação da qualidade de sementes .....  | 114 |
| 4.4 | Análise de ultraestrutura de sementes de soja por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....   | 115 |
| 4.5 | Análise estatística .....   | 116 |
| 5   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 117 |
| 5.1 | Qualidade fisiológica e análise ultraestrutural de sementes de soja infectadas artificialmente .....  | 117 |
| 6   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 125 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 126 |
|     | <b>CAPÍTULO 5 Adequação do processo de transformação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com o gene marcador GFP (<i>Green Fluorescent Protein Gene</i>)</b> ..... | 129 |
| 3   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 131 |
| 4   | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 133 |
| 4.1 | Obtenção do isolado e do vetor de transformação .....   | 133 |
| 4.2 | Obtenção de protoplastos .....  | 133 |
| 4.3 | Obtenção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> geneticamente modificada com <i>sgfp</i> .....  | 134 |
| 3.3 | Seleção, verificação da estabilização e características dos transformantes .....  | 135 |
| 4.4 | Teste de patogenicidade .....   | 136 |
| 4.5 | Confirmação da presença do gene GFP por meio de primers específicos .....   | 136 |

|          |                                    |            |
|----------|------------------------------------|------------|
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b> | <b>138</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>            | <b>149</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>           | <b>150</b> |
|          | <b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>   | <b>153</b> |

## CAPÍTULO 1

### **Detecção, transmissibilidade e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**

#### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O desempenho de culturas de importância agrícola é o resultado da conjugação do potencial genético da cultivar, da fertilidade do solo, das condições climáticas, das práticas culturais, da época de semeadura, da população de plantas e da qualidade fisiológica e sanitária das sementes, dentre outros fatores (REIS; CASA, 1996; VIEIRA, 1988).

No âmbito da fitossanidade, a ação de algumas doenças tem limitado o aumento e a melhoria da produtividade, além de ser um empecilho para a expansão ou, mesmo, a manutenção das áreas de plantio em regiões favoráveis para esta finalidade.

Por intermédio das sementes, grande número de patógenos, considerados de risco pode ser disseminado entre regiões produtoras dentro de um mesmo país e entre países, provocando danos de dimensões incalculáveis, além de quase sempre irreversíveis. Os prejuízos econômicos oriundos das doenças que surgem a partir das sementes são variáveis e ainda pouco determinados, em termos numéricos (MACHADO, 1994).

A diagnose precisa e preventiva de agentes causais de doenças de natureza epidêmica em culturas de importância econômica é uma medida que se torna cada vez mais indispensável na agricultura moderna, tendo em vista seu significado em termos de redução dos custos de produção e como meio de sustentação da atividade agrícola em geral.

Para culturas como a soja, que representa importante fonte de divisas para o Brasil, o aspecto sanitário tem sido um dos mais sérios obstáculos à evolução. Embora parte da tecnologia de produção já tenha sido desenvolvida, o aspecto de qualidade de sementes, que é básico para o desenvolvimento de qualquer programa de melhoramento dessa cultura, permanece ainda sem o conhecimento adequado, necessário para atingir o seu potencial máximo de produtividade. Assim, os riscos de introdução e estabelecimento de doenças de natureza epidêmica são crescentes e isto tem ameaçado todo o potencial produtivo dessas regiões.

Dentre as doenças que ocorrem na cultura da soja, o mofo-branco, cujo agente etiológico é *Sclerotinia sclerotiorum* é, atualmente, uma das mais importantes. Este patógeno é categorizado como uma praga não quarentenária regulamentada, devido à sua natureza epidemiológica, que tem merecido das autoridades sanitárias do país, atenção crescente, havendo proposição de tolerância zero no que tange à sua presença em amostras de sementes de soja submetidas à análise sanitária pelos programas de certificação de qualidade para esta espécie (MACHADO; POZZA, 2005).

Apesar de possuir pouca variabilidade morfológica, facilitando de certa forma, a sua diagnose em testes de rotina, os conhecimentos dos mecanismos de infecção e transmissão de *S. sclerotiorum* via sementes de espécies hospedeiras, ainda são aspectos pouco esclarecidos nas condições brasileiras. Esses conhecimentos tornam-se de extrema relevância e urgência para que programas de manejo desta doença sejam colocados em prática pelos produtores de soja. Diante do exposto, percebe-se que é necessário definir a taxa de transmissão e conhecer os efeitos desse patógeno sobre as plantas hospedeiras, quando presente nas sementes em diferentes potenciais de inóculo em condições favoráveis à doença.



Neste estudo, foram definidos como objetivos de investigação: a detecção do agente do mofo-branco em associação com sementes de soja por meio de técnicas moleculares e, avaliações de efeitos do patógeno em foco na qualidade das sementes e de aspectos de sua transmissibilidade via sementes.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.2 Aspectos gerais do mofo-branco da soja causado por *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **2.2.1 Importância econômica da doença na cultura da soja**

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é cultivada em muitas regiões do mundo, sendo considerada uma das principais “commodities” agrícolas do Brasil e a mais importante cultura oleaginosa, possuindo componentes alimentícios e outras propriedades valiosas para a dieta humana. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2010), a safra brasileira de 2009/10 ocupou uma área de 23,4 milhões de hectares, com produção recorde de 68,68 milhões de toneladas, sendo a produtividade média de 2.927 kg/ha. Os investimentos em biotecnologia, voltados para o melhoramento genético, a fertilidade de solos e a realização adequada do controle fitossanitário foram responsáveis pelo aumento do rendimento da cultura, além de tornarem-na adaptável em todo o território nacional. Devido à sua participação expressiva no contexto sócio-econômico do país, a cultura da soja ocupa posição de destaque no cenário mundial. Atualmente, ocupa o segundo lugar em produção de grãos e o primeiro lugar em exportação. A produção mundial está concentrada em apenas três países: EUA, Brasil e Argentina que, juntos, respondem por 80% da produção e 90% da comercialização mundial.

Apesar de inúmeros problemas com clima, pragas e doenças, o crescimento do cultivo de soja segue com a abertura de novas áreas a cada safra no território brasileiro. Para atender à demanda crescente do mercado, são necessários o estabelecimento adequado da cultura e a elevação da produção, o que pode ser alcançado com o uso de sementes com alta qualidade fisiológica e

sanitária, dentre inúmeros outros fatores de produção. No Brasil, o cultivo praticado em uma grande diversidade de ecossistemas faz com que diversos fatores, como as doenças, sejam limitantes ao aumento da produtividade. Um grande número dos agentes causais dessas doenças é veiculado pelas sementes. Entre essas doenças transmitidas e disseminadas por sementes e que prejudicam a cultura da soja, além de outras espécies hospedeiras de grande importância econômica para o Brasil, destaca-se o mofo-branco, cujo agente etiológico é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (sin. *Whetzelinia sclerotiorum*) Korf e Dumont. A ocorrência do mofo-branco no Brasil vem aumentando de forma preocupante nos últimos anos, particularmente em áreas de cultivo, sob irrigação via pivô central (CARDOSO, 1994; MENEZES, 1995; VIEIRA, 1994) e em áreas de soja onde o sistema de plantio-direto é praticado. A introdução da doença nessas áreas pode ser devido ao uso de sementes de soja ou de outras culturas portadoras do patógeno.

Dessa forma, o mofo-branco tem se caracterizado como uma doença de grande importância econômica no Brasil, não só pelos danos que causa às culturas hospedeiras, como a soja, cujas perdas são estimadas em 30% ou mais, como também pela sua atuação subsequente em cultivos futuros desta e de outras espécies de interesse econômico. Cardoso (1994) relatou que, no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, já foram observadas perdas de até 50% no rendimento de várias culturas, sem considerar a provável diminuição da qualidade do produto colhido. Segundo Campos e Silva (2009), somente no estado de Goiás, na safra 2008/2009, ficou evidenciado que 45% da área cultivada com soja, cerca de 1 milhão de hectares, encontrava-se comprometida com a referida doença.

De acordo com Nasser, Resck e Charchar (1990), as perdas mais significativas ocorridas a partir de 1980, no Brasil, na cultura do feijão, têm sido causadas por *S. sclerotiorum*, especialmente nos cerrados, onde a irrigação tem

sido amplamente difundida para algumas culturas que são hospedeiras deste patógeno. Segundo Kerr, Steadman e Nelson (1978), o número de sementes/planta é o componente do rendimento mais afetado, seguido do peso de grãos ou semente.

### 2.2.2 Hospedeiros do patógeno

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao filo dos Ascomycetes, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae. Este patógeno pertence ao grupo dos fungos mitospóricos, subgrupo Hifomicetos (AGRIOS, 2005; INDEX..., 2010; KRUGNER; BACCHI, 1995), apresenta distribuição mundial, e é o agente causal da “podridão-de-esclerotinia”, ou “murcha-de-esclerotinia” ou “mofo-branco” em muitas espécies de plantas cultivadas.

Atualmente, as espécies de *Sclerotinia* taxonomicamente reconhecidas são *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* e *S. minor* (WILLETS; WONG, 1980). Estudos com base no DNA genômico, por meio de técnicas moleculares, separam a maioria dos isolados de *Sclerotinia* dentro dessas três principais espécies, delineadas, inicialmente, com base em características morfológicas e citológicas (KOHN et al., 1988).

Boland e Hall (1994) consideram *S. sclerotiorum* como fungo necrotrófico e relataram a ocorrência de 408 espécies de plantas suscetíveis, pertencentes a 278 gêneros e 75 famílias. Relataram que este fungo ataca 42 variedades de plantas, particularmente hortaliças e culturas anuais, entre elas várias de importância econômica. Purdy (1979) descreveu este fungo como sendo o mais inespecífico dos fitopatógenos e com ampla distribuição geográfica.

No Brasil, o fungo foi descrito, pela primeira vez, em 1920, na cultura da batata, no estado de São Paulo. Atualmente, ocorre em várias espécies

cultivadas como alface, girassol, soja (BALARDIN, 1992; HOMECHIN, 1982), feijão (SANTOS; ATHAYDE, 1983) e algodão (CHARCHAR; ANJOS; OSSUPI, 1999), bem como em algumas plantas daninhas (VIEIRA, 1988) e entre outras várias espécies.

De acordo com dados da literatura, o mapa de ocorrência do mofo-branco da soja, em âmbito mundial, tem se apresentado de maneira bem distribuída. Presume-se que a doença esteja presente em todas as regiões onde a soja é cultivada sob condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento.

### **2.2.3 Etiologia, epidemiologia, sintomatologia e diagnose do mofo-branco**

O entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento de doenças de plantas está fortemente ligado ao conhecimento das características do patógeno, do hospedeiro e do ambiente. Sabe-se que cada um desses componentes exerce papel fundamental no desenvolvimento de epidemias (VALE; JESUS JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2004).

Um agravante da incidência do mofo-branco é o fato de o patógeno *S. sclerotiorum* formar estruturas de resistência conhecidas como escleródios e daí poder sobreviver no solo, mesmo em ambiente desfavorável. O ciclo básico de *S. sclerotiorum* inicia-se com a fase de sobrevivência que decorre da produção dos escleródios, o que, além de concorrer para o aumento da fonte de inóculo, assegura a presença do patógeno por períodos prolongados em ambientes onde são produzidos ou introduzidos, podendo, aí, permanecer por mais de um ano no solo (COOK; STEADMAN; BOOSALIS, 1975) e, segundo Steadman (1983) e Vennett (1998) por até 8 anos.

A germinação desse fungo pode ocorrer de duas maneiras, que afetam diretamente o processo de infecção por *S. sclerotiorum*, conhecidas no campo como germinação miceliogênica e/ou carpogênica (LE TORNEAU, 1979).

Na germinação carpogênica, os escleródios sob determinada condição podem germinar dando origem a um ou mais corpos de frutificação (apotécios). A partir dos apotécios são formados milhares de ascósporos, que são facilmente disseminados. Esses ascósporos são considerados a fonte primária de inóculo e podem sobreviver por mais de 7 meses a baixas umidades e germinam em condições de potenciais osmóticos relativamente baixos. Os apotécios formam-se, geralmente, dentro de 4 a 12 semanas, embora alguns isolados raramente ou nunca chegam a produzi-los (PRATT; ROWE, 1991). A temperatura ótima para a germinação carpogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* está em torno de 8 a 16 °C (DILLARD; LUDWIG; HUNTER, 1995). De acordo com Ferraz et al. (1996), solos ricos em matéria orgânica e com teor de umidade mais elevado podem proporcionar condições mais favoráveis de formação de apotécios, enquanto solos com menor frequência de irrigação e presença de palhada podem provocar a redução de sua formação. Além disso, os escleródios mais velhos e provenientes de solos ricos em matéria orgânica são favorecidos na produção dos apotécios.

Na germinação miceliogênica, ocorre a produção de hifas diretamente dos escleródios e segundo alguns autores elas não apresentam importância como fonte primária de infecção quanto é da produção de apotécio (ABAWI; GROGAN, 1979; COOK; STEADMAN; BOOSALIS, 1975; STEADMAN, 1983). Porém, não há evidência comprovada deste fato para a cultura da soja.

A infecção pelo micélio de *S. sclerotiorum* ocorre pela germinação dos escleródios, que se encontram no solo ou nos restos de culturas, com formação de hifas vigorosas que colonizam a matéria orgânica morta, tornando-se, assim capazes de iniciar o processo de infecção. Ao encontrar uma planta hospedeira, o micélio coloniza tecidos senescentes ou mortos e depois invade, rapidamente, partes sadias, principalmente os tecidos suculentos, fazendo com que as células parasitadas entrem em colapso (AGRIOS, 2005; PURDY, 1979).

Por outro lado, a infecção por *S. sclerotiorum* em tecidos do feijoeiro, na forma de micélio primário proveniente de escleródios, não foi observada em campos de cultivo (ABAWI; GROGAN, 1975). Os autores atribuem o fato à ausência de uma fonte de energia exógena aos escleródios, os quais demonstraram ser incapazes de infectar as plantas mesmo em condições favoráveis. Em estudos sobre o processo de infecção de tecidos de feijão e soja por ascósporos, Sutton e Deverall (1983) concluíram que, na ausência de nutrientes exógenos, os ascósporos produzem pequenos tubos germinativos sobre os tecidos intactos, mas apenas os tecidos jovens são penetrados por hifas originadas de sua germinação.

Dessa forma, sabe-se que há uma exigência, do patógeno, de uma fonte de energia exógena para que os ascósporos possam infectar tecidos sadios ou folhas verdes, vagens ou caules. Órgãos senescentes ou injuriados na planta ou caídos no solo, abaixo do dossel, podem suprir essa energia exógena necessária. Nas culturas hospedeiras, as fontes mais frequentes dessa energia são as flores, notadamente aquelas em fase de senescência ou mortas (ABAWI; GROGAN, 1975; STEADMAN, 1983).

Na literatura, há diversos relatos sobre as condições favoráveis para os processos de germinação e infecção por *S. sclerotiorum*. Segundo alguns relatos deles, a germinação dos ascósporos ocorre em condições de alta umidade relativa e temperatura ótima entre 5-10°C, enquanto a temperatura ótima para crescimento micelial está na faixa de 15°-25°C (ABAWI; GROGAN, 1975). Outras condições requeridas para o processo de infecção, além da temperatura, são o pH do solo entre 6,0 e 9,7 e presença de 8 horas de luz, no mínimo (COOK; STEADMAN; BOOSALIS, 1975).

Segundo Boland e Hall (1987), a ocorrência de epidemias severas de mofo-branco é dependente das condições em que os apotécios se encontram. Neste caso, a presença de umidade na superfície da planta por período entre 39-

64 horas, sob temperatura do ar na faixa de 15-25°C e alta densidade de plantio, é requisito para o desencadeamento de epidemias.

Plantio adensado, fertilização, irrigação ou chuvas, excessivas, principalmente no florescimento da cultura, também favorecem a germinação e a infecção pelo patógeno (BLAD; STEADMAN; WEISS, 1978). Também em relação ao processo de infecção primária por *S. sclerotiorum* em soja, são conhecidos os seguintes mecanismos: a) infecção por ascósporos em pétalas florais que se alojam nas hastes; b) infecção associada aos ascósporos depositados em folhas em contato com o solo úmido; c) infecção por ascósporos que germinam e penetram tecidos injuriados; d) folhas que entram em contato com escleródios na superfície do solo; e) infecção por micélio proveniente de escleródio, que é capaz de infectar o colo da planta (SUTTON; DEVERALL, 1983; TU, 1989). De acordo com Steadman (1983), a infecção secundária resulta de tecidos sadios em contato com áreas infectadas.

Os sinais e os sintomas do mofo-branco em soja podem ser observados, logo após a colonização inicial nos tecidos parasitados, na forma de crescimento superficial de micélio com aspecto cotonoso, de coloração pardacenta, seguida pela produção de escleródios, inicialmente brancos, tornando-se negros quando maduros. Estes escleródios podem ser observados na superfície ou dentro dos órgãos afetados de plantas hospedeiras (AGRIOS, 2005; VIEIRA, 1988). A folhagem acima da região afetada pode murchar ou amarelecer. As sementes atacadas perdem o brilho, tornam-se opacas e com peso reduzido. Algumas sementes, embora com aparência sadia, também podem estar infectadas (STEADMAN, 1983). O período crítico da doença vai do florescimento até a formação e o enchimento das vagens (BOLAND; HALL, 1997). A invasão dos tecidos pelas hifas se dá pela secreção de ácido oxálico e de outras enzimas. O ácido oxálico atua como supressor da explosão oxidativa em plantas



hospedeiras, desativando um dos mecanismos mais importantes de resistência de plantas a patógenos (CESSNA et al., 2000).

Apesar dos avanços já alcançados no conhecimento sobre a biologia e identificação de *S. sclerotiorum*, o desenvolvimento de metodologias para sua diagnose e detecção, particularmente, em sementes, com base em princípios culturais, morfológicos e moleculares, torna-se de extrema importância em programas de certificação de sementes para comercialização. Para a detecção molecular de fungos, especificamente em sementes, é necessário que, independente do método adotado, os marcadores moleculares, no caso par de *primers*, sejam testados quanto à especificidade e otimizados para o máximo de sensibilidade, tanto para a colônia pura do organismo como em associação com sementes, uma vez que a sensibilidade entre um e outro pode variar (DOMBROWSKI et al., 2006).

A detecção e a diagnose precisa de patógenos em sementes e outros materiais de propagação vegetal estão entre as principais etapas no sistema de produção agrícola. Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem, de modo geral, as mesmas regras adotadas pela International Seed Testing Association (ISTA) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzir estruturas ou metabólitos que permitam a sua identificação indireta.

Com os avanços da biologia molecular e aperfeiçoamento de técnicas de pesquisa em geral, tem sido de grande utilidade o uso de marcadores moleculares que permitem fazer o monitoramento dos patógenos, além de outras aplicações, visando ao controle desta doença.

Detalhes sobre a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e outras espécies hospedeiras são descritos no Manual de Análise Sanitária de Sementes, que faz parte das Regras para Análise de Sementes publicadas pelo Ministério da Agricultura (MAPA) (BRASIL, 2009).

A detecção molecular de patógenos em sementes, por meio do PCR convencional, tem sido reportada em alguns patossistemas. Entre eles se encontram *Phomopsis longicolla* e *Diaporthe phaseolorum* em soja (ZHANG et al., 1999); *Magnaporthe grisea*, em arroz (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006) e; *Rhynchosporium secalis*, em sementes de cevada (LEE; TEWARI, 2001; LEE; TEWARI; TURKINGTON, 2001).

O PCR em tempo real pode ser uma possibilidade para aumentar a sensibilidade em relação ao PCR convencional. Em patologia de sementes, é possível quantificar a presença de um único esporo contaminando a semente (CHILVERS et al., 2007). McNeil et al. (2004) quantificaram a contaminação de menos de um esporo por semente com confiança de 95%, de *Tilletia caries*, em sementes de trigo por meio de curvas de calibração. A sensibilidade da técnica em cultura pura chega a 100 pg para *Alternaria brassicae* (GUILLEMETTE, 2004) e 10 fentigrams para *Botrytis* spp. (CHILVERS et al., 2007).

#### **2.2.4 Disseminação e transmissão do patógeno**

Em relação à disseminação de *S. sclerotiorum*, sabe-se que ela pode ocorrer através de ascósporos carregados pelo vento ou dispersos pela água (ADAMS; AYERS, 1979; KIMATI, 1980) e, secundariamente, por meio dos escleródios em solos contaminados, água de irrigação ou implementos agrícolas. À longa distância, as sementes infectadas por micélio ou contaminadas com escleródios constituem a principal forma de disseminação deste fungo (ADAMS; AYERS, 1979).

Com base em estudos exploratórios iniciais e por analogia com trabalhos desenvolvidos com alguns patossistemas conhecidos (ARAÚJO, 2008; BARROCAS, 2008; SARTORI; REIS; CASA, 2004), os mecanismos de transmissão e a dinâmica com que os patógenos acessam plantas emergidas, sob

condições favoráveis para a sua atuação em campos de cultivo, são variáveis de acordo com a natureza de parasitismo de cada organismo. Especula-se, por exemplo, a trajetória que fungos como *S. sclerotiorum*, considerado organismo habitante de solo, podem utilizar para alcançar as plantas emergidas no campo a partir de inóculo presente em diferentes partes da semente, como tegumento e embrião, entre outras partes ou como estruturas acompanhantes em lotes comerciais. A avaliação e a intensidade deste processo, considerando-se aspectos como o papel do inóculo presente nas sementes infectadas e não emergidas e a trajetória desses agentes, seja pela via sistêmica ou pontualizada, dentre outros aspectos, são de grande relevância para o estabelecimento de estratégias de controle das doenças que esses patógenos causam.

Segundo alguns autores, a transmissão de patógenos via sementes implica na passagem do inóculo infectivo dos tecidos das sementes para a progênie e, por outro lado, a passagem do inóculo de plantas infectadas para as sementes produzidas em uma dada circunstância (MACHADO; POZZA, 2005). Porém, a transmissão do patógeno da semente para a planta poderá ou não acarretar no desenvolvimento da doença no campo, já que a associação física do patógeno com as sementes nem sempre é suficiente para assegurar a ocorrência de doença. A transmissão ocorre se houver o estabelecimento do patógeno nos tecidos da progênie (NEERGAARD, 1979).

Do ponto de vista de manejo, o conhecimento mais aprofundado do processo de transmissão de patógenos por sementes, constitui para a agricultura moderna, uma necessidade imperiosa com vistas ao controle das doenças que estes patógenos causam (MACHADO; POZZA, 2005).

### 2.2.5 Controle da doença

Devido à importância do mofo-branco e às dificuldades do seu controle convencional no campo, bem como das discrepâncias existentes entre os resultados de estudos realizados neste campo, com ênfase no controle químico, diversas práticas de manejo da cultura e a integração de diferentes táticas de manejo são requeridas para a obtenção de sucesso no manejo integrado em espécies hospedeiras.

Algumas das dificuldades de controle dessa doença podem ser devido à permanência de escleródios viáveis por longo período de tempo no solo, dos quais são originados os ascósporos e à falta de controle químico eficaz, ao lado da alta suscetibilidade dos hospedeiros cultivados. Assim, o controle mais efetivo baseia-se num programa integrado de medidas, que incluem diversas práticas culturais. A eficiência do controle químico da doença pode ser influenciada pela densidade de inóculo de *S. sclerotiorum* no solo (COSTA; COSTA, 1998). É importante ressaltar que, para o controle do mofo-branco a eficiência do controle químico reside, prioritariamente, em seu caráter preventivo.

Alguns trabalhos têm demonstrado o uso de produtos químicos neste contexto. O uso de fungicidas químicos para o controle do mofo-branco, principalmente na cultura do feijoeiro, vem se tornando uma prática comum em algumas regiões brasileiras, sendo os produtos aplicados via água de irrigação, visando aumentar a eficácia das aplicações, bem como a economicidade desta operação (COSTA; COSTA, 1998; OLIVEIRA et al., 1995; VENEGAS; SAAD, 2010).

Outra alternativa viável é o uso de sementes tratadas para inibir o desenvolvimento do patógeno e evitar sua disseminação e transmissão. Alguns trabalhos de tratamento de sementes visando ao controle do mofo-branco em

algumas espécies hospedeiras, como feijão, girassol, algodão e soja têm sido realizados. Rashid e Swanson (2008) verificaram que o tratamento de sementes com fungicidas promoveu significativa redução da incidência da infecção inicial causada por *S. sclerotiorum*, evitando de 60 a 84% de perdas no rendimento na cultura do girassol. Mueller, Hartman e Pedersen (1999) constataram também que, por meio do tratamento de sementes com os fungicidas químicos, houve redução de 98% da formação de escleródios a partir de sementes de soja infectadas, durante dois anos de estudo. A eficácia de fungicidas no controle do mofo-branco em soja foi avaliada por Mueller, Derksen e Ozkan (2002), que constataram redução de 50% da incidência da doença nas plantas avaliadas. Em trabalhos conduzidos com sementes de soja infectadas artificialmente e sob condições controladas, o inóculo de *S. sclerotiorum* foi sensivelmente reduzido por alguns fungicidas, como tiofanato metílico, fludioxonil e outros, alguns aplicados de forma isolada e outros em mistura (RIBEIRO, 2010).

Outro método que tem sido utilizado também para o controle de *S. sclerotiorum* é o emprego de organismos antagonistas (BETTIOL, 1991; MELO; AZEVEDO, 1998). O uso desses organismos nem sempre erradica os patógenos, pois sua ação depende do equilíbrio biológico existente no solo.

Segundo vários autores, organismos como *Coniothyrium minitans* (HUANG et al., 2000; JONES et al., 2004; LIE; HUANG; ACHARYA, 2003), *Gliocladium roseum* (HANNUSCH; BOLAND, 1996) e espécies de *Trichoderma* (BISSET, 1991; FIGUEIRÊDO et al., 2010), dentre outros, são eficazes no controle de fungos que produzem estruturas de resistência, como é o caso de *S. sclerotiorum*. Embora se trate de uma modalidade de controle que apresenta certas vantagens, o controle biológico não tem sido intensivamente, explorado para o controle do mofo-branco em soja, nas condições brasileiras (ILLIPRONTI JÚNIOR; MACHADO, 1993; MELO, 1996). O uso desses microrganismos antagonistas baseia-se, principalmente, no controle dos

escleródios presentes no solo, por meio da degradação e da interferência na germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* (FIGUEIRÊDO et al., 2010; JONES et al., 2004).

Segundo Lima, Marco e Felix (2000), a premissa básica do controle biológico é a de manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura em níveis econômicos e ecologicamente aceitáveis. Entretanto, apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é o bastante para garantir o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis, havendo, no entanto a vantagem de tornar o controle de doenças, menos dependente do uso de agrotóxico.

O conhecimento das características e das condições ambientais que podem favorecer o processo de germinação de escleródios e infecção pelo patógeno vem sendo utilizado para minimizar os danos e as perdas causados por *S. sclerotiorum*. O uso da rotação de culturas e de palhadas densas de braquiária tem-se apresentado como uma das ferramentas no controle dessa doença (GORGEN et al., 2009). Provavelmente, nestas condições, o ambiente criado na área de cultivo é favorável para que os escleródios de *S. sclerotiorum* sejam parasitados por microrganismos antagonistas presentes no solo ou na própria semente.

A influência da rotação de cultura sobre a produção de apotécios de *S. sclerotiorum* na cultura da soja, foi estudada por Gracia-Garza et al. (2002). Estes autores verificaram que houve uma redução de 47% a 80% na produção de número de apotécios formados, diminuindo, assim, o inóculo primário no campo de produção, quando se adotou esta prática de manejo.

Em relação ao controle genético, as fontes mais conhecidas de resistência não são adaptadas às condições brasileiras e a natureza das mesmas envolve a presença de muitos genes, dificultando o melhoramento de cultivares de soja ou de outras espécies hospedeiras deste patógeno. A dificuldade em

desenvolver progênies resistentes a esse fitopatógeno deve-se ao fato de a resistência fisiológica ser quantitativa, com moderada a baixa herdabilidade (MILKLAS et al., 2001; PASCUAL; CAMPA; PEREZ-VEGA, 2010). Já foram identificados, de forma independente, mais de 10 locos de caracteres quantitativos (QTL) que condicionam resistência ao mofo-branco. Contudo, ainda não há cultivares resistentes e o controle químico isolado não tem sido eficiente.

A importância do tratamento de sementes, no contexto atual da agricultura brasileira, dispensa maiores argumentações, considerando o seu valor como medida preventiva no controle integrado ou manejo de inúmeras doenças de impacto econômico.

O estabelecimento de padrões sanitários para *S. sclerotiorum* em sementes de soja é um alvo que tem sido discutido pelo setor sementeiro no Brasil, no intuito de ser adotado pelos sistemas de controle de qualidade de sementes certificadas. Por se tratar de um organismo dos mais perigosos para a agricultura brasileira, a proposição de tolerância zero para este patógeno em amostras de sementes de soja, tem sido sugerida de maneira emergencial no país (MACHADO, 1994; MACHADO; POZZA, 2005). Neste caso, estudos mais detalhados sobre as relações de *S. sclerotiorum* com sementes de soja se fazem necessários, para a elaboração de esquemas mais adequados de manejo das sementes, nas condições brasileiras.

Com base nas discussões realizadas, ao longo dos últimos anos pela comunidade envolvida com a produção, o uso e o controle de qualidade de sementes no Brasil, informações mais concretas sobre detecção do fungo em sementes de soja, com maior precisão e agilidade, e aprofundamento dos estudos sobre os mecanismos de transmissão e infecção pelo patógeno nessas sementes devem ser colocados como prioridades de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 8, p. 899-904, Aug. 1979.
- \_\_\_\_\_. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 3, p. 300-309, Mar. 1975.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia species*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, Aug. 1979.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922 p.
- ARAÚJO, D. V. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro**. 2008. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BALARDIN, R. S. Doenças do feijoeiro. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis, 1992. p. 195-225.
- BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (Documentos, 15).
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: II., infrageneric classification. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 69, n. 10, p. 2357-2372, July 1991.
- BLAD, B. L.; STEADMAN, J. R.; WEISS, A. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 1431-1437, 1978.



BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 9, n. 3, p. 218-224, Sept. 1987.

\_\_\_\_\_. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009. 200 p.

CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P. **Manejo do mofo-branco na cultura da soja**. Disponível em: <<http://www.fundacaomt.com.br/eventos/download.php>>. Acesso em: 8 maio 2009.

CARDOSO, J. E. Mofo-branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 111-122. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 50).

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of magnaporthe grisea in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 1147-1153, Apr. 2006.

CHARCHAR, M. C. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada Por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1101-1106, ago. 1999.

CHILVERS, M. I. et al. A real-time quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot onion. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 5, p. 599-608, May 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2009/2010**. Disponível em: <<http://www.conaba.gov.br>>. Acesso em: 22 out. 2010.

COOK, G. E.; STEADMAN, J. R.; BOOSALIS, M. G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 3, p. 250-255, 1975.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. S. Efeito dos fungicidas procimidone e benomyl na formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: UNESP, 1998. p. 51.

DILLARD, H. R.; LUDWIG, J. W.; HUNTER, J. E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, Quebec, v. 79, n. 4, p. 411-415, Aug. 1995.

DOMBROWSKI, J. E. et al. A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 11, p. 1064-1070, Dec. 2006.

FERRAZ, L. C. L. et al. Matéria orgânica, cobertura morta, e outros fatores que influenciam a formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos de cerrado. In: PEREIRA, R. C.; NASSER, L. C. B. (Ed.). **Biodiversidade e produtividade sustentável de alimentos e fibras nos cerrados**. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1996. p. 296-301.

FIGUEIRÊDO, G. S. et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 1-9, Jan./Feb. 2010.

GARCIA-GARZA, J. A. et al. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Pathology**, Ottawa, v. 24, n. 2, p. 137-143, Jan./Feb. 2002.

GORGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, dez. 2009.

GUILLEMETTE, T. Conventional and real-time PCR based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 5, p. 490-496, Sept. 2004.

HANNUSCH, D. J.; BOLAND, G. J. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of White mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 156-162, Jan. 1996.

HOMECHIN, M. Situação atual da ocorrência de podridão de *Sclerotinia*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 476, jul./set. 1982.

HUANG, H. C. et al. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Orlando, v. 18, n. 3, p. 270-276, July 2000.

ILLIPRONTI JÚNIOR, R. A.; MACHADO, J. C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 162-166, June 1993.

INDEX fungorum. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

JONES, E. E. et al. Efferct of inoculums type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: influence on apothecial production. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 53, n. 5, p. 621-628, Oct. 2004.

KERR, E. D.; STEADMAN, J. R.; NELSON, L. A. Estimation of white mold disease reduction of yield and yield components of edible beans. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 2, p. 275-279, Mar./Apr. 1978.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 297-318.

KOHN, L. M. et al. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 8, p. 1047-1051, Aug. 1988.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 46-96.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 887-890, 1979.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 2, p. 220-225, Oct. 2001.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. Symptomless infection of barley seed by *Rhynchosporium secalis*. **Canadian Journal Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 315-317, May 2001.

LIE, G. Q.; HUANG, H. C.; ACHARYA, S. N. Antagonism and biocontrol potential of *Gliocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 11-18, May 2003.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 263-304.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 219-248.

MCNEIL, M. et al. Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 53, n. 6, p. 741-750, Dec. 2004.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1, 262 p.

MENEZES, J. R. Controle integrado das doenças do feijoeiro comum irrigado por pivô central. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 1, p. 65-66, jan./mar. 1995.

MILKLAS, P. N. et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 309-315, Mar./Apr. 2001.

MUELLER, D. S.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 1, p. 26-31, Jan. 2002.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, Quebec, v. 83, n. 12, p. 1113-1115, Dec. 1999.

NASSER, L. C. B.; RESCK, D. V.; CHARCHAR, M. J. A. Soil managment, crop sequence and plant diseases in the cerrado region of Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CONSERVATION TILLAGE SYSTEMS, 1., 1990, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UFPF, 1990. p. 190-203.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan, 1979. v. 2, 839 p.

OLIVEIRA, S. H. F. et al. Avaliação comparativa da fungigação e aplicação convencional de fungicidas para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 1, p. 249-252, 1995.

PASCUAL, A.; CAMPA, A.; PEREZ-VEGA, E. Screening common bean for resistance to four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected in Northern Spain. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 7, p. 885-890, July 2010.

PRATT, R. G.; ROWE, D. E. Differential responses of alfalfa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. **Plant Disease**, Quebec, v. 75, n. 2, p. 188-191, Feb. 1991.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, Aug. 1979.

RASHID, K. Y.; SWANSON, J. **Seed treatment for the control of sclerotinia basal-stalk rot/wilt in sunflower**. Ottawa: Agriculture and Agri-Food Canada, 1998. Disponível em: <[http://www.umanitoba.ca/afs/agronomists\\_conf/2001/pdf/rashid.pdf](http://www.umanitoba.ca/afs/agronomists_conf/2001/pdf/rashid.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2010.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.

RIBEIRO, S. G. S. P. **Tratamento de sementes de soja para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 28 p. Monografia (Pós-Graduação em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, A. F.; ATHAYDE, J. F. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na região serrana do Estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 30, n. 169, p. 242-244, maio/jun. 1983.

- SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, jul./ago. 2004.
- STEADMAN, J. R. White mold: a serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, Apr. 1983.
- SUTTON, D. C.; DEVERALL, B. L. Studies on infection of beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, New York, v. 32, n. 3, p. 251-261, Sept. 1983.
- TU, J. C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, Quebec, v. 73, n. 4, p. 281-285, Apr. 1989.
- VALE, F. X. R. do; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.): controle de doenças- doenças da parte aérea causadas por fungos. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 1, p. 335-449.
- VALE, F. X. R. do; JESUS JÚNIOR, W. C. de; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfíl, 2004. 531 p.
- VENEGAS, F.; SAAD, J. C. C. Fungicção no controle do mofo-branco e produtividade do feijoeiro em condições de cerrado brasileiro. **Irriga**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 159-172, abr./jun. 2010.
- VENNETT, J. R. **Proceedings of the Sclerotinia workshop**. Minnesota: Fargo, 1998. 354 p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 231 p.
- VIEIRA, R. F. Mofo-branco no feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 178, p. 54-63, 1994.
- WILLETS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, Bronx, v. 46, n. 13, p. 10-165, Sept. 1980.

ZHANG, A. W. et al. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. **Phytopathologica**, Kew, v. 89, n. 9, p. 796-804, Sept. 1999.

## CAPÍTULO 2

### **Detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja por meio da técnica de pcr quantitativo e pcr convencional**

#### **RESUMO**

*Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da doença conhecida como mofo-branco na cultura da soja, ocasiona queda de produção, além de contaminação do solo, inviabilizando-o para o cultivo dessa leguminosa e de outras espécies durante um longo período de tempo. Uma das formas de introdução da doença no campo de cultivo é por meio de sementes infectadas pelo micélio do fungo. Por isso, a qualidade sanitária das sementes deve ser monitorada por meio de técnicas eficientes de detecção do patógeno ainda em amostras submetidas à análise sanitária. Tendo em vista que as técnicas moleculares têm sido utilizadas para este fim com sucesso em outros patossistemas, neste trabalho o alvo foi testá-las para detecção de *S. sclerotiorum* em associação com sementes de soja. Para isso foram utilizadas sementes de soja artificialmente e naturalmente infectadas pelo patógeno e sua detecção investigada, por meio das técnicas de PCR. As sementes inoculadas artificialmente, via condicionamento osmótico, foram expostas ao patógeno por 0, 24, 48 e 72 horas, correspondendo estes períodos a diferentes potenciais de inóculo, P0, P1, P2 e P3. Para se obter amostras de sementes de soja com diferentes níveis de incidência do patógeno, sementes sadias foram misturadas com sementes infectadas em cada potencial de inóculo, sendo obtidos níveis de incidência de 1%, 2%, 10%, 20% e 100%. Essas amostras foram utilizadas para detecção de *S. sclerotiorum* pela técnica de PCR convencional e qPCR. Somente a técnica de qPCR foi capaz de detectar todos os níveis de incidência com reprodutibilidade. A técnica de PCR convencional foi eficiente em detectar sementes naturalmente infectadas e incubadas previamente por 72 e 96 horas. Tal incubação promoveu aumento expressivo da biomassa do patógeno.

Palavras-chave: Detecção Molecular. Fungo. PCR.



## ABSTRACT

*Sclerotinia sclerotiorum*, the etiological agent of the disease “white mould” in soybean, is responsible for severe losses in this crop causing yield reduction and contamination of soil for long periods of time. The introduction and dissemination of the disease is made through the use of seed lots contaminated with sclerotia and by seeds infected by mycelium of the fungus. Therefore, seed health quality is one aspect to be monitored by means of health testing prior to crop sowing in the field. Molecular techniques have been used successfully to assess seed health quality in other pathological systems. In this study conventional and quantitative PCR techniques were used to assess their viability to detect *S. sclerotiorum* in artificially and naturally infected soybean seed samples. Artificially infected seed bulks were prepared with four inoculum potentials of the pathogen, following the inoculation method based on osmotic conditioning of seeds as described in literature. To obtain seed samples with different incidence percentages of the pathogen, inoculated seeds were mixed to health seeds at different proportions according to the desired incidence of the pathogen to be detected. Seed bulks with 1, 2, 10, 20 and 100% incidences were obtained and submitted to the PCR techniques under investigation. Only the qPCR technique was able to detect all levels of infection by *S. sclerotiorum* with reproducibility. The conventional PCR technique was effective in detecting naturally infected seeds, after previous incubation of seeds for 72 and 96 hours by blotter method. This incubation promoted a significant increase in biomass of the pathogen.

Keywords: Molecular detection. Fungi. PCR.

### 3 INTRODUÇÃO

O mofo-branco da soja, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma doença altamente destrutiva, capaz de hospedar-se em espécies de grande importância econômica para o Brasil, sendo de ocorrência cosmopolita. A importância dessa doença se torna ainda maior se for considerada a participação expressiva da soja no contexto sócio- econômico no agronegócio brasileiro.

A preocupação com este patógeno é também justificada por se tratar de um fungo necrotrófico, com ampla gama de hospedeiros e por inviabilizar o plantio nas áreas de cultivo por períodos de até 10 anos (BOLAND; HALL, 1994). A ocorrência generalizada e devastadora do mofo-branco em campos de soja no Brasil tem causado grande preocupação entre os segmentos da cadeia produtiva desta leguminosa, havendo, para muitas regiões do país, um sério comprometimento em termos da sustentabilidade deste cultivo (PAULA JÚNIOR et al., 2008). Em razão de sua natureza biológica e ampla disseminação, este patógeno tem sido enquadrado na proposição de praga não quarentenária regulamentada com nível de tolerância zero em programas de certificação de sementes, elaborado nos últimos anos, para o Brasil (MACHADO, 1994; MACHADO; POZZA, 2005).

Apesar de o controle do mofo-branco ser um grande desafio para a agricultura nacional, uma vez que deve envolver diferentes medidas de manejo, o uso de sementes com qualidade sanitária comprovada configura-se como o ponto de partida para minimizar os problemas gerados pela referida doença. Sabe-se que as sementes portadoras do inóculo desse patógeno, na forma de micélio dormente ou na forma de escleródios contaminando um determinado lote de sementes, podem ser um fator de introdução e recondução do mesmo em campos de cultivo.

O aprimoramento de métodos diagnósticos de patógenos em sementes é ainda um desafio que os programas de controle de qualidade enfrentam em todo o mundo. Os métodos convencionais para a detecção de *S. sclerotiorum* incluem a incubação de sementes em papel de filtro (*blotter* e *roll tests*) e a incubação de sementes em meio semis-seletivo ágar-bromofenol (NEON). Ambos os métodos apresentam alguns inconvenientes como o período longo de incubação e dificuldades de distinção de *S. sclerotiorum* e outros organismos também presentes nas sementes.

Os métodos moleculares baseados na técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) têm sido investigados visando à detecção de diferentes patógenos em sementes cujas características morfológicas são muito parecidas (CHILVERS et al., 2007; CONSOLO et al., 2009; FANG et al., 2009; GLYNN; EDWARDS, 2010; IOOS et al., 2007, 2009; MBOFUNG; PRYOR, 2010). Estas técnicas mostram-se promissoras para este fim, já que apresentam alta sensibilidade, especificidade, além da vantagem de permitir a avaliação de um grande número de amostras em curto espaço de tempo, podendo ser utilizadas dentro de programas de certificação.

O objetivo nesse estudo foi avaliar a viabilidade do uso de PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR) para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja artificialmente e naturalmente infectadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes, no Departamento de Fitopatologia (DFP)- Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 4.1 Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos

Isolados de *S. sclerotiorum* utilizados neste estudo foram obtidos de culturas hospedeiras do patógeno severamente atacadas e os outros fungos isolados de sementes. Os fungos foram cultivados em BDA (20g de ágar, 20 g de dextrose e 200 g de batata/L) e após a confirmação de suas identidades e pureza foram transferidos para placas de Petri com 15 cm de diâmetro contendo meio BDA, mantidas em incubação, à temperatura de  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias, para *S. sclerotiorum* e à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h por sete dias para os demais fungos escolhidos para este estudo, no caso *Colletotrichum gossypi*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* e *Phomopsis sojae*. Após o crescimento de cada isolado, o micélio produzido superficialmente foi raspado, lavado com água esterelizada, seco e armazenado em nitrogênio líquido, para posterior extração de DNA.

### 4.2 Inoculação de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e extração de DNA

Sementes de soja, cultivar Conquista, obtidas na safra 2008/2009, foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos e enxaguadas em água destilada e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest durante 48 horas. A inoculação das sementes foi inoculada, com o isolado de *S. sclerotiorum* código CMLAPS 242, pela técnica de condicionamento fisiológico descrita na literatura (MACHADO et al., 2004).

A metodologia constou da deposição de discos da cultura pura do fungo sobre BDA acrescido com restritor hídrico manitol, ajustado a -1,0 MPa de acordo com o software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). As placas foram mantidas em incubação a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas por, aproximadamente, 5 dias, quando as sementes foram depositadas em camadas simples sobre cultura fúngica e permaneceram em incubação pelos períodos de 24, 48 e 72 horas, nas mesmas condições citadas anteriormente. Cada tempo correspondeu aos diferentes potenciais de inóculo (Tabela 1). Em seguida, as sementes foram secas em câmara de fluxo laminar, para posterior mistura com sementes sadias.

Tabela 1 Potenciais de inóculo em função do tempo de contato das sementes com colônias de *Sclerotinia sclerotiorum*

| <b>Período de contato entre as sementes e fungo (horas)</b> | <b>Potencial de Inóculo</b> |
|---|-----------------------------|
| 24  | P1                          |
| 48  | P2                          |
| 72  | P3                          |

Para determinar a sensibilidade de detecção de *S. sclerotiorum*, quando associada às sementes de soja por meio da técnica PCR convencional, grupos de 100 sementes foram preparados misturando-se sementes artificialmente infectadas com sementes sadias, gerando níveis diferenciados de incidência de 1%, 2%, 10%, 20% e 100 % para cada potencial de inóculo, já descrito. As amostras de sementes, de cada nível de incidência, foram moídas separadamente em moinho A11 Basic IKA, contendo nitrogênio líquido. A seguir extraiu-se o DNA com Wizard Genomic DNA Purification kit, seguindo o protocolo do fabricante (Promega). Para cada nível de incidência de sementes, foram realizadas cinco extrações de DNA e o experimento conduzido em quintuplicata.

Para prevenir contaminações entre as amostras, o moinho foi sistematicamente limpo e esterilizado entre as trocas de amostras com solução hipoclorito de sódio a 2%.

A qualidade do DNA das amostras foi observada em gel de ágarose 0,8% em tampão 1xTBE (40mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0), corado com Gel Red (Biotium) e visualizado sob luz UV. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro Nano Drop 3300 (Thermo Scientific).

### 4.3 Condições do PCR convencional e qPCR

Para a amplificação dos fragmentos de 278 pares de base, foi utilizado o par de *primers* específicos para a detecção de *S. sclerotiorum* confeccionados por Freeman et al. (2002) (Tabela 2).

Tabela 2 Sequência dos *primers* utilizados dos na identificação do isolado de *S. sclerotiorum* nas reações de PCR realizadas neste estudo

| Primers      | Sequências                    |
|--------------|-------------------------------|
| SSFWD Foward | 5'GCTGCTCTTTTCGGGGCCTTGTA3    |
| SSREV Reward | 5'TGACATGCACTCAATACCAAGCTG 3' |

Para o PCR convencional, utilizou-se o volume total de reação de 25 µL do Top Taq Master Mix (Qiagen) com 0,625µM de cada *primer* e 2 µL do DNA molde (50ng). As amplificações foram feitas no termociclador Multigene, Labnet, NJ, USA. Avaliou-se uma alíquota de 6 µl de cada produto da PCR em gel de ágarose 1,0 % em tampão TBE a 100V, por, aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com Gel Red (Biotium) e os produtos da PCR foram observados em transluminador UV L-PIX – Transiluminator (Loccus- Biotecnologia, Brasil).

Para as análises no qPCR o termociclador utilizado foi o Rotor-Gene 6500 (Corbett Research, Mortlake, Austrália) com otimização de ganho para cada tubo antes da primeira aquisição de fluorescência. A reação foi processada com o uso de um volume total de 20  $\mu\text{L}$  do reagente “SYBR Green PCR kit” (Qiagen) com 0,625  $\mu\text{M}$  de cada *primer* e 2  $\mu\text{L}$  do DNA molde (50 ng). Os valores de Cq para cada reação foram determinados usando o Rotor-Gene (Corbett) software version 1.7.75. Para comparar a quantificação das amostras de sementes inoculadas em cada nível de incidência os valores de Cq foram calculados, sendo consideradas positivas as amostras com  $Cq < 29,09$ . O Ct ou Cq (*threshold cycle*) é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que um produto de PCR é detectado acima do limiar.

Para a extração de DNA, foram retiradas cinco repetições de cada amostra, sendo cada uma testada em triplicata com computação do desvio padrão.

As condições do ciclo para a amplificação foram de 95°C por 10 minutos, seguido de um total de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, realizando-se a técnica de “touchdown” nas temperaturas de anelamento (decrecendo 1 °C, a cada ciclo de 72°C a 65°C), por 1 minuto e extensão de 72°C, por 1 minuto e extensão final de 72°C, por 10 minutos (FREEMAN et al., 2002).

#### **4.4 Avaliação da eficiência, da sensibilidade e da especificidade do ensaio de qPCR**

Uma amostra de micélio *S. sclerotiorum* proveniente da cultura pura diluída foi utilizada para gerar curva de calibração a partir da qual a eficiência do ensaio de qPCR foi determinada. Uma série de 5 diluições da amostra de DNA foi preparada de 250 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 0,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  e foi repetida duas vezes. Os

dados gerados foram utilizados para calcular a equação de regressão linear do ciclo de quantificação (Cq) em relação ao log do número de cópias. A eficiência do ensaio foi determinada a partir da equação de regressão pelo programa Rotor-Gene software version 1.7.75 (CORBETT, 2010). A especificidade foi avaliada por meio da técnica de PCR convencional usando isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes localidades e de outros hospedeiros, assim como outros fungos que infectam sementes.

Para assegurar a especificidade dos *primers* em sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* no qPCR, gerou-se a curva de dissociação que representa os pontos de amplificação em uma determinada temperatura.

Neste trabalho, a especificidade, a sensibilidade e a eficiência foram avaliadas de acordo com o guia Minimum Information for Publication of Quantitative Real-PCR Experiments (BUSTIN, 2010; BUSTIN et al., 2009).

#### **4.5 Detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja naturalmente infectadas**

Sementes de soja naturalmente infectadas foram coletadas na região de Cristalina, GO, em uma área com histórico da doença. Para a detecção de *S. sclerotiorum*, por meio de técnica Bio-PCR, essas sementes foram incubadas em placas de Petri com 15 cm de diâmetro contendo meio BDA (20g de ágar, 20 g de dextrose e 200 g de batata/L) acrescido de 50mg de cloranfenicol; 50mg de azul de bromofenol e manitol com potencial osmótico de -1,0MPa. O pH final foi ajustado para 4,7 com HCl e NaOH. Todos os componentes mencionados, foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. As placas contendo as sementes foram distribuídas em câmara de incubação com temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por 72 e 96 horas. Após cada período de incubação as amostras foram retiradas e moídas em moinho A11 Basic IKA, contendo



nitrogênio líquido. A seguir extraiu-se o DNA com Wizard Genomic DNA Purification kit, seguindo o protocolo do fabricante (Promega). A detecção molecular por meio da técnica de PCR convencional seguiu protocolo descrito no item 4.3.

Foram avaliadas 3 repetições de 25 sementes em cada tempo de incubação. Adicionalmente, foram avaliadas três amostras de sementes naturalmente infectadas sem incubação e de sementes sadias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliações da especificidade dos *primers* em detectar *S. sclerotiorum*

A especificidade do par de *primers* utilizados avaliada em PCR convencional provou ser elevada para os isolados de *S. sclerotiorum*, independentemente do hospedeiro em que foi obtido, não tendo sido observada amplificação em outros fungos que ocorrem naturalmente em sementes.

A avaliação dos produtos da PCR por meio da análise eletroforética em gel de ágarose a 0,8%, obtidos a partir da amplificação de fragmentos do DNA entre a região ITS4/ITS5 dos isolados avaliados com os *primers* específicos desenhados para *S. sclerotiorum*, geraram bandas de 278 pares de base, revelando especificidade para a espécie em questão (Tabela 3). O par de *primers* foi específico para a detecção em cultura pura e na detecção de *S. sclerotiorum* associada a sementes de soja.

Tabela 3 Especificidade dos *primers* SSFWR E SSREV em extratos de culturas puras de fungos utilizados neste trabalho

| <b>Espécie (isolado)</b>             | <b>Hospedeiro</b> | <b>Amplificação<br/>SSFWR/SSREV</b> |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-242)  | Soja              | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-243)  | Soja              | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-244)  | Soja              | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-245)  | Soja              | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-241)  | Feijão            | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-248)  | Girassol          | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-249)  | Girassol          | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-250)  | Girassol          | +                                   |
| <i>S. sclerotiorum</i> (CMLAPS-04)   | Algodão           | +                                   |
| <i>C. gossypii</i> (CMLAPS 269)      | Algodão           | -                                   |
| <i>Fusarium solani</i> (CMLAPS 298)  | Soja              | -                                   |
| <i>Aspergillus niger</i> .(SI)       | Soja              | -                                   |
| <i>Phomopsis sojae</i> . (CMLAPS 18) | Soja              | -                                   |

Abreviações: CMLAPS = Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes, Lavras-MG- Brasil; *C. gossypii* = *Colletotrichum gossypii*; + = reação positiva; - = reação negativa; SI = sem identificação

Conforme citado na literatura, outros *primers* já foram descritos com sucesso para a detecção de *S. sclerotiorum* na forma de ascósporos (KIM; KNUDSEN, 2008; ROGERS; ATKINS; WEST, 2008; YANNI et al., 2009) e em tecidos de plantas infectadas pelo patógeno. A detecção do patógeno em tecidos de sementes de soja ainda não havia sido relatada. Neste trabalho, testou-se também o par de *primers* desenhado por Rogers, Atkins e West (2008), que não amplificou todos os isolados utilizados no estudo (dados não apresentados). É importante ressaltar que a utilização dos *primers* relatados por Freeman et al. (2002) só teve sucesso com a utilização da técnica PCR “touchdown”, tanto em PCR convencional como em qPCR.

Para a detecção de fungos, especificamente em sementes, é necessário que, independentemente do método adotado, o par de *primers* seja testado quanto à especificidade e otimizado para o máximo de sensibilidade, tanto para a colônia pura de fungos, como para o patógeno em associação com as sementes. Da mesma forma, é importante testar os *primers* publicados por outros autores em diferentes isolados da região onde o trabalho está sendo desenvolvido. A variabilidade, naturalmente encontrada, entre isolados fúngicos da mesma espécie, porém, de regiões distintas, pode ocasionar resultados contraditórios entre trabalhos de detecção, quando desenvolvidos em países distintos. Exemplo destes conflitos foi relatado por Barrocas et al. (2011) para o patossistema *Stenocarpella maydis* e milho. Neste caso um par de *primers*, descrito como específico para o referido fungo, não foi capaz de distinguir esta espécie de outra espécie, *S. macrospora*, que também ocorre em sementes de milho.

## 5.2 Eficiência e sensibilidade da técnica de qPCR

Por meio da curva de calibração da cultura pura de *S. sclerotiorum* nas diferentes concentrações analisadas, observou-se a elevada sensibilidade da combinação do par de *primers* utilizados neste trabalho. Esta curva relacionou o nível de fluorescência com a quantidade de DNA amplificado.

A eficiência de 1,32 foi determinada pela equação de regressão linear gerada pelos valores médios das amplificações correspondentes (Gráfico 1). Os resultados deste estudo mostraram relação linear entre os valores de Cq e os valores do log da concentração de DNA com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,924 e limite de detecção de 0,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . O limite de detecção da técnica é definido como concentração no qual 95% das amostras positivas são detectadas (BUSTIN et al., 2009). A sensibilidade do ensaio foi determinada por meio da seguinte equação  $Y=-2,73X+13,18$ , através da curva de dissociação.

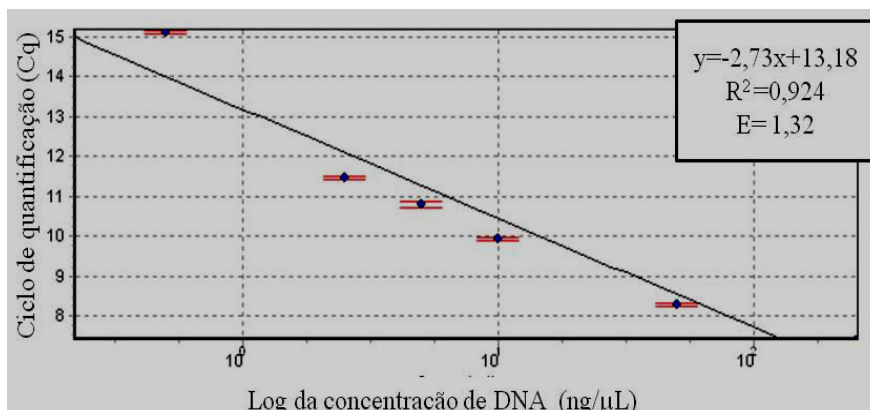


Gráfico 1 Curva padrão e coeficiente de correlação avaliado com diluição de DNA de *S. sclerotiorum*, utilizando os *primers* SSFWR/SSREV (FREEMANN et al., 2002) em “quantitative polymerase chain reaction” (qPCR). O DNA do patógeno foi diluído com concentrações de 250 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 0,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$

Após a amplificação por PCR em tempo real, cada produto de amplificação foi analisado por uma curva de dissociação, certificando que, para cada amostra de DNA, o produto amplificado não apresentou bandas inespecíficas e/ou formação de dímeros de *primer*.

Por meio da curva de dissociação, verificou-se uma especificidade na reação de qPCR, ocorrendo a detecção em um único ponto de amplificação, em todas as amostras avaliadas. A avaliação da curva de dissociação em sementes infectadas indicou que, mesmo outros organismos contaminantes, presentes naturalmente nas sementes não foram amplificados, o que dá mais confiabilidade a técnica quando se avalia a detecção de patógenos em sementes. O produto de amplificação das amostras apresentou um único pico de fluorescência e teve sua dissociação na temperatura de 85°C, correspondente à temperatura de desnaturação do fragmento de interesse.

### **5.3 Comparação entre PCR convencional e qPCR na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja**

Para a comparação da técnica de PCR convencional e qPCR foram considerados positivos os valores com  $Cq \leq 29,09$ . Por outro lado foram consideradas amostras positivas, na avaliação em PCR convencional, aquelas que, no mínimo em uma repetição, apresentaram bandas correspondentes a 278 pares de base. Embora seja possível perceber bandas em todos os níveis de incidência gerados (Figura 1) a técnica não apresentou reprodutibilidade na detecção de amostras com potencial de inóculo P1. Nessas avaliações somente com 10%, 20% e 100% das sementes infectadas foi possível detectar *S. sclerotiorum* em todas as cinco repetições de todos os potenciais de inóculo avaliados. Já no qPCR foi possível detectar o patógeno em todas as repetições avaliadas, mesmo em amostras que foram expostas ao patógeno por apenas 24 horas, correspondendo ao potencial de inóculo P1 e menor incidência (1%). Este fato confirma a maior sensibilidade da técnica já destacada em trabalhos com foco na detecção de patógenos.

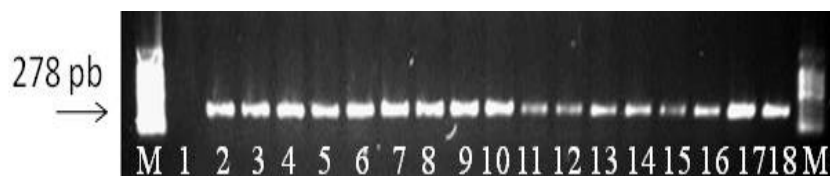


Figura 1 Amplificação do DNA genômico de *S. sclerotiorum* por PCR convencional em diferentes níveis de incidência em sementes de soja. Linha M – 100 bp ladder DNA (QUIAGEN GelPilot, E.U.A). 1=sementes sadias; 2= P3 100% de incidência; 3= P3 20% de incidência; 4= P3 10% de incidência; 5= P3 2% de incidência; 6= P3 1% de incidência; 7= P2 100% de incidência; 8= P2 20% de incidência; 9= P2 10% de incidência; 10= P2 2% de incidência; 11= P2 1% de incidência; 12= P1 100% de incidência; 13= P1 20% de incidência; 14= P1 10% de incidência; 15= P2 2% de incidência; 16= P1 1% de incidência; 17= Cultura pura de *S. sclerotiorum* CMLAPS 245, 18= Cultura pura de *S. sclerotiorum* CMLAPS 241

Em todas as 75 extrações de DNA de sementes com diferentes níveis de incidência, os valores de C<sub>q</sub> ficaram entre 16,85 e 29,09 e confirmaram a presença do patógeno em associação com sementes. Por outro lado, verificou-se que não houve incremento de fluorescência no isolado de *Fusarium solani*, proveniente de sementes de soja e nem em sementes sadias, confirmando, assim, que não foram gerados resultados falso-positivos, o que confirma a especificidade dos *primers* utilizados neste trabalho (Gráfico 2).

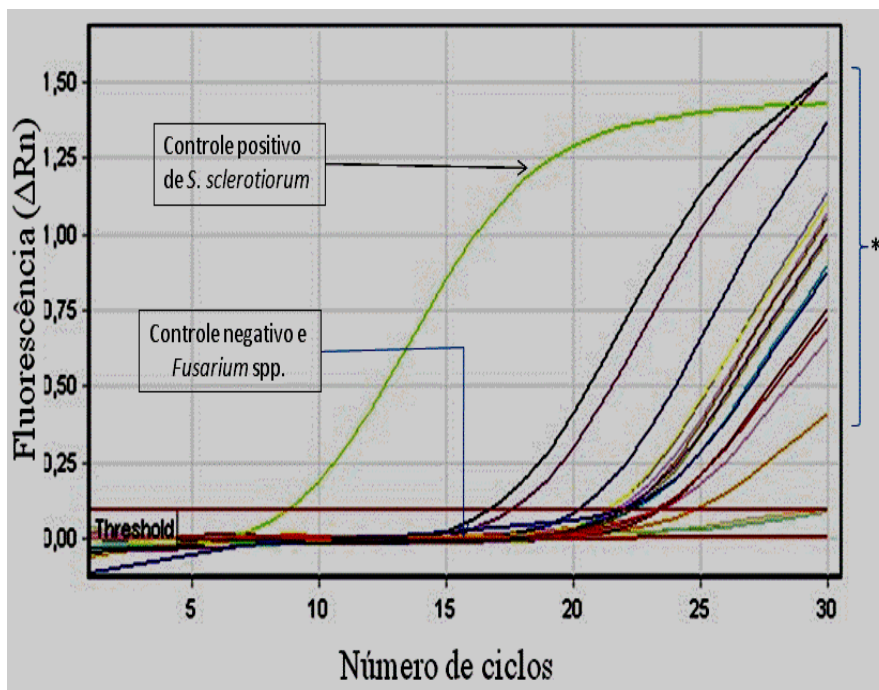


Gráfico 2 Curvas de amplificação referente à detecção de *S. sclerotiorum* por meio da técnica de quantitative polymerase chain reaction (qPCR) com o uso de SYBR® Green, indicando o incremento do sinal de fluorescência

\* Sementes de soja infectadas com *S. sclerotiorum* nos diferentes potenciais de inóculo P3, P2 e P1 com incidências de 100%, 20%, 10%, 2% e 1 %, respectivamente, em cada potencial

Pode-se observar que, com a redução da concentração do DNA houve aumento do número de ciclos necessários para se alcançar um nível de fluorescência detectável, ou nível crítico de *threshold* (Ct). Isto ocorre, considerando-se que quanto menor a quantidade do DNA presente na amostra inicial de amplificação maior é o número de ciclos necessários para se detectar certos níveis de fluorescência.

Pelo seu fundamento, a técnica de PCR quantitativo é um método ideal para detectar pequenas quantidades do patógeno no hospedeiro por causa de sua



maior sensibilidade e reprodutibilidade quando comparado ao PCR convencional. Outra grande vantagem é que trata-se de um método mais rápido, visto que amplificação, detecção e quantificação ocorrem no mesmo tubo eliminando a possibilidade de falsos-positivos.

Nesse trabalho foi utilizado o corante intercalante SYBR Green que, embora seja menos sensível que sondas, apresentou resultados satisfatórios em relação à detecção de sementes infectadas por *S. sclerotiorum* com baixos níveis do patógeno, com 1% e 2%. Segundo Bilodeaut et al. (2007), que compararam as técnicas SYBR Green, Taq Man e molecular “beacon” para a detecção de *Phytophthora ramorum* em carvalho, o uso de SYBR Green apresentou resultados com menor eficiência, isto se deve à menor sensibilidade deste corante, uma vez que não é específico para os produtos em formação (WITTER et al., 1997).

É importante destacar que, neste trabalho, cujo objetivo era detectar *S. sclerotiorum* em associação com sementes, os resultados podem ser considerados satisfatórios. A detecção deste fungo foi possível em sementes com baixos potenciais de inóculo e baixa incidência do patógeno nas amostras de sementes testadas. A técnica de qPCR apresentou boa reprodutibilidade, ao contrário da PCR convencional. Os resultados mostraram que é possível detectar uma semente infectada em uma amostra composta de 100 sementes. A grande dificuldade em detectar pequenas quantidades de propágulos nas sementes, aliada à dificuldade de amostragem para o procedimento de extração de DNA, constitui, ainda, desafio para a detecção de patógenos em sementes. Nesse ensaio, foram utilizadas 100 sementes, porém em análises de rotina, esse número é, em geral, de 400 sementes.

Devido à variação de Cq observada neste trabalho, o modelo pode ser recomendado para julgar lote de sementes de soja, para detecção de *S. sclerotiorum*, havendo necessidade, no entanto, de alguns aprimoramentos na

técnica para inferir, com maior precisão, a respeito da quantificação do fungo em cada nível de incidência. No anexo 1 observam-se os valores médios do Cq em todas as repetições avaliadas.

É importante considerar que a técnica de PCR convencional indica somente presença ou ausência do patógeno, em uma amostra, o que pode ser um fator limitante no âmbito da Patologia de Sementes. Para a detecção molecular de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, cujo índice de tolerância proposto em sementes tem sido zero, o teste pode ser recomendado em uma operação de *screening* informando se o lote está ou não infectado, permitindo rapidamente o uso dos lotes sadios. Para os lotes considerados infectados outras técnicas complementares podem ser utilizadas no intuito de indicar a incidência e a viabilidade do patógeno. Por outro lado a técnica de qPCR pode representar uma informação a mais para ser utilizada no manejo sanitário de sementes. A quantificação de patógenos no lote de sementes não é considerada em testes de rotina, assim como, não é considerada nas recomendações de fungicidas utilizados no tratamento de sementes. Essas informações devem ser avaliadas, visto que o tratamento de sementes em lotes com alto potencial de inóculo pode não surtir o resultado desejado.

#### **5.4 Avaliação de sementes de soja naturalmente infectadas**

O método da Bio-PCR se mostrou mais eficiente quando comparado com o método convencional. As amostras positivas na avaliação em PCR foram aquelas que, no mínimo, em uma repetição, apresentaram bandas correspondentes a 278 pares de base. Na avaliação das amostras que não foram incubadas, somente em uma repetição, das cinco avaliadas, foi detectado o patógeno em questão. Para os tempos de incubação de 72 e 96 horas todas as amostras mostraram-se positivas (Tabela 4).

Tabela 4 Detecção de *S. sclerotiorum* (presença/ausência) em sementes de soja naturalmente infectadas, por meio da BIO-PCR, utilizando os primers SSFWR E SSREV

| Repetição<br>(25 sementes) | Tempo de incubação |          |          |
|----------------------------|--------------------|----------|----------|
|                            | 0 horas            | 72 horas | 96 horas |
| R1                         | - (1)              | +        | +        |
| R2                         | +                  | +        | +        |
| R3                         | -                  | +        | +        |

(1): + = reação positiva, - = reação negativa

Por meio da Bio-PCR a incubação prévia das sementes proporciona aumento da biomassa de *S. sclerotiorum* e de outros fungos presentes nas sementes (Figura 2). Pelos resultados obtidos neste ensaio, ficou evidenciado que não houve interferência dos demais fungos observados, na amplificação utilizando *primers* específico para *S. sclerotiorum*.

No contexto da Patologia de Sementes a técnica de Bio-PCR pode ser utilizada com sucesso para enriquecer a biomassa do fungo na semente, possibilitando, assim, o aumento da sensibilidade de sua detecção e diluindo a interferência de potenciais inibidores durante o período de incubação (BARROCAS et al., 2009). Quando associado às técnicas de PCR, o procedimento prévio da incubação das sementes faz com que organismos viáveis alvos, sejam detectados e quantificados com mais precisão pelo uso das técnicas moleculares.

Uma das dificuldades ressaltadas no âmbito do controle de qualidade sanitária de sementes tem sido a ocorrência de patógenos em baixa incidência e em baixos potenciais de inóculo nas sementes (KONSTANTINOVA et al., 2002). Da mesma forma, tem sido também relatada como dificuldade a presença de inibidores como os que ocorrem naturalmente nas sementes. Por isso, o

acrécimo de mais uma etapa no protocolo de detecção de um patógeno pode contribuir para a redução de problemas dessa natureza. É importante frisar que, mesmo tendo-se um período de incubação prévia das sementes relativamente longo, neste trabalho, não houve interferência de outros organismos presentes nas sementes em teste, o que caracteriza a elevada especificidade dos *primers* utilizados.

É válido também destacar que a detecção de patógenos diretamente nas sementes é um alvo muito importante, do ponto de vista de dinâmica de trabalho, por parte dos laboratórios de análise de sementes em esquema de rotina. À medida que a fronteira agrícola assume proporções das mais elevadas, o esquema de análise de sementes deve ser preciso, econômico e ágil. Vale lembrar que os trabalhos de diagnose de alguns dos fungos transmitidos por sementes requerem, inicialmente, o seu isolamento em culturas puras e, em seguida, ser submetidos a exames específicos de acordo com sua natureza e a finalidade da análise. Especificamente no caso das técnicas moleculares a presença de substâncias como taninos, componentes fenólicos e carboidratos nos tecidos das sementes pode ser causa de inibição ou influência na atuação da enzima Taq DNA polimerase utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste caso há a redução da sensibilidade, dificultando as amplificações das regiões estudadas e gerando resultados falsos negativos (BARROCAS et al., 2009).

Nesse caso, a adoção da Bio-PCR pode minimizar problemas na detecção de patógenos em sementes. Esse processo tem sido adotado com sucesso por diversos autores (GUILLEMETTE; IACOMI-VASILESCU; SIMONEAU, 2004; MBOFUNG; PRYOR, 2010; PHAN et al., 2002; YOOS et al., 2009; YUAN et al., 2009).

Em complemento aos estudos realizados neste ensaio, julga-se importante e necessária a avaliação de um maior número de lotes de sementes,

sem conhecimento do histórico da área, bem como avaliar períodos de incubação das sementes menores que 72 horas

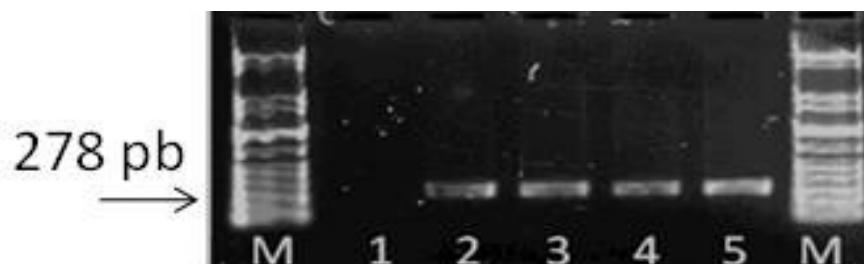


Figura 2 Amplificação do DNA genômico de *S. sclerotiorum* em sementes naturalmente infectadas. Linha 1= Sementes saudáveis. Linha 2= Sementes sem incubação portadoras do patógeno. Linha 3= Sementes incubadas por 72 horas. Linha 4= Sementes incubadas por 96 horas. Linha 5= Cultura pura de *S. sclerotiorum* CMLAPS 245, utilizando o primer desenhado por Freemann 2002. Linha M – 100 bp ladder DNA (QUIAGEN GelPilot, E.U.A)

## 6 CONCLUSÕES

A detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja por técnica molecular, especificamente por PCR convencional e qPCR, com uso de *primers* descritos na literatura, é viável e reproduzível sendo capaz de detectar a incidência do patógeno em níveis a partir de 1% nas sementes de soja.

Por meio da incubação prévia das sementes de soja pelo período de 72 horas, a sensibilidade da técnica de PCR, no caso Bio-PCR, foi significativamente aumentada, tendo sido *S. sclerotiorum* detectada em sementes naturalmente infectadas em baixa incidência de inóculo.

As reações de PCR convencional e PCR quantitativo, com suas modificações testadas, não sofreram interferência de componentes das sementes, fazendo com que essa técnica possa ser utilizada para diagnose do agente do mofo-branco em sementes de soja submetidas à análise laboratorial.

## REFERÊNCIAS

BARROCAS, E. N. et al. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp associated to maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, 2011. In press.

\_\_\_\_\_. Uso de técnicas moleculares para a diagnose de patógenos em sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24-32, 2009.

BILODEAU, G. J. et al. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using Taqman, SyBR green and molecular beacons. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 5, p. 632-642, May 2007.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?: the case for MIQE. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 50, n. 4, p. 217-226, Apr. 2010.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, London, v. 55, n. 4, p. 611-622, Aug. 2009.

CHILVERS, M. I. et al. A real-time quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot onion. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 3, p. 599-608, Mar. 2007.

CONSOLO, V. F. et al. A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 38, n. 3, p. 222-227, Apr. 2009.

CORBETT. Disponível em:  
<<http://www.qiagen.com/corbett/welcome.aspx?CountryID=BR>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

FANG, Y. et al. Real-time fluorescence PCR method for detection of *Burkholderia glumae* from rice. **Rice Science**, New York, v. 16, n. 2, p. 157-160, 2009.

FREEMAN, J. et al. A polimerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p. 877-886, July 2002.

GLYNN, N. C.; EDWARDS, S. G. Evaluation of PCR assay for quantifying seed-borne infection by *Fusarium* and *Microdochium* seedling blight pathogens. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 81-87, Jan. 2010.

GUILLEMETTE, T. et al. Convencional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 490-496, May 2004.

IOOS, R. et al. Development of PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara hastedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 56, n. 5, p. 209-218, May 2007.

\_\_\_\_\_. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 582-590, May 2009.

KIM, T. G.; KNUDSEN, G. R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 100-108, Feb. 2008.

KONSTANTINOVA, P. et al. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 23-33, Jan. 2002.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-264, 1994.

MACHADO, J. C. et al. Use of water restriction technique in seed pathology. **Seed Testing International, News Bulletin**, Zurich, n. 128, p. 14-18, Oct. 2004.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 375-399.



MBOFUNG, G. C.; PRYOR, B. M. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 7, p. 860-866, July 2010.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 126-130, Jan./Feb. 1995.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. **Manejo do mofo-branco do feijoeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 4 p. (Circular Técnica, 13).

PETROFEZA, S. Diversidade genética em populações de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2010, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Tropical Plant Pathology, 2010. p. 102-114.

PHAN, H. T. T. et al. A rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of ascochyta blight of chickpea. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2002.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 2, p. 324-331, Apr. 2008.

WITTER, C. T. et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, Natick, v. 22, n. 1, p. 130-138, Jan. 1997.

YANNI, Y. et al. Detection of *Sclerotinia sclerotinia* in planta by a real-time PCR assay. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 57, n. 7/8, p. 465-469, Aug. 2009.

YOOS, R. et al. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 582-590, May 2009.

YUAN, F. et al. Real-time fluorescence PCR method for detection of *Burholderia glumae*. **Rice Science**, New York, v. 16, n. 2, p. 157-160, 2009.

## ANEXO 1 Resultados da qPCR e PCR convencional

| Potencial de inóculo (h) | Repetição | Incidência (%) | Cq (média) | PCR |
|--------------------------|-----------|----------------|------------|-----|
| 24                       | R1        | 1              | 29,09      | -   |
| 24                       | R2        |                |            | -   |
| 24                       | R3        |                |            | +   |
| 24                       | R4        |                |            | -   |
| 24                       | R5        |                |            | -   |
| 24                       | R1        | 2              | 21,57      | -   |
| 24                       | R2        |                |            | -   |
| 24                       | R3        |                |            | +   |
| 24                       | R4        |                |            | -   |
| 24                       | R5        |                |            | -   |
| 24                       | R1        | 10             | 21,90      | -   |
| 24                       | R2        |                |            | +   |
| 24                       | R3        |                |            | +   |
| 24                       | R4        |                |            | +   |
| 24                       | R5        |                |            | -   |
| 24                       | R1        | 20             | 23,72      | +   |
| 24                       | R2        |                |            | +   |
| 24                       | R3        |                |            | +   |
| 24                       | R4        |                |            | +   |
| 24                       | R5        |                |            | +   |
| 24                       | R1        | 100            | 23,60      | +   |
| 24                       | R2        |                |            | +   |
| 24                       | R3        |                |            | +   |
| 24                       | R4        |                |            | +   |
| 24                       | R5        |                |            | +   |
| 48                       | R1        | 1              | 22,31      | +   |
| 48                       | R2        |                |            | +   |
| 48                       | R3        |                |            | +   |
| 48                       | R4        |                |            | +   |
| 48                       | R5        |                |            | +   |
| 48                       | R1        | 2              | 22,39      | +   |
| 48                       | R2        |                |            | +   |
| 48                       | R3        |                |            | +   |
| 48                       | R4        |                |            | +   |

## ANEXO 1, continuação

|    |    |     |       |   |
|----|----|-----|-------|---|
| 48 | R5 |     |       | + |
| 48 | R1 | 10  | 22,50 | + |
| 48 | R2 |     |       | + |
| 48 | R3 |     |       | + |
| 48 | R4 |     |       | + |
| 48 | R5 |     |       | + |
| 48 | R1 | 20  | 23,48 | + |
| 48 | R2 |     |       | + |
| 48 | R3 |     |       | + |
| 48 | R4 |     |       | + |
| 48 | R5 |     |       | + |
| 48 | R1 | 100 | 20,34 | + |
| 48 | R2 |     |       | + |
| 48 | R3 |     |       | + |
| 48 | R4 |     |       | + |
| 48 | R5 |     |       | + |
| 48 | R1 | 1   | 22,20 | + |
| 48 | R2 |     |       | + |
| 48 | R3 |     |       | + |
| 48 | R4 |     |       | + |
| 48 | R5 |     |       | + |
| 72 | R1 | 2   | 17,77 | + |
| 72 | R2 |     |       | + |
| 72 | R3 |     |       | + |
| 72 | R4 |     |       | + |
| 72 | R5 |     |       | + |
| 72 | R1 | 10  | 16,85 | + |
| 72 | R2 |     |       | + |
| 72 | R3 |     |       | + |
| 72 | R4 |     |       | + |
| 72 | R5 |     |       | + |
| 72 | R1 | 20  | 21,53 | + |
| 72 | R2 |     |       | + |
| 72 | R3 |     |       | + |
| 72 | R4 |     |       | + |
| 72 | R5 |     |       | + |

## ANEXO 1, continuação

|        |    |     |       |   |
|--------|----|-----|-------|---|
| 72     | R1 | 100 | 22,25 | + |
| 72     | R2 |     |       | + |
| 72     | R3 |     |       | + |
| 72     | R4 |     |       | + |
| 72     | R5 |     |       | + |
| CMLAPS | -  |     | 8,97  | + |

Legenda: CMLAPS = Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes, Lavras-MG- Brasil; Cq= ciclo de quantificação; PCR conv.= PCR convencional; + = reação positiva; - = reação negativa

## CAPÍTULO 3

### Transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja

#### RESUMO

*Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco na cultura da soja é considerado um organismo de solo transmitido por sementes. A determinação de sua taxa de transmissão constitui importante subsídio para o estabelecimento do padrão de tolerância desse organismo para uso em programas de certificação de sementes. Para isso, dois ensaios foram realizados. No primeiro, as sementes de soja de duas cultivares, Conquista e Tucunaré, foram inoculadas com dois isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de duas regiões de Minas Gerais. As sementes foram expostas às colônias do fungo por 0, 24, 48 e 72 horas, correspondendo esses períodos aos potenciais de inóculo, P0, P1, P2 e P3, respectivamente. As sementes foram distribuídas em substrato de solo em caixas plásticas e acondicionadas ao acaso em câmara de crescimento vegetal, com temperatura ajustada a 20°C. Todas as sementes não germinadas foram transferidas para meio BDA e após 30 dias, todas as plantas foram seccionadas a 2 cm da altura do coleto e na inserção do primeiro par de folhas. Os fragmentos de aproximadamente 2 cm foram desinfestados e transferidos para o meio semi-seletivo, para *S. sclerotiorum*, denominado de NEON. A partir do terceiro dia foi observada a formação de halos amarelados em volta dos fragmentos, correspondente ao crescimento típico do referido patógeno. Os efeitos de *S. sclerotiorum* nas sementes com diferentes potenciais de inóculo foram avaliados através dos testes de germinação, índice de velocidade de emergência, estande inicial e final e peso da matéria seca da parte aérea e da raiz das plantas. O somatório das sementes não germinadas e dos fragmentos que estavam com *S. sclerotiorum* constituiu a base para o cálculo da taxa de transmissão em cada cultivar. Verificou-se que as taxas de infecção e transmissão foram aumentando à medida que aumentou o tempo de contato das sementes com o patógeno. A maior taxa de transmissão observada foi de 100%, no maior potencial de inóculo. Já para os potenciais P1 e P2 os maiores valores observados da taxa de transmissão foram de 33% e 73%, respectivamente. A qualidade fisiológica das sementes foi reduzida proporcionalmente ao aumento dos potenciais de inóculo. Em relação à virulência do patógeno, não houve diferença entre as cultivares analisadas.

Palavras-chave: Transmissão de patógeno. Sementes. Qualidade Fisiológica. Mofo-branco.

## ABSTRACT

“White mould” disease in soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, is considered one of the most severe causes of yield reduction, being its pathogen considered a soil contaminant and seed transmitted in several hosts. The determination of the transmission rate of such pathogen in soybean seeds is an important issue to establish tolerance level for its occurrence in seed lots produced under certification schemes. The objectives were to calculate the transmission rate and to evaluate the effects of the pathogen on soybean seed performance under controlled conditions. Two soybean cultivars, both susceptibles to the disease, two isolates of *S. sclerotiorum* from different geographical origins and four inoculum potentials of the pathogen in seeds were used under favorable conditions for the disease development. Seeds were sown in sterilized soil in plastic boxes and placed randomly in a growth room with temperature of 20°C. All non germinated seeds and two centimeter fragments cut at different positions of the emerged plants were used for isolation and identification of the pathogens in semi-selective media. The effects of *S. sclerotiorum* on seed performance at different inoculum potentials were evaluated by assigning the germination, emergence speed tests, initial and final stands and dry weights of shoot and plant roots. Infection and transmission rates were higher at the highest inoculum potential in seeds. The highest transmission rate observed was 100%. Transmission rates of the pathogen in seeds with lower inoculum potentials varied in the range of 33% to 73%. The physiological quality of seeds was reduced in the proportion of inoculum potential of the pathogen and no difference in virulence of both isolates used was observed in relation to both cultivars used.

Keywords: Transmission of pathogen. Seeds. Physiological quality. White mold.

### 3 INTRODUÇÃO

O mofo-branco ou podridão-de-esclerotínia, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, está entre as principais doenças da soja e outras espécies, sendo limitante para o desenvolvimento dessas culturas. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um dos principais hospedeiros deste patógeno.

O mofo-branco tem sido frequentemente responsável por prejuízos diretos ou indiretos, na forma de redução do volume e da qualidade da produção, dentre outras consequências frustrantes para os produtores.

Na literatura há poucos relatos sobre a importância do micélio na disseminação e transmissão da doença quando este fungo está associado às sementes de espécies hospedeiras, como no caso da soja. Este patógeno, como a maioria dos fungos desta cultura, pode ser transmitido via semente, como micélio dormente ou como contaminante na forma de escleródios.

Tendo em vista o fato de que a severidade da doença no campo nem sempre apresenta correlação com a percentagem de sementes infectadas pelo patógeno e que mesmo plantas pouco afetadas podem apresentar grande número de sementes infectadas (LIMA et al., 1985), percebe-se que há uma carência de estudos sobre transmissão deste patógeno por sementes. Esta transmissão pode ocorrer da planta à semente e da semente à planta. No último caso, a semente pode veicular o patógeno, mas poderá não desencadear a doença, já que a associação do patógeno com sementes nem sempre assegura a ocorrência de doença e a transmissão ocorre somente se houver o estabelecimento do agente patogênico (NEERGAARD, 1979).

A concretização da transmissão dos patógenos às plantas, a partir de sementes, pode ocorrer de diferentes maneiras, em função da posição do inóculo do patógeno na semente e da natureza de atuação desses agentes nos hospedeiros correspondentes. Nessa relação biológica, diversos fatores de natureza física,

biológica e inerentes ao próprio tipo de germinação das sementes podem interferir no estabelecimento definitivo do patógeno no campo (MACHADO, 1988). Assim, este padrão de transmissão de patógenos por sementes é bastante variável (NEERGAARD, 1979).

Estudos de transmissão de patógenos são importantes, por gerarem subsídios para o estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes. Entende-se por padrões o número mínimo de plantas infectadas, acima do qual os surtos epidêmicos são iminentes (HEWETT, 1987; MACHADO, 1994).

O conhecimento e a elucidação dos mecanismos de transmissão de *S. sclerotiorum* são subsídios importantes para a escolha de medidas eficientes para o controle do mofo-branco. Apesar de este controle ser um grande desafio para a agricultura nacional, o uso de sementes com qualidade sanitária comprovada parece ser o ponto de partida para que não ocorram a infestação ou a reinfestação nas áreas de cultivo. A disseminação de *S. sclerotiorum* por meio de sementes infectadas tem sido relatada por alguns pesquisadores (GOMES et al., 2010; PETROFEZA, 2010). Diante da importância dessa espécie, ela se torna um organismo com potencial a ser enquadrado como não quarentenário regulamentado conforme a proposição recente no Brasil (MACHADO, 1994; MACHADO; POZZA, 2005). Baseado neste fato, há a proposição de se estabelecer o nível de tolerância zero para este patógeno em sementes básicas, certificadas e fiscalizadas de soja no Brasil (MACHADO, 1994; MENTEN, 1997).

Em relação à transmissibilidade de *S. sclerotiorum* pela semente, ainda existem dúvidas, não havendo uma relação da porcentagem de transmissão das sementes infectadas na forma micelial nas culturas da soja e outras espécies hospedeiras deste patógeno.



Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi mensurar a taxa de infecção e de transmissão de *S. sclerotiorum* na forma micelial a partir de sementes de soja infectadas, bem como avaliar seu efeito na qualidade fisiológica e sanitária, decorrente desta interação em condições controladas.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes, no Departamento de Fitopatologia (DFP)-Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **4.1 Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos**

Foram utilizados dois isolados de *S. sclerotiorum*, associados às sementes de soja, provenientes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, Lavras (CMLAPS 242- Isolado 1) e Uberlândia (CMLAPS 245- Isolado 2), pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes (CMLAPS). Os isolados foram multiplicados inicialmente em meio BDA (batata, dextrose e ágar), em placas de Petri, e incubados a 20°C com fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias, em câmara incubadora tipo BOD. As culturas foram conservadas pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

### **4.2 Perfil dos lotes de sementes utilizados**

Sementes de duas cultivares de soja, Conquista, safra 2008/2009 (C1) e Tucunaré, safra 2008/2009 (C2), foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos e enxaguadas em água destilada e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest, durante 48 horas. A qualidade sanitária e fisiológica inicial dos lotes foi determinada de acordo com os testes descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b) e pelo Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009a). Parte dessas sementes desinfestadas com hipoclorito foi armazenada em câmara fria a 15°C e umidade em 50%, para os trabalhos de inoculação.

### 4.3 Preparo e inoculação das sementes

As sementes foram inoculadas pela técnica de condicionamento fisiológico desenvolvida por Carvalho (1999), Costa et al. (2003) e Machado et al. (2001).

Para a inoculação, foram utilizadas placas de Petri de plástico, nas quais foi vertido meio BDA (extrato de batata, dextrose e ágar) modificado osmoticamente pelo soluto manitol, com potencial hídrico de  $-1,0$  MPa, ajustado pelo software SPPM (MICHELEL; RADCLIFFE, 1995).

Sobre o meio foram colocados discos de micélio dos isolados de *S. sclerotiorum*, sendo as placas mantidas em câmara de incubação à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Após o crescimento micelial do fungo cobrindo a superfície toda do substrato, as sementes desinfestadas foram distribuídas em camada única sobre a colônia fúngica, tomando-se o cuidado de manter a superfície da semente em contato com a superfície da cultura do fungo e, novamente colocada em câmaras de incubação, a  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por diferentes períodos de contato com o fungo, 24, 48 e 72 horas, correspondendo aos diferentes potenciais de inóculo pretendidos (Tabela 1).

Tabela 1 Descrição do potencial de inóculo em função do tempo de contato das sementes com a colônia de *Sclerotinia sclerotiorum*

| Período de contato (horas) | Potencial de Inóculo |
|----------------------------|----------------------|
| 0                          | P0                   |
| 24                         | P1                   |
| 48                         | P2                   |
| 72                         | P3                   |

A título de referencial uma testemunha foi preparada para cada tempo de incubação de sementes em substrato com o restritor hídrico na ausência de *S. Sclerotioum*.

Após cada período de contato, as sementes foram retiradas e secas por 48 horas até teor de água de 12% e, em seguida, mantidas em câmara de armazenamento (15° C e 50 % de UR) até sua utilização nos ensaios 1 e 2.

#### **4.4 Efeitos na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum***

O teste de sanidade das sementes inoculadas e não inoculadas foi conduzido em meio ágar-bromofenol (NEON), com modificações conforme descrição encontrada na literatura (NAPOLEÃO et al., 2006; NASSER; ARANCIBIA; NAPOLEÃO, 1995; PERES, 1996). Neste teste, as sementes foram distribuídas em substrato ágarizado (batata-dextrose-ágar) contendo 50 mg de cloranfenicol, 50mg de azul de bromofenol e manitol -1,0MPa. O pH final foi ajustado para 4,7 com HCl ou NaOH e todos os componentes foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. As placas foram distribuídas em câmara de incubação sob temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. A partir do terceiro dia de incubação, todas as sementes foram examinadas no intuito de detectar ao seu redor a formação, ou não, de halos amarelo-avermelhados, indicativos da presença de *S. sclerotiorum*. As placas também foram analisadas ao microscópio estereoscópico quanto ao crescimento de micélio característico e presença de escleródios de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009a).

A ocorrência de *S. sclerotiorum* foi avaliada em 200 sementes inoculadas e não inoculadas, para cada tempo de contato com o patógeno.

Para o teste de germinação em rolo de papel, foram utilizadas quatro repetições de cinquenta sementes distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram colocados em germinador, à temperatura de

25°C  $\pm$  2°C. As avaliações foram realizadas no quinto e no oitavo dia para soja, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final e matéria seca da parte aérea e da raiz, foram semeadas 200 sementes de cada cultivar, inoculadas e não inoculadas, em caixas de polietileno, com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo areia e substrato comercial PLANTIMAX<sup>®</sup>, na proporção de 1:1. Após a semeadura, as sementes foram cobertas com uma camada de 3 cm do mesmo substrato. O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento vegetal e a velocidade de emergência das plântulas foi determinada pela contagem diária de plântulas emergidas. Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo. A contagem foi feita até a estabilização do número dessas plantas, por três leituras consecutivas.

O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n Ni/Di$$

em que

IVE = índice de velocidade de emergência; Ni = número de plântulas emergidas na 1<sup>a</sup> contagem, 2<sup>a</sup> contagem,... enésima contagem, respectivamente; Di = número de dias após semeadura na 1<sup>a</sup> contagem, 2<sup>a</sup> contagem, ... enésima contagem, respectivamente.

Os estandes, inicial e final, foram registrados aos 10 e aos 25 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

Os valores do peso de matéria seca foram obtidos trinta dias após a semeadura, por meio da pesagem de todas as plantas emergidas por repetição. Para avaliar o peso de matéria seca, as plantas foram cortadas 2 cm acima da região do colo e submetidas ao processo de secagem em estufa com fluxo de ar forçado, à temperatura de 50°C. Após 96 horas, o material foi pesado em balança semi-analítica e os resultados apresentados em gramas.

#### **4.5 Determinação da taxa de transmissão de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de sementes de soja inoculadas artificialmente**

Para todas as plantas sintomáticas e assintomáticas, provenientes do ensaio anterior, foram calculadas as taxas de infecção (TI) e de transmissão (TT) de *S. sclerotiorum* por sementes, utilizando-se a metodologia adaptada de Teixeira e Machado (2003). Para determinar a TI, foram retirados dois fragmentos por planta com aproximadamente dois centímetros acima da região do colo e na inserção dos cotilédones com o caule de todas as plantas das parcelas. Em seguida, estes fragmentos foram seccionados e desinfestados com álcool 70% por 30 segundos, emergidos, posteriormente, em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, enxaguados duas vezes em água destilada esterilizada e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro com meio de cultura semi-seletivo ágarizado, contendo azul de bromofenol (NEON) para detecção de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009a).

As placas foram mantidas em câmara de incubação a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Diariamente foram feitos exames de todos os fragmentos, sendo registrada a formação de halos amarelo-avermelhados ao redor dos mesmos.

Os fragmentos seccionados das plantas e o somatório das sementes não germinadas com os sintomas de *S. sclerotiorum* constituíram a base para o cálculo da taxa de transmissão do fungo em cada cultivar com os referidos isolados do patógeno.

A taxa de infecção foi obtida considerando-se o número de fragmentos com crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela. O resultado foi expresso em porcentagem de plantas infeccionadas. A taxa de transmissão foi determinada com base na taxa de infecção e na incidência de *S. sclerotiorum* verificada nas sementes inoculadas, em cada tratamento. De maneira esquemática, a taxa de transmissão foi calculada com base na fórmula:

$$TT (\%) = [TI (\%)/IS (\%)] * 100$$

em que

T.T = taxa de transmissão; TI = taxa de infecção; IS = incidência do patógeno em sementes inoculadas.

#### **4.6 Análise dos dados**

As análises de variância dos experimentos de transmissão e de efeito do patógeno nas sementes foram realizadas em esquema fatorial 4x2x2 (tempo de exposição das sementes, cultivares e isolados) no programa Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) ou de regressão, de acordo com a natureza dos dados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes das cultivares Conquista e Tucunaré apresentaram, inicialmente, índices de 93% e 89% de germinação, respectivamente. Pela análise sanitária das duas amostras utilizadas, não houve detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em nenhum caso. Nas sementes analisadas, foram detectados *Cercospora kikuchi* em uma incidência média de 19% e *Fusarium semitectum*, 8%, na média geral.

A incidência de *F. semitectum* nas sementes pode ter contribuído para a redução da germinação e do vigor das mesmas, principalmente quando associado a elevados danos mecânicos e sob umidade elevada (FRANÇA NETO; HENNING, 1992). Em relação à *Cercospora kikuchi*, causador da mancha púrpura da semente, não há relatos na literatura sobre causa de danos relevantes às sementes de soja (FRANÇA NETO; HENNING, 1992; HENNING, 1987; PATRÍCIO; BORIN; ORTOLANI, 1995). Em trabalhos de Oliveira et al. (1993), *C. kikuchii* não afetou o desempenho das sementes no estágio de plântula, mesmo quando as sementes apresentaram alta porcentagem de incidência do patógeno em torno de 94%.

Em sementes de soja é comum a presença dos fungos de armazenamento, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* sp., que podem causar grandes prejuízos à qualidade da sementes armazenadas (POPINIGIS, 1977). Nessas amostras, porém, foram detectados apenas 2% de *Aspergillus* spp. na cultivar Conquista e 7% na cultivar Tucunaré.

Em estudos anteriores conduzidos com a utilização da metodologia de inoculação por meio do condicionamento fisiológico das sementes, no intuito de se obter sementes infectadas por fungos em diferentes intensidades, têm revelado que o tempo de contato entre a semente e a colônia do patógeno fúngico, pode corresponder a diferentes potenciais de inóculo. Para a totalidade



destes trabalhos, o aumento do tempo de contato entre semente e o patógeno levou ao aumento da ação do patógeno nos tecidos das sementes. Este fato foi comprovado neste estudo havendo um crescente efeito do patógeno sobre as características das sementes submetidas a condições favoráveis. Este efeito foi evidentes para os dois isolados utilizados de *S. sclerotiorum* (Gráfico 1).

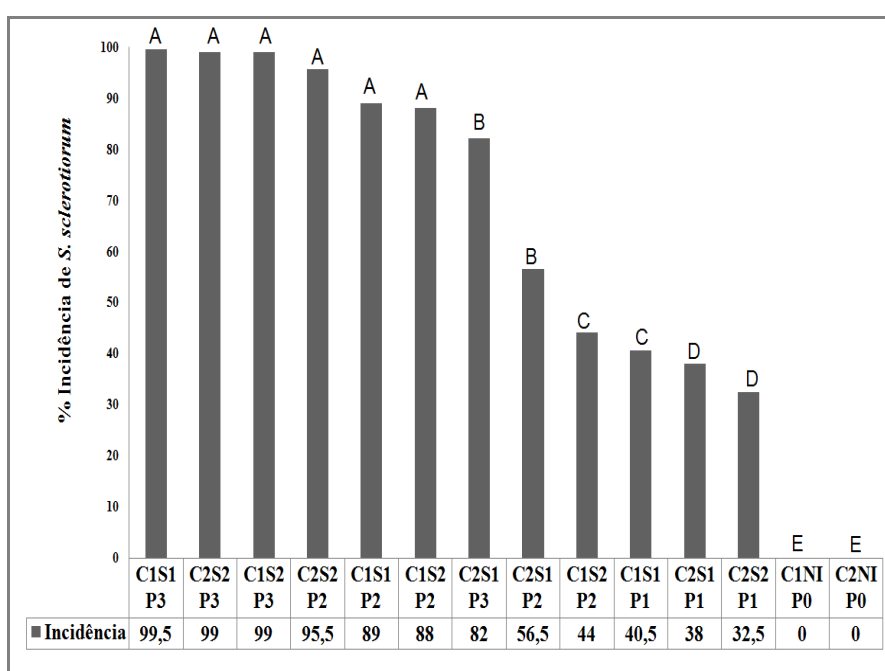


Gráfico 1 Incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja em diferentes tempos de exposição delas ao patógeno

\*Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ )

Tanto a cultivar Conquista quanto a cultivar Tucunaré apresentaram comportamentos semelhantes, independentemente do isolado, à medida que houve aumento do potencial de inóculo de *S. sclerotiorum*.

Em trabalhos anteriores desenvolvidos por Peres (1996), verificou-se que a inoculação de sementes de soja pelo seu contato com colônias de *S. sclerotiorum*, em meio BDA por 30 horas de exposição, causou incidência entre 35% e 100%, valores próximos aos verificados neste trabalho, que foram de 32,5% a 99,5% de sementes infectadas.

A alta ocorrência de *S. sclerotiorum* nas sementes inoculadas comprovou a eficiência do método de inoculação, tendo sido observado, neste caso, efeito gradual e crescente do patógeno nas sementes. Dessa forma, é pertinente assumir que esse tipo de inoculação pode ser associado com potencial de inóculo. Observa-se, na Figura 1, a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja nos diferentes potenciais.

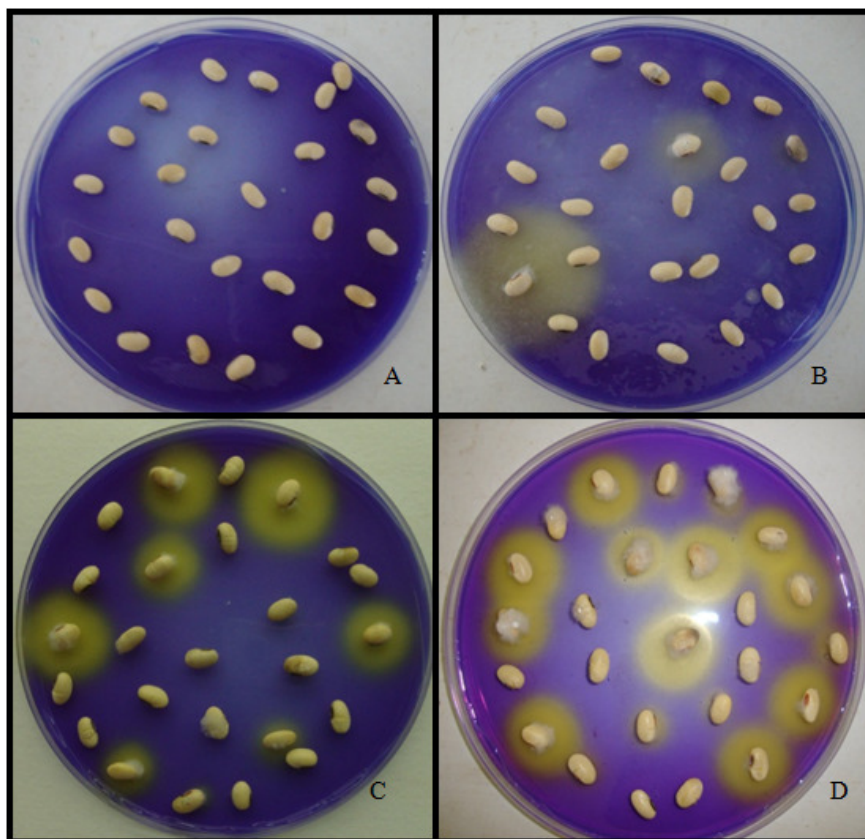


Figura 1 Detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja da cultivar Conquista em diferentes tempos de contato delas com a colônia do patógeno desta interação: (A) testemunha P0; (B) potencial P1; (C) potencial P2; (D) potencial P3

A incidência de *S. sclerotiorum* aumentou proporcionalmente, à medida que aumentou o tempo de contato entre o patógeno e sementes, sendo esta incidência avaliada através do meio semi-seletivo (NEON) em relação ao total de sementes analisadas (Gráfico 2).

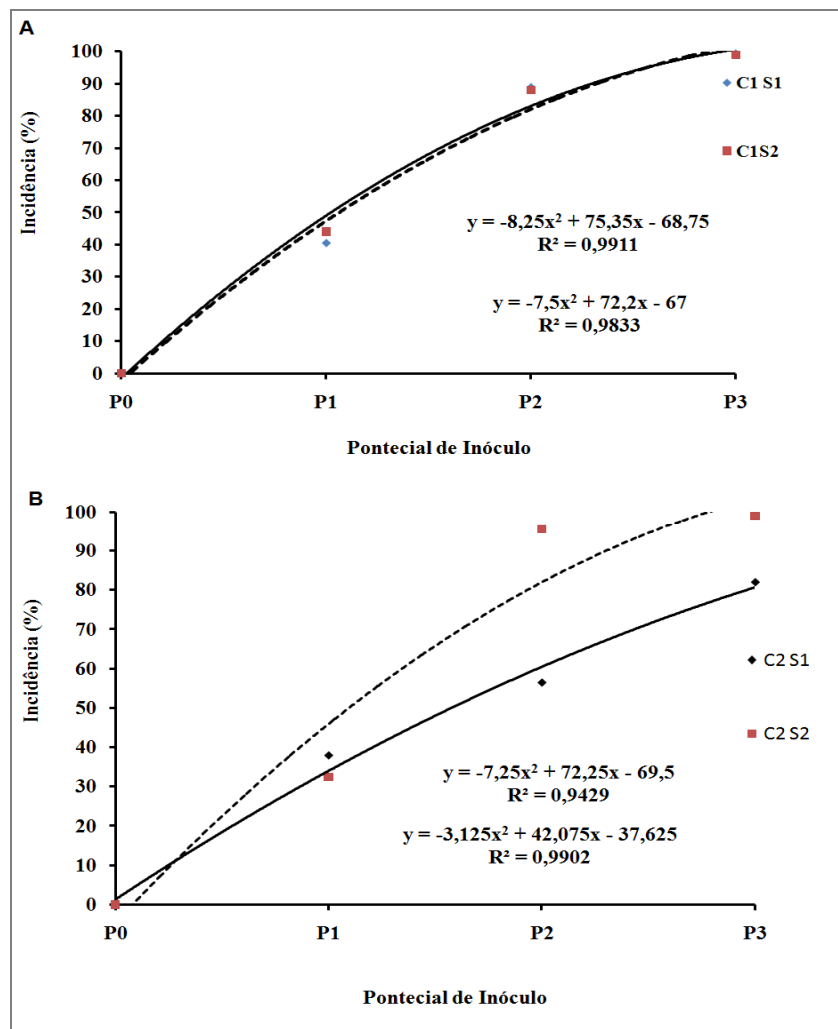


Gráfico 2 Incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, (A) Cultivar Conquista (C1) e (B) Cultivar Tucunaré (C2) em função do tempo de contato das sementes com a colônia de dois isolados do patógeno S1 e S2. UFLA, Lavras, MG, 2010

Com base nos resultados deste ensaio percebe-se que os efeitos de *S. sclerotiorum* em níveis de infecção distintos, equivalentes a diferentes potenciais de inóculo, foram evidentes interferindo negativamente no desempenho das sementes.

Em relação à variável germinação (Tabela 2), vê-se que em níveis mais elevados de potencial de inóculo, o patógeno foi responsável por sua redução. Para a cultivar Conquista foi observada em média uma redução, nos valores de germinação, de 93% para 16% e para a cultivar Tucunaré esta redução foi de 90,5% para 11,5%, do menor para o maior potencial de inóculo.

No intuito de verificar o efeito da exposição ao restritor hídrico foi feita uma comparação na presença e na ausência do patógeno. Verificou-se redução na germinação, nos diferentes tempos de contato, porém, a diminuição observada na ausência do fungo foi menor do que na presença do fungo. Constatou-se que esta redução na germinação, do menor para o maior potencial de inóculo, na testemunha foi de 34% e 39% para as cultivares Conquista e Tucunaré, respectivamente. Já na presença do patógeno, esta redução foi em torno de 85% do potencial P0 para P3. Essa redução de forma acentuada ocorreu a partir de 24 horas de contato entre as sementes e o fungo em todos os tratamentos (Gráfico 3).

Esse tipo de comportamento observado pode ser explicado considerando-se que a restrição hídrica diminui a velocidade dos processos metabólicos, atrasando ou reduzindo a de germinação de sementes de muitas espécies, interferindo na embebição e no alongamento celular do embrião (BRADFORD, 1990). Porém, essa redução foi baixa quando se compara com os dados das sementes contendo o patógeno, à medida que foram submetidas a diferentes tempos de contato entre sementes e o fungo.

Neste trabalho, observou-se também que os dois isolados de *S. sclerotiorum* foram virulentos para os duas cultivares utilizadas, tendo os

menores valores de germinação sido observados no tratamento cultivar Tucunaré, isolado 2 no potencial P3, com valor de 8,5%, havendo diferença significativa entre os demais tratamentos. A cultivar Tucunaré foi mais sensível em relação à germinação em todos os tratamentos analisados (Tabela 2).

Tabela 2 Valores da avaliação da germinação de sementes de soja, cultivares Conquista (C1) e Tucunaré (C2), em função do potencial de inóculo de *S. sclerotiorum*, 1 e 2. UFLA, Lavras, MG, 2010

| CULTIVAR  | Germinação (%)* |         |         |         |
|-----------|-----------------|---------|---------|---------|
|           | Isolado 1       |         |         |         |
|           | P0              | P1      | P2      | P3      |
| Conquista | 93,0 Aa         | 61,5 Ab | 39,5Ac  | 17,5 Ad |
| Tucunaré  | 90,5 Aa         | 47,5 Bb | 30,5 Ac | 14,5 Ad |
| Isolado 2 |                 |         |         |         |
| Conquista | 93,0 Aa         | 47,5 Ab | 30,5 Ac | 14,5 Ad |
| Tucunaré  | 90,5 Aa         | 44,0 Ab | 28 Ac   | 8,5 Bd  |
| CV(%)     | 17,93           |         |         |         |

\*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott ( $P \leq 0,05$ )

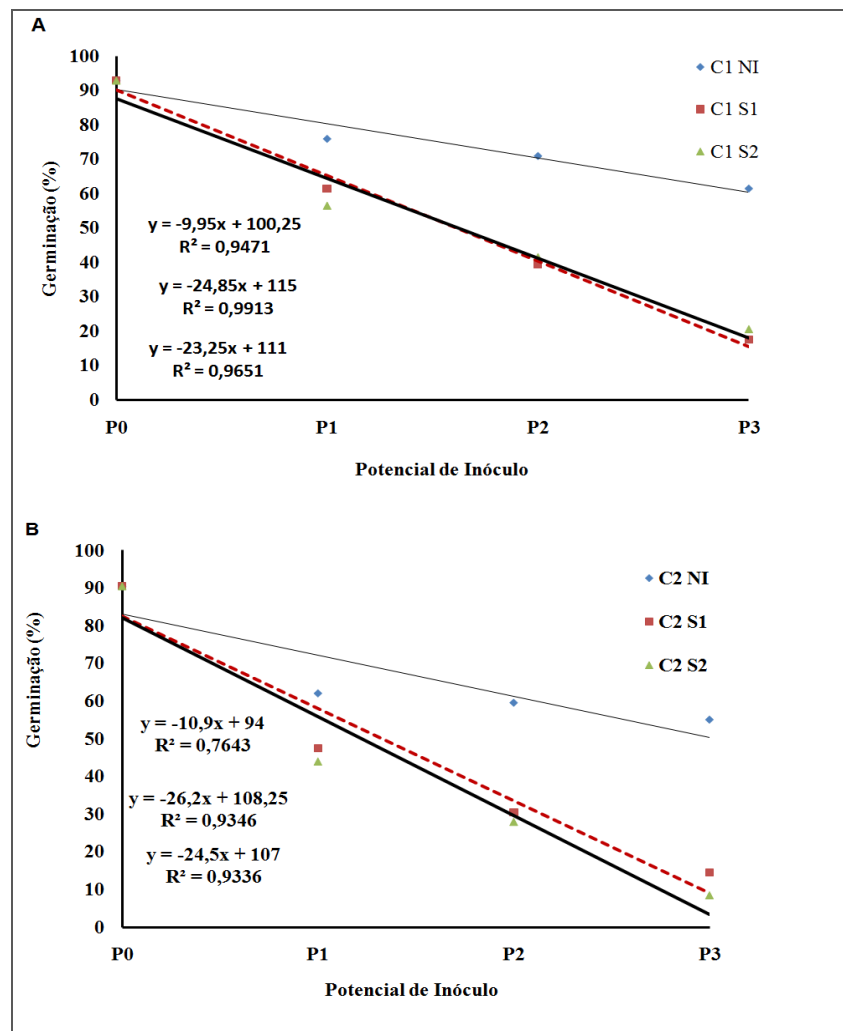


Gráfico 3 Germinação de sementes de soja em função do tempo de contato das sementes a dois isolados (S1 e S2) de *S. sclerotiorum*; (A) Cultivar Conquista C1; (B) Cultivar Tucunaré C2; C1NI e C2NI = Cultivar Não Inoculada. UFLA, Lavras, MG, 2010

No que tange à qualidade fisiológica de sementes, verificou-se uma diferença mínima entre os cultivares na presença do fungo. Estes resultados são de grande importância, visto que pouco se conhece sobre a resistência de soja ao mofo-branco adaptadas, agronomicamente, para as condições brasileiras. Consta-se que o nível de resistência fisiológica ainda é baixo para o controle da doença. Tal fato foi verificado, visto que os percentuais de germinação foram drasticamente afetados pela presença do fungo nas sementes, independentemente da cultivar utilizada, mesmo sendo a cultivar Tucunaré a mais afetada, havendo diferença significativa em relação aos demais tratamentos.

Alguns trabalhos relatam a interferência de *S. sclerotiorum* na qualidade final, quando associado às sementes de soja. Machado et al. (2001) constataram que a germinação e a emergência das plântulas de soja, provenientes de sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*, foram severamente prejudicadas. Foi verificada também redução na germinação e no peso verde da parte aérea e raiz de plantas de soja a partir de sementes inoculadas com este patógeno. Em outro estudo, observou-se que a embebição de sementes de soja em suspensão de ascósporos de *S. sclerotiorum* influenciou o nível de deterioração das sementes de soja inoculadas (GOULART, 1984).

Em outro patossistema, tal efeito tem sido evidenciado. Celano (2004) constatou que sementes de algodão inoculadas com o agente da ramulose, nos tempos de exposição de 36, 72 e 108 horas, apresentaram germinação média de 61%, 56%, 46%, respectivamente, confirmando dessa maneira, a ação dos diferentes potenciais de inóculo na germinação das sementes. Os mesmos tipo e intensidade de efeito nesta relação semente-fungo foram relatados por Barrocas (2008), em trabalho com sementes de algodão e *Colletotrichum gosypii* var. *cephalosporioides*. Neste caso, houve um aumento gradual da incidência do patógeno e uma redução significativa na qualidade fisiológica das sementes, com o aumento do tempo de contato dessas sementes ao fungo.



Segundo Machado (2000) e Menten (1997), a interferência dos patógenos associados às sementes pode promover quedas no poder germinativo, debilitação e redução da população de plantas, além de desenvolvimento de epidemias capazes de atacar todas as partes das plantas, em vários estágios, inclusive em pós-colheita, dentre outros efeitos.

Em relação ao índice de velocidade de emergência (IVE) e o estande inicial e final, foi possível observar diferenças significativas para os fatores analisados nos diferentes níveis de infecção das sementes (Tabelas 3 e 4). Verifica-se que os maiores valores de IVE foram observados no potencial P0, o qual diferiu estatisticamente dos demais potenciais.

Em média, os valores do IVE, nos dois isolados do patógeno foram de 4,85, no P0, para 1,09, no maior potencial P3, na cultivar Conquista. Já para a cultivar Tucunaré esses valores foram de 5,21, no menor potencial P0 e 0,8, no maior potencial P3, evidenciando o efeito do patógeno no vigor dessas sementes de soja.

Foi observada menor IVE para a cultivar Tucunaré com o isolado 2 do patógeno no potencial P3, sendo este valor de 0,45 (Tabela 3). Estes resultados são semelhantes aos observados no testes de sanidade e de germinação, nos quais se obteve maior nível de infecção, 99,5% (Gráfico 1) e menor porcentagem de germinação, 8,5% (Tabela 2), neste mesmo tratamento.

De modo geral, os resultados deste estudo seguem a mesma tendência dos resultados de trabalhos conduzidos com outros patossistemas (ARAÚJO, 2008; BARROCAS, 2008; MACHADO et al., 2001; MORAES; MENTEN, 2006; SARTORI; REIS; CASA, 2004; SOUSA; 2006). Em todos eles foram observadas reduções no IVE, nos estandes inicial e final de plantas e na germinação, a partir de sementes inoculadas com diferentes potenciais de inóculo.

Tabela 3 Valores do índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de soja inoculadas com diferentes potenciais de inóculo de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2010

| CULTIVAR  | IVE (%)*  |         |         |         |
|-----------|-----------|---------|---------|---------|
|           | Isolado 1 |         |         |         |
|           | P0        | P1      | P2      | P3      |
| Conquista | 4,85Aa    | 3,65Ab  | 2,27Ac  | 0,92Aa  |
| Tucunaré  | 5,21Aa    | 3,56Ab  | 2,30Ac  | 1,16Aa  |
|           | Isolado 2 |         |         |         |
| Conquista | 4,85 Aa   | 2,98 Ab | 2,15 Bb | 1,26 Ac |
| Tucunaré  | 5,21 Aa   | 2,96 Ab | 1,75 Bc | 0,45 Bd |
| CV(%)     | 18,5      |         |         |         |

\*Médias com mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott ( $P \leq 0,05$ )

Tabela 4 Valores dos estandes, inicial e final de sementes de soja inoculadas com dois isolados de *S. sclerotiorum*, com os diferentes potenciais de inóculo. UFLA, Lavras, MG, 2010

| CULTIVAR  | Estande inicial (%) |         |        |      | Estande final(%) |        |        |        |
|-----------|---------------------|---------|--------|------|------------------|--------|--------|--------|
|           | Isolado 1           |         |        |      |                  |        |        |        |
|           | P0                  | P1      | P2     | P3   | P0               | P1     | P2     | P3     |
| Conquista | 71,5Aa              | 57,5Ab  | 35Ac   | 16Ad | 74Aa             | 56,5Ab | 35,5Ac | 13,5Ad |
| Tucunaré  | 77 Aa               | 51,5Ab  | 34Ac   | 16Ad | 83Aa             | 58,5Ab | 37Ac   | 18Ad   |
|           | Isolado 2           |         |        |      |                  |        |        |        |
| Conquista | 71,5 Aa             | 54,5 Ab | 34,5Ac | 20Ad | 74Aa             | 47,5Ab | 34Ac   | 20,5Ad |
| Tucunaré  | 77 Aa               | 51 Ab   | 25Ac   | 7Bd  | 83Aa             | 54Ab   | 29,5Ac | 5Bd    |
| CV(%)     | 18,44               |         |        |      | 16,78            |        |        |        |

\*Médias com mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott ( $P \leq 0,05$ )

Nas sementes submetidas aos diferentes tempos de contato na ausência do patógeno, foi observada diminuição na qualidade fisiológica das sementes, porém bem menores em relação aos tratamentos avaliados na presença do fungo. Para o IVE, essa redução do pontecial P0 para o P3 foi de 22% para a cultivar Conquista e de 34% para Tucunaré. Já na presença do fungo essa redução média foi de 83% para as cultivares estudadas (Gráfico 4). Conforme já verificado para os dados de germinação, este fato pode ser explicado considerando-se que o condicionamento osmótico das sementes pode afetar seu vigor, mas quando utilizado em períodos menores, com a finalidade de potencializar o desempenho das mesmas, costuma não acarretar decréscimos significativos do vigor.

Com base nos resultados do teste de germinação, à medida que o potencial de inóculo nas sementes aumentou, os valores da germinação e do vigor observados foram significativamente reduzidos, o que possivelmente influenciou os dados dos estandes inicial e final (Gráficos 5 e 6).

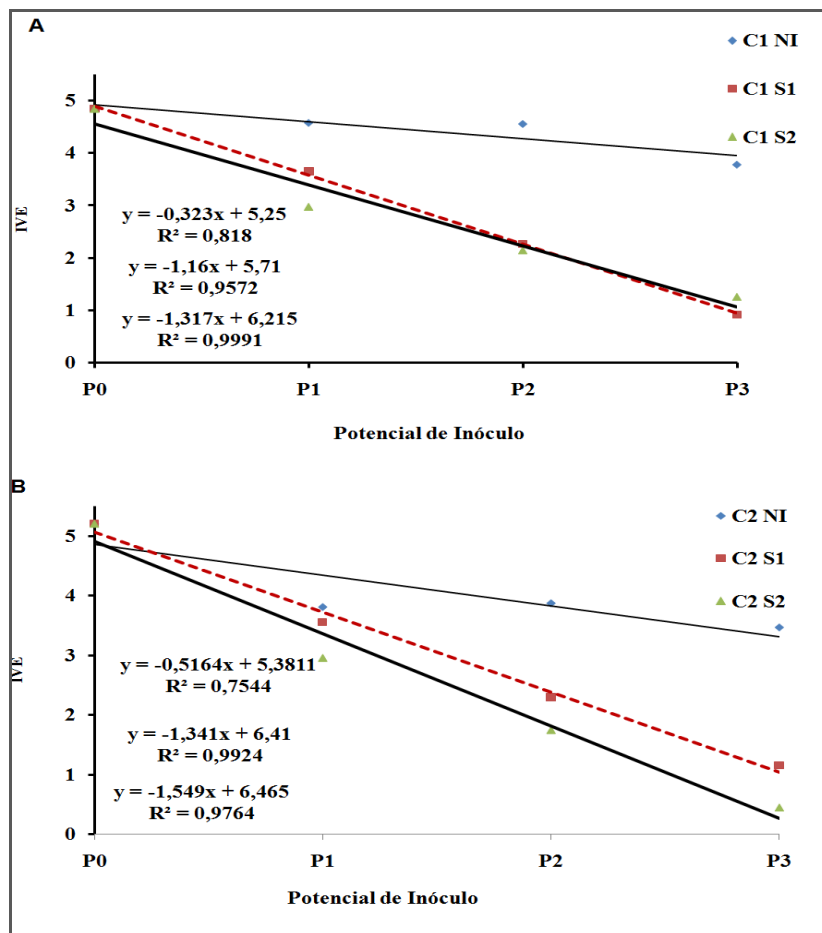


Gráfico 4 Índice de velocidade de emergência de plantas de soja em função do tempo de contato das sementes a dois isolados (S1 e S2) de *S. sclerotiorum*; (A) cultivar Conquista C1; (B) cultivar Tucunaré C2. C1NI e C2NI = cultivar não inoculada UFLA, Lavras, MG, 2010

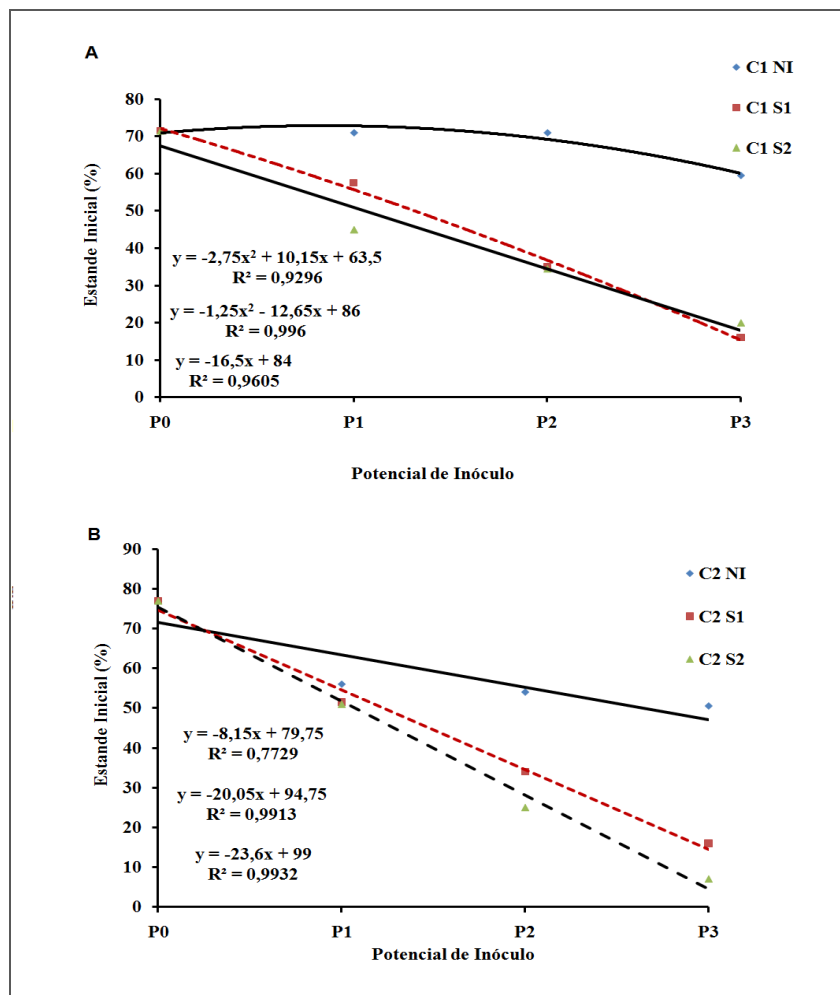


Gráfico 5 Estande inicial de plantas de soja em função do tempo de exposição das sementes a dois isolados (S1 e S2) de *S. sclerotiorum*; (A) cultivar Conquista C1; (B) cultivar Tucunaré C2. C1NI e C2NI = cultivar não inoculada UFLA, Lavras, MG, 2010

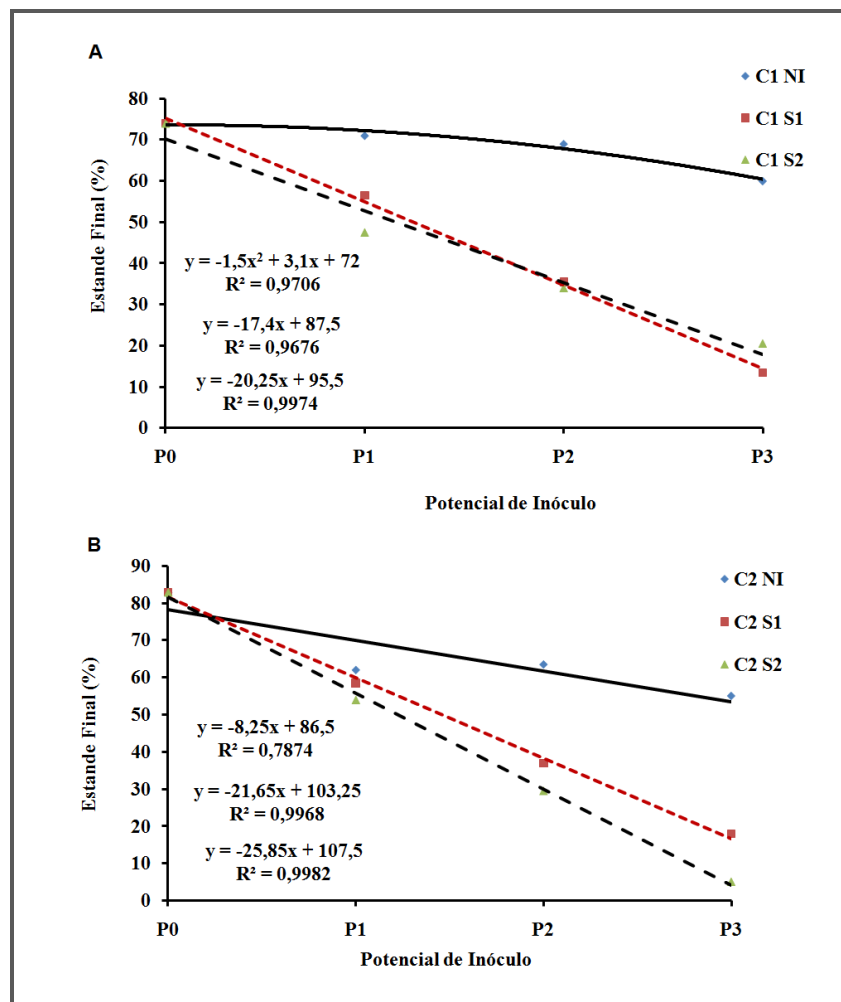


Gráfico 6 Estande final de plantas de soja em função do tempo de exposição das sementes a dois isolados (S1 e S2) de *S. sclerotiorum*; (A) Cultivar Conquista C1; (B) cultivar Tucunaré C2. C1NI e C2NI = cultivar não inoculada UFLA, Lavras, MG, 2010

De forma análoga às variáveis anteriormente focadas, a inoculação das sementes com *S.sclerotiorum* provocou redução do peso da matéria seca da parte aérea e da raiz das plantas de soja (Gráfico 7).

Em relação à matéria seca, as médias para o peso seco da parte aérea foram de 8,12; 7,93; 4,75 g e, para raiz foi de 4,53; 4,22 e 3,68 g, nos potenciais de inóculo P1, P2 e P3, respectivamente, enquanto que na testemunha, o peso seco médio da parte aérea foi de 10,25 g e, para raiz 5,9 g, sugerindo que o fungo, mesmo não mostrando uma diferença significativa entre as cultivares para alguns tratamentos, provocou uma diminuição de, em média, aproximadamente 46% no peso seco dessas partes da planta.



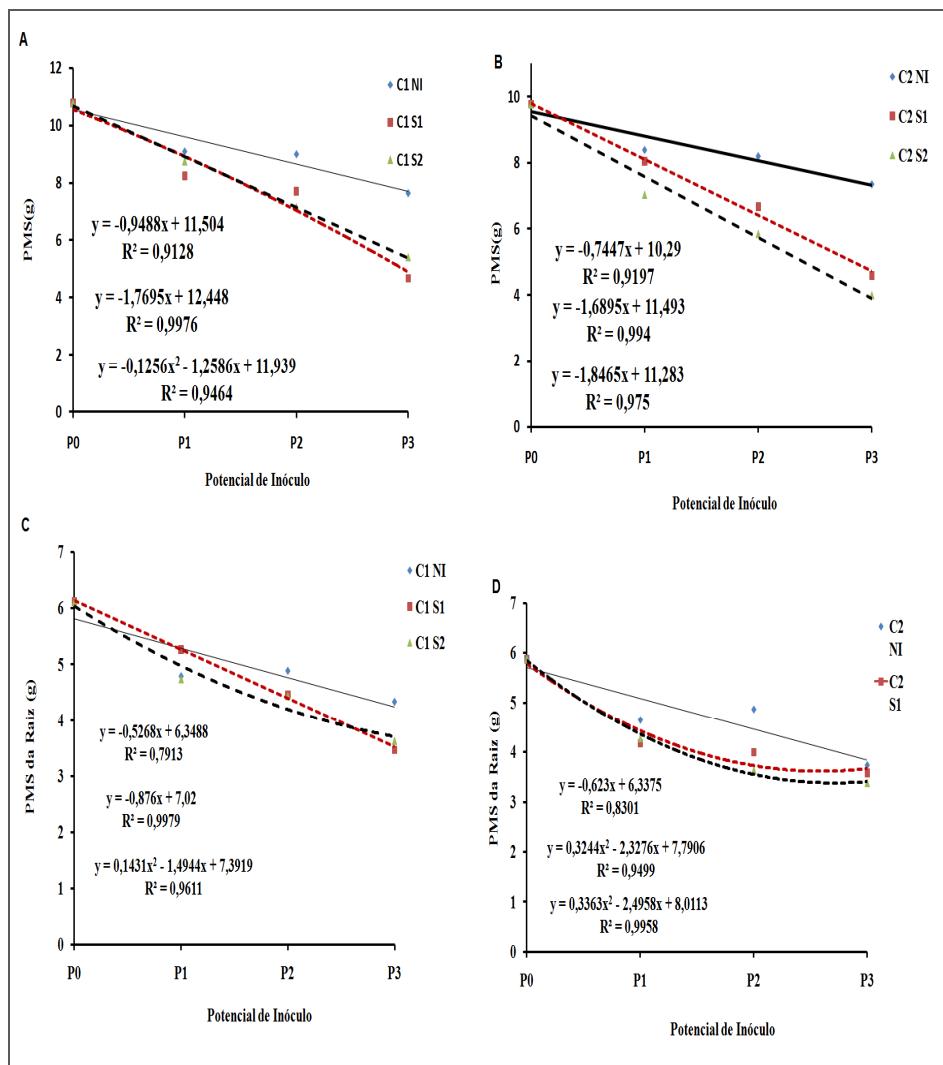


Gráfico 7 Peso da matéria seca em gramas de plantas oriundas de sementes inoculadas em diferente tempo de contato a dois isolados de *S. sclerotiorum* (A) parte aérea do C1; (B) parte aérea de plantas C2; (C) raiz C1; (D) raiz C2. C1NI e C2NI = cultivar não inoculada UFLA, Lavras, MG,2010

## **5.2 Determinação da taxa de transmissão de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja inoculadas artificialmente**

Neste estudo foram calculadas as taxas de infecção e de transmissão de *S. sclerotiorum* em plantas de soja. A transmissão foi caracterizada pela passagem do patógeno associado às sementes para as plantas de soja em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. O cálculo da taxa de transmissão foi baseado na incidência de *S. sclerotiorum* nos fragmentos em relação ao número total de plantas sintomáticas e assintomáticas em relação à incidência de sementes infectadas, no teste de sanidade. Na Figura 2, observa-se a detecção do patógeno nos fragmentos das plantas de soja emergidas e oriundas de sementes infectadas.

O somatório das sementes que não germinaram pela presença de *Sclerotinia sclerotiorum* e dos fragmentos que estavam com referido patógeno constituiu a taxa de transmissão em cada cultivar. No maior potencial de inóculo, P3, observou-se taxa de transmissão de 100%, constatando-se que a infecção foi muito severa, ou seja, o micélio fúngico presente nas sementes atingiu os tecidos de todas as plantas analisadas. Já para os potenciais P1 e P2, as maiores taxas de transmissão observadas foram de 33% e 73%, respectivamente, ocorrendo diferença significativa entre os fatores tempo de exposição, cultivar e isolado (Gráfico 8).

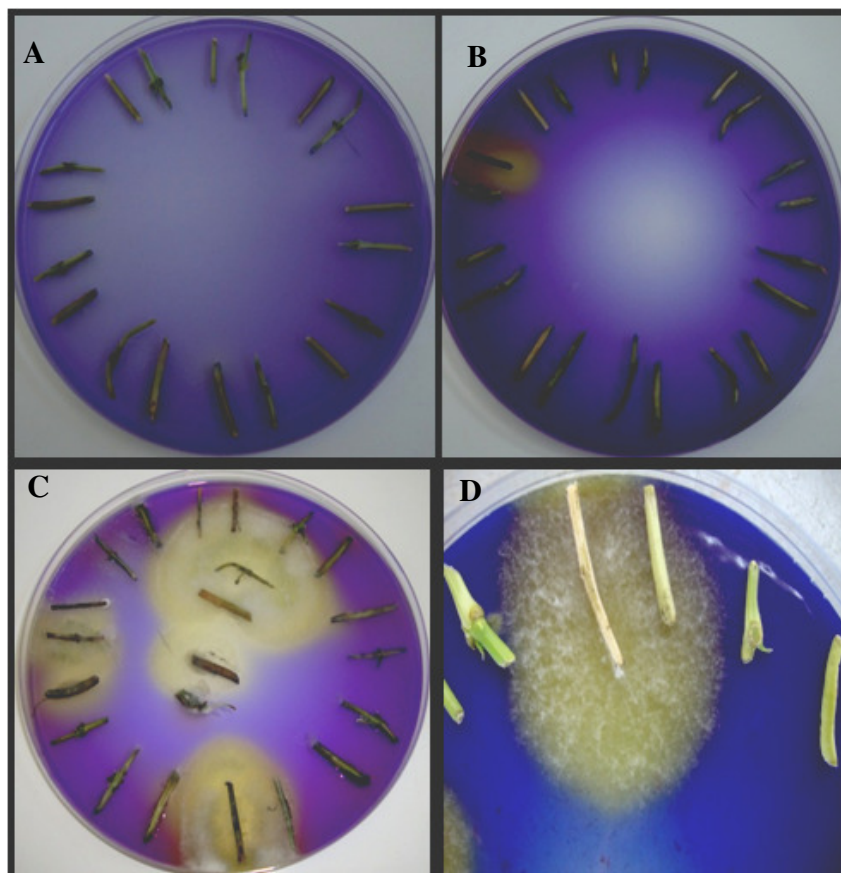


Figura 2 Detecção de *S. sclerotiorum* nos fragmentos de plantas de soja, do cultivar Conquista, em meio semi-seletivo (NEON). (A) ausência do patógeno; (B), (C) e (D) formação do halo amarelado caracterizando a presença do patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2010

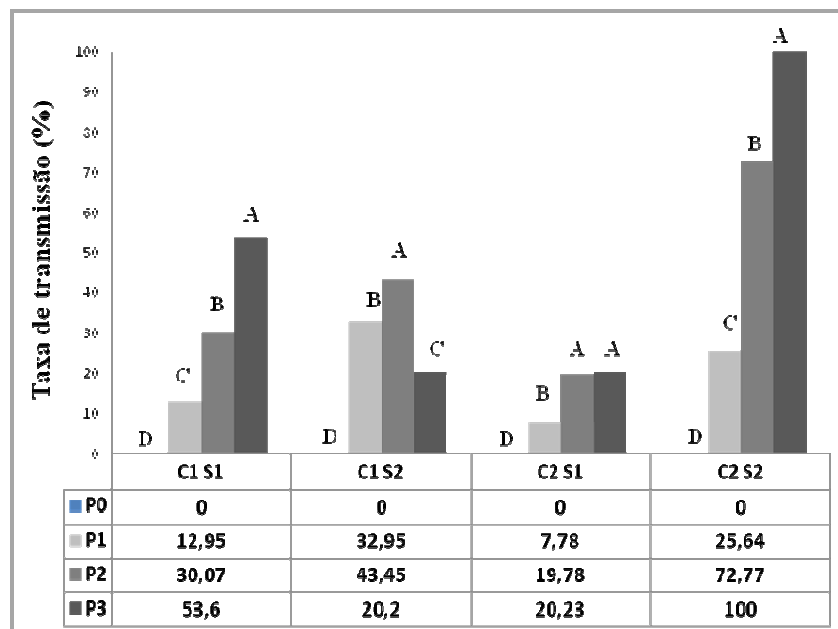


Gráfico 8 Taxa de transmissão de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes potenciais de inóculo. C1S1= Cultivar Conquista – isolado 1 do patógeno; C1S2 = Cultivar Conquista com o isolado 2 do patógeno; C2S1= Cultivar Tucunaré com o isolado 1 do patógeno; C2S2= Cultivar Tucunaré com o isolado 2 do patógeno

\*Médias com mesma letra, em um mesmo tratamento, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

O efeito do potencial de inóculo nas sementes observado no teste de sanidade refletiu na taxa de infecção em plantas de soja, com 30 dias após a semeadura. Houve aumento tanto da taxa de infecção quanto da taxa de transmissão, quando o potencial de inóculo, obtido pelo tempo de inoculação, aumentou de 0 para 72 horas de contato das sementes com o patógeno, nas duas cultivares avaliadas (Gráficos 9 e 10). Foi também avaliada a taxa de infecção, cujos valores foram menores em relação aos da taxa de transmissão. Esses altos valores dessas taxas evidenciam que mesmo algumas plantas sem sintomas

apresentaram o patógeno nos seus tecidos, uma vez que foram consideradas todas as plantas sintomáticas e assintomáticas.

Com base na literatura, vários fatores podem afetar os valores da taxa de transmissão do patógeno para a semente e no estabelecimento desta infecção, como a posição do patógeno na semente e sua intensidade. Diversos fatores físicos e biológicos tornam-se bastante variável este padrão de transmissão de patógenos por sementes, mesmo em se tratando de um único patógeno (MACHADO, 1988; NEERGAARD, 1979).

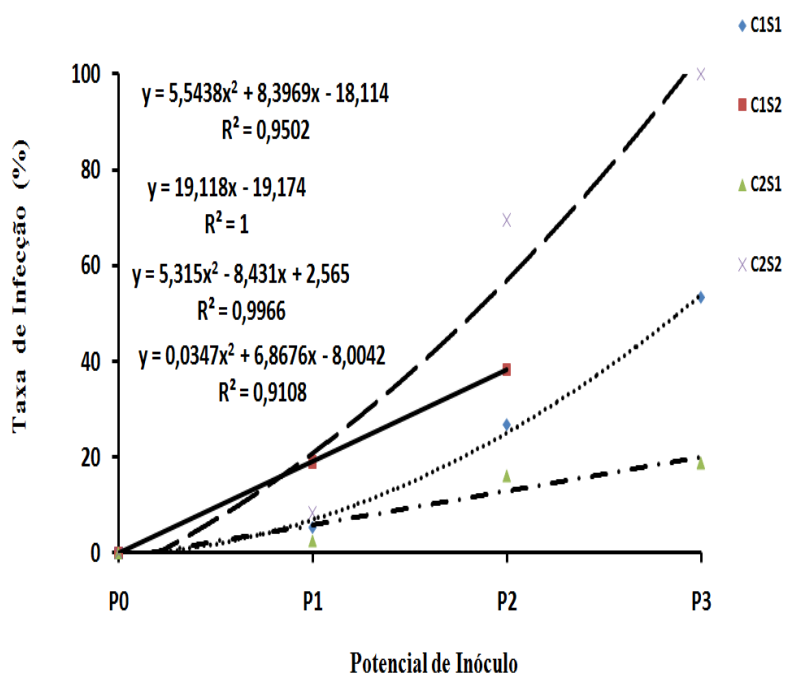


Gráfico 9 Taxa de infecção (TI) de *Sclerotinia sclerotiorum* nas cultivares de soja, em diferentes potenciais de inóculo. UFLA, Lavras, MG, 2010

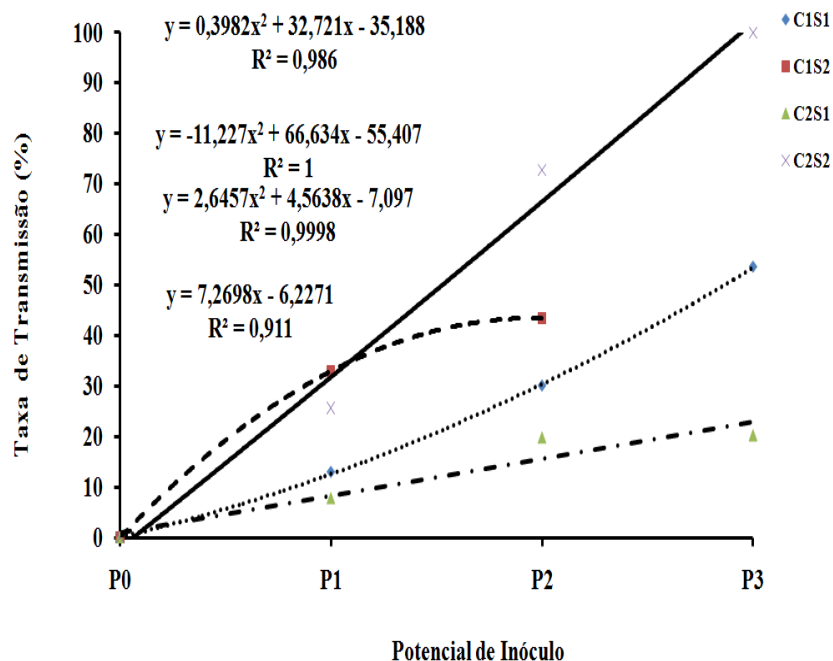


Gráfico 10 Taxa de transmissão (TT) de *Sclerotinia sclerotiorum* nos cultivares de soja, em diferentes potenciais de inóculo. UFLA, Lavras, MG,2010

As taxas de infecção e de transmissão, avaliadas em fragmentos de plantas de soja, foram maiores nos potenciais de inóculo mais elevados neste estudo. Com isso, observou-se que a infecção dos tecidos das plantas pode estar diretamente relacionada com potencial de inóculo presente nas sementes. Nas condições submetidas de risco para que ocorra a doença, a taxa de transmissão atingiu 100%. Diante desses resultados, presume-se que a transmissibilidade de *S. sclerotiorum*, a partir de sementes de soja, é efetiva e pode refletir em maiores ou menores taxas de infecção e de transmissão, dependendo do nível de infecção das sementes. Em trabalho semelhante, porém, realizado com sementes de milho inoculadas com *Acremonium strictum*, Teixeira e Machado (2003) observaram

que a taxa de infecção, avaliada na parte aérea de plantas com 28 dias de idade, foi maior com o aumento do tempo de exposição das sementes (de 0 a 120 horas). Por outro lado, a taxa de transmissão foi estatisticamente igual nos tempos de 24, 72 e 120 horas, diferindo apenas no tempo zero hora.

Em trabalhos pioneiros realizados por Araújo (2008) e Barrocas (2008), também foram obtidos resultados semelhantes para diferentes patossistemas estudados. As taxas de infecção e transmissão foram proporcionais, à medida que aumentou o tempo de contato das sementes ao patógeno, como verificado neste trabalho.

A partir do potencial P1, verificou-se redução da germinação e do vigor em todos os tratamentos, com diferença significativa em relação à testemunha, sendo um potencial capaz de ser menos prejudicial ao vigor das sementes, podendo proporcionar estudos de transmissão e efeitos em plantas emergidas causadas por este patógeno. Esses dados sugerem que, para a obtenção de sementes infectadas e a verificação do efeito causado na qualidade sanitária e fisiológica e a obtenção das taxas de infecção e transmissão, o menor potencial de inóculo correspondendo aos tempos de contato a partir de 24 horas foi suficiente.

Na literatura, não existem relatos sobre a transmissibilidade de *S. sclerotiorum* a partir de sementes infectadas de diferentes cultivares de soja. Para este fungo, cujos mecanismos de transmissão ainda são pouco conhecidos, a forma mais comum ou comprovada de transmissão ocorre por meio de escleródios que acompanham as sementes utilizadas na semeadura. Esse tipo de inóculo sobrevive no solo, infectando as plantas em estádios mais avançados de crescimento, principalmente a partir do florescimento. O inóculo inicial na forma de micélio nas sementes tem sido pouco estudado.

Tu (1988) estudou o papel de sementes infectadas com *S. sclerotiorum* em sementes de feijão na disseminação da doença. Concluiu que o micélio

dormente presente no interior das sementes foi importante não somente na disseminação do fungo como também nos aspectos epidemiológicos dessa doença. Verificou-se também que o micélio permaneceu viável dentro da semente por três anos e que, após este período, foi capaz de germinar e infectar plântulas de feijão provenientes destas sementes infectadas, comprovando a importância do micélio dentro da semente e sua transmissão de sementes para planta, como foi verificado neste trabalho.

Os resultados deste estudo tornam-se importantes para o processo de estabelecimento de padrões sanitários para patógenos como *S. sclerotiorum*, que são exigidos em programas de certificação, assim, levando-se em consideração fatores, como genótipos do hospedeiro e potencial de inóculo, dentre outros fatores que devem direcionar estes estudos, todas as condições estudadas mostraram o risco para que ocorra a doença em relação à quantidade de inóculos de sementes portadores deste patógeno caracterizado como uma praga não quarentenária regulamentada.



## 6 CONCLUSÕES

A presença de *S. sclerotiorum* na forma micelial em sementes de soja influenciou o desempenho fisiológico das sementes de forma proporcional aos valores do potencial de inóculo do patógeno. Houve um decréscimo significativo nos valores das variáveis: germinação, índice de velocidade de emergência, estandes inicial e final e peso de matéria seca de plantas emergidas, nos valores de potenciais de inóculo mais elevados.

A transmissão de *S. sclerotiorum* das sementes para as plantas de soja foi diretamente proporcional ao aumento do potencial de inóculo, e a taxa de transmissão variou de 7,78% a 100% entre as duas cultivares, Conquista e Tucunaré, utilizadas neste estudo.

Os isolados de *S. sclerotiorum* comportaram-se de forma semelhante diante dos parâmetros avaliados, germinação e vigor, independentemente das cultivares analisadas.

Considerando-se o risco de a taxa de transmissão nas condições estudadas atingir 100%, é compreensível sugerir tolerância zero deste patógeno em sementes de soja nos programas de certificação de sementes no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. V. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro**. 2008. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BRADFORD, K. J. A water relation analysis of seed germination rates. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, n. 5, p. 840-849, May 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009a. 200 p.
- \_\_\_\_\_. **Regras de análise de sementes**. Brasília, 2009b. 399 p.
- CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- CELANO, F. A. de O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica**. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967.

FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A. A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 21 p. (Circular Técnica, 10).

GOMES, E. V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2010. In press.

GOULART, A. C. P. **Avaliação do nível de ocorrência e efeitos de Phomopsis sp e Sclerotinia sclerotiorum (Lib) De Bary em sementes de soja (Glycine max (L.) Merrill)**. 1984. 80 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1984.

HENNING, A. A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 441-454.

HEWETT, P. D. Detection of seed-borne *Aschochyta pisi* Lib. and test a agreement within and between laboratories. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, n. 1, p. 271-283, Jan. 1987.

LIMA, E. F. et al. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, através da sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 105-115, jan. 1985.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

\_\_\_\_\_. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.

\_\_\_\_\_. **Tratamento de Sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 134 p.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, mar./abr. 2001.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razão e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 375-399.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MENTEN, J. O. M. Situação dos padrões de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 86-89, 1997.

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

MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Transmissão de *Alternaria* spp. através de sementes de feijão e seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 4, p. 381-383, jul./ago. 2006.

NAPOLEAO, R. et al. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 2, p. 180-182, mar./abr. 2006.

NASSER, L. C. B.; ARANCIBIA, R. C.; NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 309, 1999. Resumo.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan, 1979. 1190 p.

OLIVEIRA, J. A. et al. Transmissibilidade e danos causados por *Cercospora kikuchii* em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 97-100, jan./fev. 1993.

PATRÍCIO, F. R. A.; BORIN, R. B. R. G.; ORTOLANI, D. B. Patógenos associados a sementes que reduzem a germinação e vigor. In: MENTEN, J. O. (Ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p. 137-160.

PERES, A. P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias.** 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

PETROFEZA, S. Diversidade genética em populações de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2010, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Tropical Plant Pathology, 2010. p. 102-104.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.

SOUSA, M. V. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).** 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

TU, J. C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.

## CAPÍTULO 4

### Ultraestrutura de sementes de soja infectadas artificialmente por *Sclerotinia sclerotiorum*

#### RESUMO

A associação de patógenos com sementes tem sido responsável por danos dos mais significativos em cultivos de interesse agrônômico, causando prejuízos, tanto para os produtores de sementes como para os produtores e consumidores de grãos. Uma dessas associações de grande importância é o complexo *S. sclerotiorum* associado às sementes de soja, causador da doença conhecida como mofo-branco. Devido aos danos causados por este fungo, o conhecimento e demonstração desta relação biológica por meio de técnicas ultraestruturais tornam-se importantes, principalmente para elucidar a intensidade desta interação. O propósito, neste estudo foi avaliar o posicionamento de *S. sclerotiorum* por meio do exame de seu micélio nos tecidos de sementes, infectadas em diferentes níveis de potencial de inóculo. Para isso foram utilizadas sementes da cultivar Conquista que foram inoculadas via a técnica de condicionamento osmótico, com a exposição das sementes ao fungo *S. Sclerotiorum* por períodos de 0, 24, 48, 72 horas, o que correspondeu aos diferentes potenciais de inóculo P0, P1, P2 e P3, respectivamente. Partindo-se das sementes inoculadas, foram analisadas variáveis quanto à qualidade das sementes por meio de testes de sanidade (Neon), germinação e condutividade elétrica. Parte dessas sementes inoculadas foi separada e submetida à análise de microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se que houve um decréscimo significativo na qualidade fisiológica das sementes à medida que o potencial de inóculo aumentou (P0 a P3). Por meio da análise de ultraestrutura dos tecidos das sementes infectadas, observou-se que estes tecidos foram drasticamente afetados, tendo sido observadas deformações e desorganização celular das camadas mais externas parasitadas.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica. Soja. Patologia de Sementes.

## ABSTRACT

The association of *Sclerotinia sclerotiorum* with soybean seeds has been responsible for significant damages in this crop under the Brazilian conditions. The infection process of soybean seeds by mycelium of that fungus has been little investigated, being a matter to be explored for several reasons. For instance, epidemiological models of the disease may depend on the position and potential of the inoculum of the pathogen established in the seed tissues. Efficacy of seed treatment is also dependent on the intensity of the inoculum interaction with seeds. Following an inoculation method described in literature to obtain different inoculum potentials in seeds, in this study soybean seeds were prepared with four inoculum potentials. In addition to the evaluation of the effect of the pathogen on seed quality by running the germination and electrical conductivity tests, seeds were examined in the scanning electron microscope for observing the ultrastructural relationship between infected seed cells and the fungus. It was observed that colonized seed tissues presented a clear disorganization which was more intense at the highest inoculum potentials of *S. sclerotiorum*. The seed physiological quality was also lower at the highest infection potential by the pathogen. Mycelium of *S. sclerotiorum* was seen in all external layers of infected seeds, as well as in the embryo, mainly in the cotyledons.

Keywords: Scanning electron microscopy. Soybean. Seeds health. White mold

### 3 INTRODUÇÃO

A semente é o elemento principal no estabelecimento, na expansão, na diversificação e no desenvolvimento para a cultura da soja. A cobertura da semente mantém unidas as partes internas da semente, bem como fornece proteção mecânica contra choques, microrganismos e insetos. Também lhe são atribuídas às funções reguladoras no processo de germinação. Uma estrutura importante nas sementes é o eixo embrionário. O eixo embrionário mais o(s) cotilédono(s) formam o embrião. Os cotilédones são estruturas seminais, de formato variável, ligadas ao eixo embrionário, com função de absorver e reservar alimentos do endosperma e/ou perisperma, que serão usados durante a germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

Os patógenos, quando associados com as sementes, podem seriamente comprometer a integridade dessas estruturas essenciais às sementes.

Dentre os patógenos que podem vir associados às sementes de soja, encontra-se o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Devido aos danos causados na qualidade fisiológica e sanitária das sementes, este patógeno tem se destacado como sendo um dos mais importantes da cultura da soja e de outras espécies hospedeiras de grande importância econômica, no Brasil.

Os trabalhos em que se demonstram detalhes sobre a transmissão deste fungo presente nas sementes para as plantas são escassos. Técnicas como a microscopia eletrônica, que ajudam a esclarecer a interação patógeno e hospedeiros, têm sido utilizadas em diversos patossistemas (JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005; LICHSTON; GODOY, 2006).

Alguns trabalhos em relação a *S. sclerotiorum* em diferentes espécies hospedeiras que têm aplicado esta técnica têm colaborado no entendimento da dinâmica do processo infeccioso por este patógeno em diferentes tecidos de plantas, bem como na determinação de sua exata localização (HUANG et al.,



2008). Diante do exposto, estudos ultraestruturais podem auxiliar no entendimento das relações de patogenicidade e revelar etapas importantes no processo de colonização e infecção pelos patógenos.

Neste trabalho estudaram-se a possível associação dos potenciais de inóculo de *S. sclerotiorum* e o efeito histológico pela presença do patógeno na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Análise de Sementes, Patologia de Sementes, de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

### 4.1 Sementes e isolados utilizados

Foram utilizadas sementes pertencentes da cultivar Conquista, safra 2008/2009. A qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote foi avaliada por meio do teste de germinação e sanidade, como recomendado nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e pela International Seed Testing Association - ISTA (2002).

O isolado de *S. sclerotiorum* CMLAPS242, oriundo de sementes de soja foi multiplicado em meio BDA, em placas de Petri, a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas, em câmara incubadora tipo BOD.

### 4.2 Procedimentos de inoculação de *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

O substrato básico utilizado na inoculação foi o batata-dextrose-ágar (BDA), adicionando-se o soluto manitol e ajustando-se o meio para -1 MPa (MACHADO et al., 2001). A concentração para o preparo dos meios, para este potencial hídrico, foi obtida por meio do software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995).

As sementes de soja foram previamente desinfestadas. Esta assepsia superficial consistiu em emergi-las em solução de hipoclorito de sódio (NaCl 1%) por 1 minuto, lavando-as por três vezes em água destilada, e, em seguida, secas por 48 horas, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente essas sementes

foram colocadas sobre as colônias, em camada única e mantidas por diferentes períodos de exposição (0, 24, 48 e 72 horas), o que correspondeu aos potenciais de inóculo P0, P1, P2 e P3, respectivamente. Com a testemunha, sementes foram colocadas em nas mesmas condições sobre o meio de cultura, sem adição do fungo, em cada tempo de exposição citado.

Após a incubação das sementes, estas foram retiradas e distribuídas sobre papel germitest em temperatura ambiente, para secagem. Estas sementes inoculadas com os diferentes potenciais de inóculo foram utilizadas nos testes descritos a seguir.

### **4.3 Testes aplicados para avaliação da qualidade de sementes**

#### **a) Teste de sanidade**

As sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* foram distribuídas em substrato ágarizado (batata-dextrose-ágar) contendo 50mg de cloranfenicol; 50 mg de azul de bromofenol e manitol -1,0MPa. O pH final foi ajustado para 4,7 com HCl ou NaOH e todos os componentes foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. As placas foram distribuídas em câmara de incubação, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. A partir do terceiro dia de incubação, todas as sementes foram examinadas no intuito de detectar ao seu redor a formação, ou não, de halos amarelo-avermelhados, indicativos da presença de *S. sclerotiorum*. As placas também foram analisadas ao microscópio estereoscópico quanto ao crescimento de micélio característico e à presença de escleródios de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009).

A ocorrência de *S. sclerotiorum* foi registrada em 200 sementes inoculadas e não inoculadas, para cada tempo de contato com o patógeno.

**b) Teste de germinação:**

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada, 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas no quinto dia, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

**d) Teste de condutividade elétrica:**

Foi realizado com quatro repetições de cinquenta sementes inoculadas com *S. Sclerotiorum*. Sementes de cada repetição foram pesadas com precisão de 0,01g e, a seguir, colocadas em copos de plástico contendo 75 mL de água deionizada, permanecendo por um período de 24 horas à temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$ . Com um condutímetro de massa marca DIGIMED, modelo CD21A, foi efetuada a leitura em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e os resultados expressos com base no peso da amostra (TORRES, 1996; VIEIRA; CARVALHO, 1994).

**4.4 Análise de ultraestrutura de sementes de soja por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Amostras de sementes de soja, inoculadas artificialmente com *S. sclerotiorum*, foram tomadas aleatoriamente e preparadas para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Sementes inteiras ou sementes seccionadas transversalmente, longitudinalmente e medialmente, foram fixadas em solução Karnovisk's modificado- Glutaraldeído 2,5% , formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2,  $\text{CaCl}_2$  0,001 M por um período de 24 horas. Após a imersão do material em solução fixadora, os espécimes foram

transferidos para uma solução tampão de cacodilato (0,05M) e lavados três vezes, durante 10 minutos. Posteriormente, foram colocados em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados em água destilada por três vezes e desidratados em série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por 3 vezes). Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para a substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para a observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram registradas digitalmente, e as mais representativas gravadas e preparadas as pranchas utilizando o pacote Corel Draw 12.

#### **4.5 Análise estatística**

Para todos os testes, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos de quatro tempos de contato das sementes com o fungo e dois tipos de inoculação com e sem o fungo, com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000). Para os tempos de contato foi utilizada regressão e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Qualidade fisiológica e análise ultraestrutural de sementes de soja infectadas artificialmente

Pelos resultados da análise de variância, houve diferença significativa entre os níveis de infecção do patógeno em relação à qualidade fisiológica e sanitária das sementes de soja. Com o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo, houve aumento linear correspondente à incidência do patógeno nas sementes (Gráfico 1).

Foi verificado decréscimo acentuado na germinação (Gráfico 2) e aumento gradual na condutividade elétrica (Gráfico 3) das sementes de soja à medida que houve aumento nos potenciais de inóculo.

Nas sementes não inoculadas com *S. sclerotiorum* constatou-se uma pequena alteração tanto na germinação quanto na condutividade, quando comparada àquelas submetidas à inoculação.

Para a qualidade fisiológica em relação aos valores de germinação houve uma redução de 94% para 20,5%, quando ocorreu aumento dos potenciais de inóculo. No Gráfico 2, verifica-se que a redução da germinação nos diferentes potenciais de inóculo na ausência do patógeno foi apenas de 15%, enquanto na presença do fungo essa redução do potencial P0 para o potencial P3 foi de 78%. Assim pode-se afirmar que a redução real sem o efeito do restritor hídrico foi de 63%.

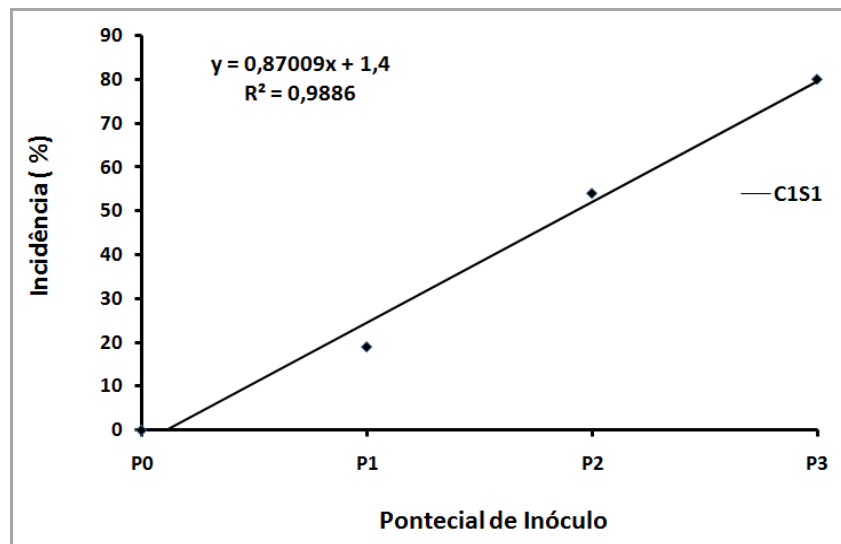


Gráfico 1 Incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, cultivar Conquista, nos diferentes potenciais de inóculo em função do tempo de contato das sementes ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2010

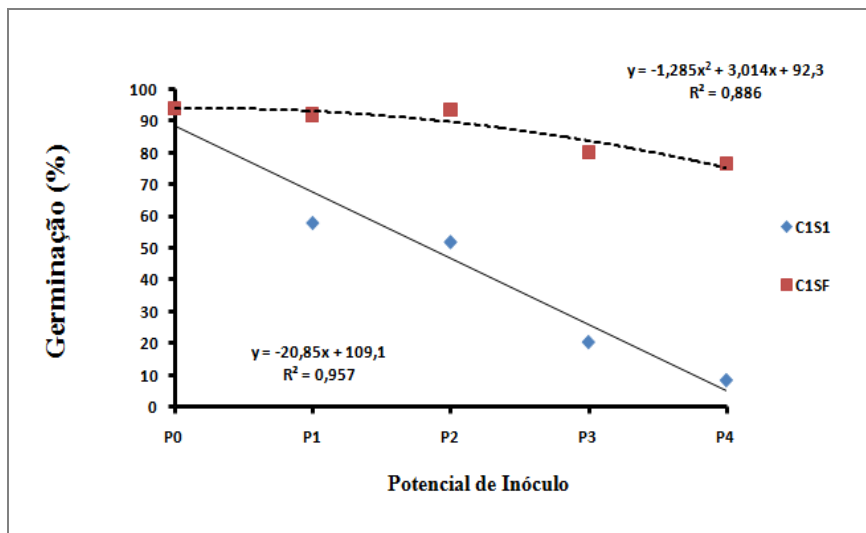


Gráfico 2 Germinação de sementes de soja, em função dos diferentes potenciais de inóculo de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2010

Os testes de vigor têm sido instrumentos precisos para a indústria de sementes na determinação da sua qualidade fisiológica (MARCOS FILHO, 1999). Neste trabalho, foi realizado o teste de condutividade elétrica para a verificação do vigor do lote em questão nos diferentes potenciais de inóculo. Como a degradação das membranas celulares se constitui, hipoteticamente, no primeiro evento do processo de deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973), os testes que avaliam a integridade das membranas seriam, teoricamente, os mais sensíveis para estimar o vigor.

Nesse sentido, pode-se destacar o teste de condutividade elétrica, no qual a qualidade das sementes é avaliada indiretamente por meio da determinação da quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, como realizado neste trabalho. Os menores valores, correspondentes à menor liberação de exsudatos, indicam alto potencial fisiológico (maior vigor), revelando menor intensidade de desorganização dos sistemas de membranas das células. Assim os maiores valores de solutos lixiviados neste estudo foram verificados nos potenciais de inóculo P2 e P3 (Gráfico 3), nos quais foi detectada maior incidência de *S. sclerotiorum* (Gráfico 1).

Observa-se, pelo Gráfico 3, que os valores da condutividade elétrica diminuíram proporcionalmente com o aumento do potencial de inóculo de P0 para o P3, e esses valores foram inversamente proporcionais quando comparado com os das sementes nos diferentes potenciais de inóculo na ausência do patógeno. Os valores foram de  $70 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , no menor potencial, para  $98 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , na presença do patógeno, enquanto na ausência deste, esses valores variaram de 50 a  $70 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Na literatura, vários fatores são citados como interferentes nos resultados de condutividade, como a presença de sementes danificadas fisicamente (LOEFFLER; TEKRONY; EGLI, 1988; TAO, 1978), o tamanho da semente (TAO, 1978), o genótipo de uma mesma espécie (PANOBIANCO et



al., 1999), o teor de água inicial das sementes (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA, 1983; CARVALHO, 1994; LOEFFLER; TEKRONY; EGLI, 1988), o período de embebição (LOEFFLER; TEKRONY; EGLI, 1988; WANG; HAMPTON; HILL, 1994) e a temperatura de embebição (MURPHY; NOLAND, 1982). Segundo Machado (1988), a interferência dos patógenos associados às sementes pode promover quedas no poder germinativo, debilitação e redução da população de plantas, além de desenvolvimento de epidemias capazes de atacar todas as partes das plantas, em vários estádios, inclusive pós-colheita.

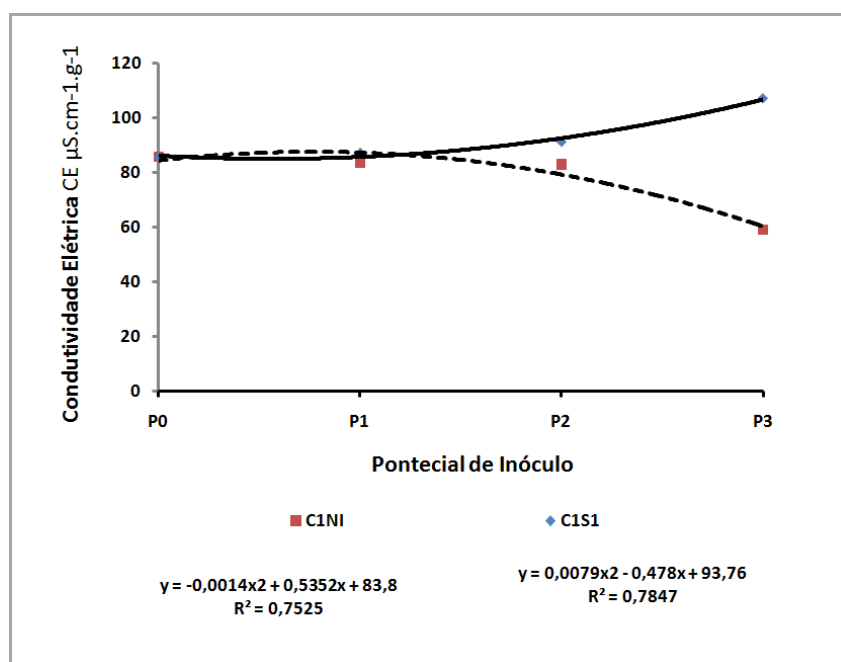


Gráfico 3 Condutividade elétrica de sementes de soja em função dos diferentes potenciais de inóculo de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2010

No presente trabalho, foi possível associar a qualidade fisiológica das sementes de soja e os aspectos anatômicos do tegumento, avaliados por meio de

microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que as estruturas celulares sofreram alteração em sua parede celular à medida que ocorreu aumento no nível de infecção das sementes com isolado de *S. sclerotiorum*, caracterizado como potencial de inóculo.

Observou-se também acentuada redução de volume celular que pode ter sido o resultado de ruptura da membrana celular, fazendo com que o conteúdo citoplasmático seja lixiviado, refletindo nos altos valores de condutividade elétrica (Gráfico 3).

A análise de células ultraestrutural revelou o efeito causado pela associação de *S. sclerotiorum* com sementes de soja submetidas a diferentes potenciais de inóculo do patógeno. Ficou evidente o efeito do patógeno nas células do eixo embrionário quando os níveis de infecção foram aumentados nas sementes de soja (Figura 1). As eletromicrografias revelaram o efeito desta associação nas camadas de células paliádicas, nas células em ampulheta e no parênquima lacunoso (Figura 2).

A partir do tegumento das sementes, o fungo foi capaz de germinar e penetrar nos tecidos internos das sementes, conforme pode ser observado na Figura 3.

Pela análise de microscopia eletrônica foi possível observar as diferenças na estrutura das membranas na ausência e na presença do patógeno, podendo-se neste caso inferir que o fungo foi responsável pela degradação da membrana. Este resultado ajuda a elucidar um dos fatores que podem ter interferido na baixa qualidade fisiológica das sementes à medida que aumentou o potencial de infecção por *S. sclerotiorum*.

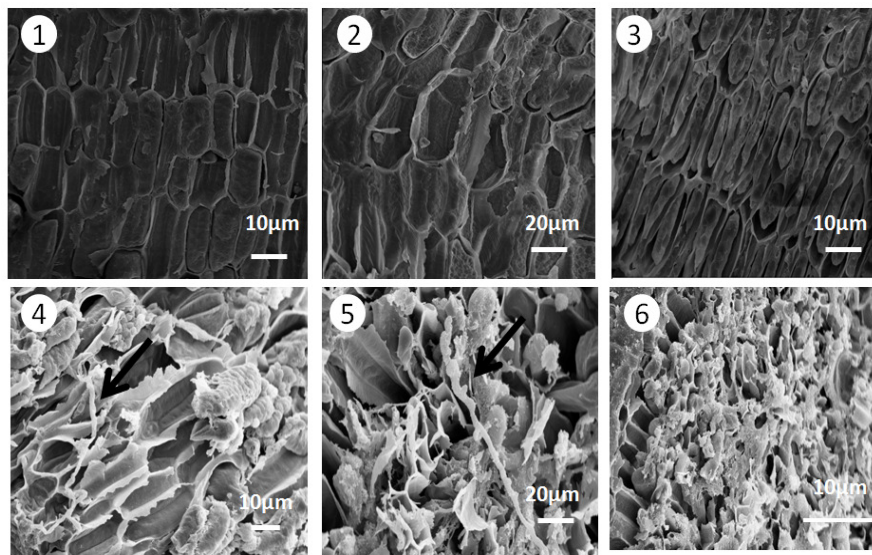


Figura 1 Eletromicrografias de varredura no eixo embrionário de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*. 1) potencial P1 sem fungo; 2) potencial P2 sem fungo; 3) potencial P3 sem fungo; 4) potencial P1 com fungo; 5) potencial P2 com fungo; 6) potencial P3 com fungo. As setas nas Figuras 1 e 2 indicam presença do crescimento micelial do fungo

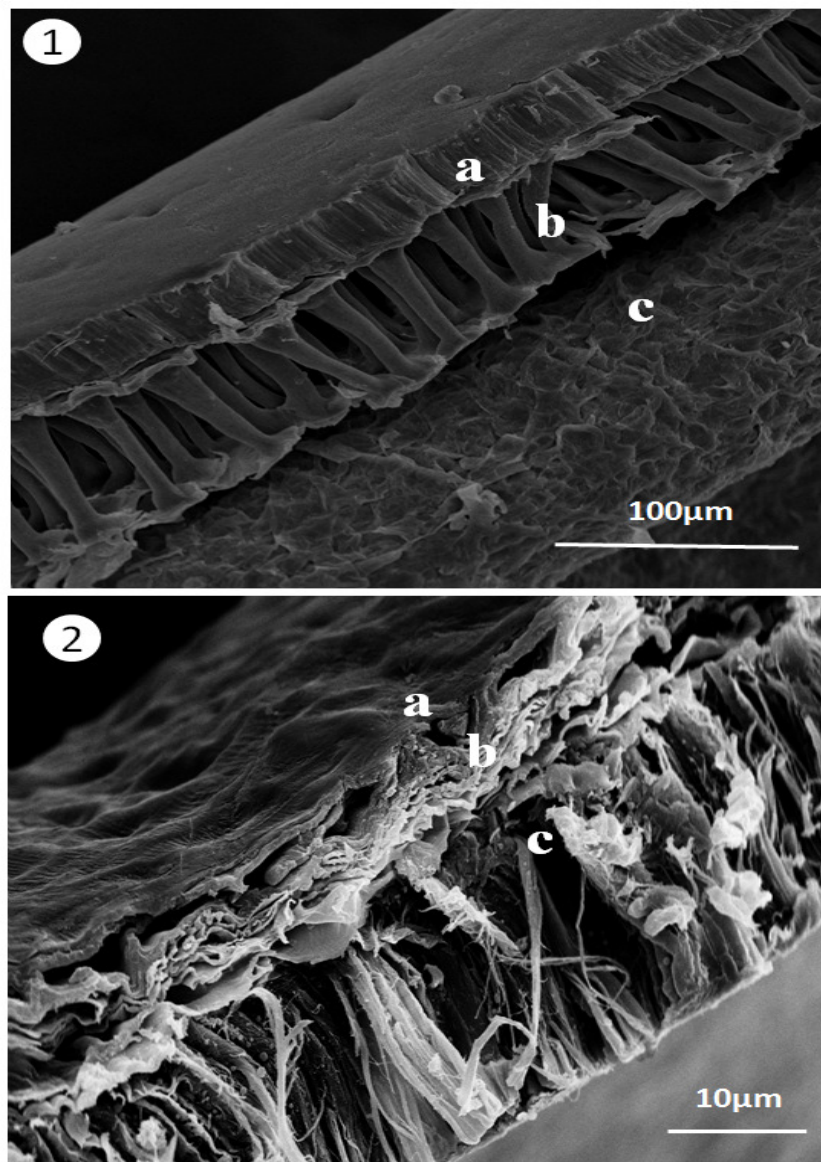


Figura 2 Eletromicrografias de varredura em sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*. 1 - ausência do patógeno e 2 - presença do patógeno no tecido vegetal (corte). Comparação da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas de células. (a) epiderme (camadas paliçádicas); (b) hipoderme (células em ampulheta) e; (c) células parenquimatosas

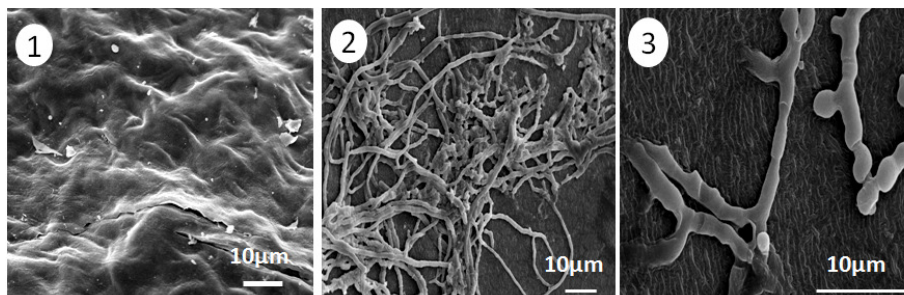


Figura 3 Eletromicrografias de varredura em sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*. 1) tegumento no potencial P0 sem a presença do patógeno; 2 e 3) crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* no tegumento das sementes de soja no maior potencial de inóculo

A partir do potencial de inóculo P1 já foi possível observar pelas eletromicrografias de varredura o crescimento potencial e a degradação dos tecidos das sementes. Esses dados foram observados quando se verificou que, após 24 horas de contato da semente com o fungo, houve decréscimo nos valores de germinação e vigor dessas sementes de soja.

Na interação planta-patógeno a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência do hospedeiro ocorre na célula, ou seja, tanto no patógeno quanto na planta hospedeira. Teoricamente, existem duas amplas categorias de defesa: a estrutural, morfológica ou anatômica e a bioquímica ou fisiológica (AGRIOS, 2005). Contudo, conhecer e elucidar como o patógeno coloniza os tecidos das sementes podem fornecer subsídios para medidas de controle eficientes contra o mofo-branco.

## 6 CONCLUSÕES

As análises ultraestruturais das sementes de soja infectadas por *S. sclerotiorum*, realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura mostraram-se eficazes para demonstrar os danos causados nos tecidos das sementes; os maiores danos foram observados nos potenciais de inóculo mais elevados.

Os dados de germinação e vigor (teste de condutividade elétrica) foram associados com os danos causados pelo patógeno, conforme revelou a análise ultraestrutural.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing, 1983. 93 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365 p.
- CARVALHO, M. V. **Determinação do fator de correção para condutividade elétrica em função do teor de água de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Jaboticabal: UNESP, 1994. 36 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 235.
- HUANG, L. et al. Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 115, n. 1, p. 9-16, Feb. 2008.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of vigour test methods**. Zurich, 2002. 117 p.
- JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 217-223, mar. 2005.
- LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. de. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 919-926, set. 2006.

LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 12, n. 1, p. 37-53, Mar. 1988.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, mar./abr. 2001.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

\_\_\_\_\_. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-21.

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

MURPHY, J. B.; NOLAND, T. L. Temperature effects on seed imbibition and leakage mediated by viscosity and membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, n. 2, p. 428-431, 1982.

PANOBIANCO, M. et al. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 3, p. 945-949, 1999.

TAO, J. K. Factors causing variations in the conductivity test for soybean seeds. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 3, n. 1, p. 10-18, 1978.

TORRES, S. S. B. Qualidade fisiológica de sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.) através do teste de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 246-250, mar./abr. 1996.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.



WANG, Y. R.; HAMPTON, J. G.; HILL, M. J. Red clover vigour testing: effects of three test variables. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 1, p. 99-105, 1994.

## CAPÍTULO 5

### Adequação do processo de transformação de *Sclerotinia sclerotiorum* com o gene marcador GFP (*Green Fluorescent Protein Gene*)

#### RESUMO

*Sclerotinia sclerotiorum* é um dos principais patógenos de um grande número de espécies vegetais em todo o mundo, causando sérios prejuízos em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Conhecida como “mofo-branco,” essa doença causa redução de estande, debilitação e morte das plantas e seu agente causal é transmitido por sementes. Para auxiliar nos estudos sobre a dinâmica e os mecanismos de transmissão do referido patógeno via sementes, este trabalho foi realizado como propósito de realizar a adequação do processo de transformação genética deste fungo utilizando-se de gene marcador de expressão tipo GFP (*Green Fluorescent Protein*). Para a obtenção dos transformantes, foram seguidos protocolos já descritos na literatura, com adaptações. O plasmídeo utilizado foi multiplicado com sucesso em células competentes e a extração e a purificação do DNA foram verificadas por meio da eletroforese. Após a transformação, observações das colônias dos isolados foram realizadas com auxílio de microscópio de epifluorescência, pelo qual foi possível comprovar a incorporação do marcador fluorescente tipo GFP. A confirmação desses transformantes foi também realizada por meio da técnica de PCR, usando *primers* específicos, *forward* 5'GCGACGTAAACGGCCACAAG3' e *reverse* 5'CCAGCAGGACCATGTGTGATCG3', com amplificação a 606 bp a sequência de fragmento do *sgfp*. Por meio do teste de patogenicidade, os transformantes mantiveram sua virulência em plantas de soja cultivar Conquista.

Palavras-chave: Protoplasto. Transformação genética. GFP. *Sclerotinia sclerotiorum*.

## ABSTRACT

*Sclerotinia sclerotiorum* is a major pathogen in many crops worldwide, causing serious losses under favorable conditions and being seed transmitted. In soybean the disease named “white mold,” causes reduction in yields and contamination of soils where sclerotia are introduced or formed on infected host plants. To better understand the dynamics and mechanisms of transmission and colonization of the pathogens through seeds, the use of molecular markers such as GFP gene, is considered a quite useful tool. In this work the aim was to adjust standard protocol, developed for several fungi, for the transformation of *S. sclerotiorum* isolated from soybean. The plasmid, used in this work was successfully multiplied in competent cells of *Escherichia coli* and small modifications in the DNA extraction and purification were efficient as demonstrated by electrophoresis. After the transformation step, observation of colonies of the isolates in epifluorescent microscope, indicated the successful incorporation of the fluorescent marker GFP in the target isolates. The confirmation of these transformants were also done by PCR using specific primers, forward 5'GCGACGTAAACGGCCACAAG3' and reverse amplification 5'CCAGCAGGACCATGTGTGATCG3' com the 606bp sequence of the fragment sgfp. Through the pathogenicity test transformants maintained their virulence capacity as demonstrated in a susceptible soybean cultivar.

Keywords: Protoplast. Genetic transformation. GFP. *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 3 INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo necrotrófico que ataca culturas de importância econômica no mundo, sendo relatada em diversas espécies de plantas hospedeiras (AGRIOS, 2005; BOLAND; HALL, 1994).

No âmbito da fitossanidade, a ação de algumas doenças, tem limitado não somente o aumento e a melhoria da produtividade, como também a expansão das áreas de plantio em regiões favoráveis para esta finalidade. Por intermédio das sementes, grande número de patógenos, considerados de risco, como é o caso de *S. sclerotiorum*, pode ser disseminado entre regiões produtoras dentro de um mesmo país e entre países, determinando danos de dimensões intoleráveis, além de quase sempre irreversíveis. A análise dos prejuízos oriundos das doenças que surgem a partir das sementes, encontra dificuldades embora se saiba que estes são variáveis e pouco determinados (MACHADO, 1994).

Para a cultura da soja, que representa importante fonte de divisas para o Brasil, a interação de *S. sclerotiorum* com sementes de soja, não tem sido elucidada com a devida clareza. Embora parte da tecnologia de produção já tenha sido desenvolvida, o aspecto de qualidade de sementes, que é básico para qualquer programa de melhoramento dessa cultura, permanece ainda sem o conhecimento adequado, necessário para atingir o seu potencial máximo de produtividade.

O conhecimento dos mecanismos que envolvem a infecção e a transmissão de *S. sclerotiorum* via sementes de espécies hospedeiras, ainda é aspecto pouco esclarecido nas condições brasileiras. O uso de técnicas moleculares via marcadores genéticos, pode auxiliar na elucidação desses mecanismos. Um aspecto importante sobre o uso dessas técnicas são os estudos de estabelecimento de taxas de transmissão de patógenos da semente à planta,

que é um fator fundamental para o estabelecimento de padrões de sanidade de sementes para patógenos considerados de risco, como é o caso de *S. sclerotiorum*.

Diversos marcadores genéticos são utilizados na atualidade, em biotecnologia, mas muitos empregam técnicas onerosas, que podem ocasionar modificações indesejadas nos organismos em estudo. Entretanto, o marcador molecular *green fluorescent protein* (GFP), que codifica a proteína fluorescente verde, aparece como opção valiosa para estudos sobre a interação de agentes patogênicos (CHALFIE et al., 1994). Atualmente, já foram desenvolvidos muitos variantes do *gfp*, através de mutações que induzem a substituição dos nucleotídeos que codificam vários aminoácidos. Esse tipo de marcador apresenta inúmeras vantagens, como a não descaracterização do isolado transformado em relação à sua natureza.

Atualmente, na literatura, são encontrados relatos sobre a transformação de diversos fungos, havendo, para cada espécie, a necessidade de ajustes nos protocolos utilizados. Para que a concentração de GFP na célula seja satisfatória, a escolha do promotor e a metodologia empregada para fazer a transformação da célula devem ser otimizadas para cada tipo de célula com que se está trabalhando (BALINT-KURTI; MAY; CHURCHILL, 2001; LORANG et al., 2001; SPELLING; BOTTIN; KAHMANN, 1996; TOMBOLINI et al., 1999).

A partir do exposto, o que se propôs com a realização deste trabalho foi a adequação de um protocolo de transformação que emprega o gene marcador tipo GFP, com vistas à sua aplicação para a espécie *Sclerotinia sclerotiorum*, para isolados atuantes nas condições brasileiras.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Patologia de Sementes, Virologia Vegetal e de Microscopia Eletrônica, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) e da University of Guelph, Canadá (UoG-ON).

### 4.1 Obtenção do isolado e do vetor de transformação

O isolado utilizado de *S. sclerotiorum* neste estudo foi obtido da coleção do Laboratório de Patologia de Sementes (CMLA242). O vetor plasmidial de transformação utilizado foi o pCT74 (pSC001), contendo o *sgfp* com o gene promotor *pToxA*, proveniente do fungo *Aspergillus nidulans*, contendo um gene de resistência (*hpr*) e o antibiótico higromicina-B (MAOR; PUYESKY; SHARON, 1998). Este plasmídeo foi cedido pelo pesquisador Dr. Theo van der Lee (Plant Research International, The Netherlands). Células de *Escherichia coli* para a multiplicação desse plasmídeo pSC001 foram utilizadas seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001).

### 4.2 Obtenção de protoplastos

O isolado de *S. sclerotiorum*, patogênico à soja, escolhido para a transformação com GFP foi, inicialmente, multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), em placas de Petri, a 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Para a obtenção dos protoplastos, a metodologia foi adaptada de acordo com Boland e Smith (1991) e Liljeroth, Jansson e Schafer (1993). Foram avaliados os seguintes fatores: estabilizadores osmóticos (NaCl 0,7M; KCl 0,7 M; NH<sub>4</sub>Cl 0,6 M; MgSO<sub>4</sub> 0,62 M; sacarose 0,56 M e sorbitol 0,63 M) e tempo

de geração de protoplastos (1, 2, 3 e 4 horas). Esses fatores foram analisados em ensaios independentes com 8 repetições e em triplicata. O pH das soluções estabilizadoras foi ajustado na faixa de 5,8 e elas foram autoclavadas, a 121°C, por 20 minutos.

A partir do crescimento fúngico no meio de cultura, foram retirados 5 discos de micélio da periferia das colônias, os quais foram transferidos para Erlenmeyers (100 mL) contendo 50 mL de caldo de batata-dextrose. Os frascos foram dispostos em agitador mecânico horizontal a 125 rpm, a 20°C, por 72 horas. Após a produção da massa micelial fizeram-se a filtragem e a secagem, por meio de bomba a vácuo. Posteriormente, para cada 3 mL de estabilizador osmótico, foram adicionados 100 µg de micélio seco e a enzima lyzing enzymes (Sigma- L1412-10G), na proporção de 100 mg, para cada 3 mL de solução osmótica. A geração dos protoplastos de *S. sclerotiorum* foi realizada em agitador com 75 rpm, a 28°C. Os protoplastos foram coletados e observados ao microscópio e, em seguida, quantificados em câmara de Newbauer.

#### **4.3 Obtenção de *Sclerotinia sclerotiorum* geneticamente modificada com *sgfp*.**

A suspensão enzima/protoplastos foi coletada e filtrada em uma camada de algodão esterilizada, e em seguida, foi centrifugada, por 5 minutos, a 2.000 rpm, a 4°C e ressuspendida em NaCl (0,7 M) gelado (4°C) e novamente em tampão de armazenamento, contendo quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl<sub>2</sub>) e uma parte de SPTC (0,8 M Sorbitol, 40% PEG4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl<sub>2</sub>).

Para a transformação, a suspensão de protoplastos (0,5- 2,5 x 10<sup>7</sup> em 100 µL) foi misturada com 10 µL DNA plasmidial GFP (0,35-1,66 µg/µL) em microtubo de 2,2 mL e mantida em gelo, por 30 minutos. Em seguida,

adicionou-se 1 mL de SPTC (40% do PEG4000- FLUKA), deixando-a em incubadora à temperatura de 22°C, por mais 20 minutos.

Após esse período, essa suspensão foi vertida em 200 mL de meio de regeneração a 43°C, previamente autoclavado. O meio de regeneração foi preparado dissolvendo-se 0,1% de extrato de levedura (Sigma-Y4250-250G), 0,1% do casienhydrolysate (Sigma-C8845-500MG), 34,2% de sacarose (Sigma-84100-1KG) e 1,0% de ágar granulado (Difco-1016141000-1KG) em 1.000 mL de água destilada. Em seguida, esse meio contendo os possíveis isolados transformados foi vertido em dez placas de Petri (94 mm de diâmetro) contendo 20 mL do meio. Cada um deles foi seguido de incubação por 72 horas, a 20°C. Após esse período, sobre cada placa foram adicionados 10 mL de ágar-água contendo o antibiótico higromicina-B na concentração de 100 µg/mL, sendo elas mantidas em câmara do tipo BOD, a 20°C, por até quinze dias.

### **3.3 Seleção, verificação da estabilização e características dos transformantes**

As colônias resistentes à higromicina-B foram selecionadas e, em seguida transferidas para meio seletivo BDA contendo o antibiótico seletivo.

Para garantir a estabilidade dos transformantes, realizaram-se sucessivas repicagens das colônias de *S. sclerotiorum* em meio seletivo com batata, dextrose e Agar (BDA), com e sem higromicina B (100 µg/mL). Observações foram feitas sobre o crescimento micelial e as características morfológicas dos transformantes em relação à testemunha e ao monitoramento da fluorescência realizado em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) equipado com o filtro GFP, excitação filtro 470 a 490 nm e pico de transmissão para excitação em 510 a 560 nm. As imagens obtidas das avaliações foram editadas utilizando-se os softwares Axio Vision Release V.4,7 e o Microsoft Office Picture Manager.



#### 4.4 Teste de patogenicidade

Sementes de soja foram semeadas em vasos de 1 L contendo substrato vermiculita e colocados em câmara de crescimento vegetal à 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por 4 semanas. Após este período dois isolados dos transformantes estáveis e um isolado de *S. sclerotiorum* não transformado foram inoculados nas plantas de soja e, após 48 horas da inoculação, as lesões foram analisadas com base em escala de notas (AUCLAIR et al., 2004). Foram computados os dados de duas avaliações, uma na primeira e outra na segunda semana após a inoculação.

O procedimento da inoculação seguiu a metodologia descrita por Auclair et al. (2004), Petzold e Dickson (1996) e Singh et al. (2007), pelo qual empregaram-se tubos plásticos de, aproximadamente, 5 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento. Foram colocados discos de micélio do patógeno no orifício de cada tubo e, em seguida foi inserido em plantas de soja que foram cortadas 2 cm abaixo do terceiro par de folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em que cada 10 plantas por repetição de cada isolado ou transformante foram utilizadas para a análise de variância pelo teste de Tuckey  $P \leq 0,05$ .

#### 4.5 Confirmação da presença do gene GFP por meio de primers específicos

Para este ensaio, foram empregados *primers* específicos, *forward* 5'GCGACGTAAACGGCCACAAG3' e *reverse* 5'CCAGCAGGACCATGTGTGATCG-3', com amplificação de 606-bp, desenhados com base nas sequências de nucleotídeos do gene (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009).

Os transformantes foram cultivados em meio BDA, a 20°C, por 5 dias. Em seguida, fez-se a maceração da massa micelial em nitrogênio líquido, e utilizaram-se 0,04g do macerado para a extração do DNA. Todo o procedimento de extração e purificação utilizou o protocolo e o kit comercial da promega (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega®).

A amplificação da sequência do *sgfp* foi de 35 ciclos de 1 minuto de 94°C, 2 minutos de 53°C e 90 segundos de 72°C, seguido por 5 minutos de 72°C. As reações da PCR constituíram-se de 2,5 µL de 25 mM Mg buffer, 2,5 µL de 10 × buffer, 1 mM dNTPs, 0,25 µM de cada *primer* e 1 unit Taq DNA polimerase (Invitrogen) para um volume total de 25 µL.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação genética de um microrganismo requer a utilização de procedimentos que tornem as células receptoras permeáveis à entrada do DNA. Entre vários tipos de procedimentos, destaca-se para os fungos filamentosos, a obtenção de protoplastos (PERBEDY et al., 1976), os quais consistem em células destituídas de parede celular.

O número de protoplastos obtidos neste trabalho, variou em relação aos tipos de estabilizadores osmóticos usados e também em relação ao tempo de liberação dos protoplastos. O número de protoplastos foi maior à medida que se aumentou o tempo de digestão de uma para três horas, tendo a maior quantidade liberada sido de  $50 \times 10^6/\text{mL}$  (Gráfico 1). A liberação de protoplastos foi progressiva até a terceira hora da digestão enzimática do micélio. A partir daí, observou-se redução na produção de protoplastos com modificações do formato e observou-se rompimento da membrana desses protoplastos em todos os tratamentos. Segundo Kim et al. (2000), incubações prolongadas com enzimas líticas podem levar à degeneração dos primeiros protoplastos liberados.

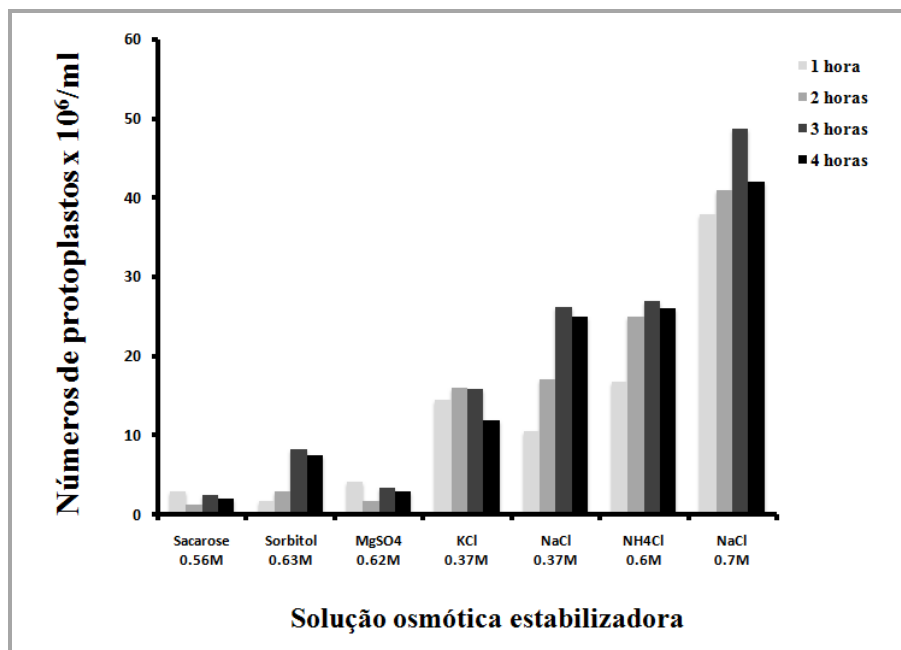


Gráfico 1 Número de protoplastos de *S. sclerotiorum* obtidos na presença de diferentes estabilizadores osmóticos em função de diferentes tempos de digestão enzimática

Dentre os estabilizadores utilizados, os sais KCl, NaCl e NH<sub>4</sub>Cl foram os que apresentaram maior eficácia, sendo destaque o soluto NaCl 0,7 M, com maior liberação dos protoplastos.

Diversos fatores que interferem na liberação de protoplastos, são relatados na literatura, como a preparação enzimática, o estabilizador osmótico, a idade micelial e o microrganismo a ser utilizado (PEBERDY et al., 1976).

Os açúcares, como sorbitol e sacarose, não se mostraram estabilizadores osmóticos adequados para a liberação de protoplastos neste trabalho, a exemplo do que tem sido revelado também por outros estudos (DIAS et al., 1997; MARCHI et al., 2006).

Em alguns trabalhos já realizados com outros microrganismos têm sido encontradas dificuldades na obtenção de protoplastos. Nesse sentido, estudos de

Marchi et al. (2005, 2006) revelaram que a liberação de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. e *Magnaporthe grisea* foi relativamente baixa com o uso da solução à base de açúcares. Por sua vez, em estudos de Elbouami (2000) e Seh e Kenerley (1988) mostrou-se que o uso de manitol e sacarose foi similar a KCl e MgSO<sub>4</sub>, demonstrando que o estabilizador mais adequado depende de cada organismo a ser estudado.

De acordo com os testes realizados neste trabalho ficou evidenciado, nas repetições com triplicata deste experimento, que, para a obtenção de protoplastos de *S. sclerotiorum*, o uso de micélio com 5 dias de idade após a repicagem em meio de cultura contendo BDA, uso de 10 mg da “lyzing enzyme”) para cada 3mL de solução osmótica NaCl 0.7 M, sob agitação, a 75 rpm, por 3 horas, a 28°C, é um procedimento adequado para a transformação de *S. sclerotiorum*.

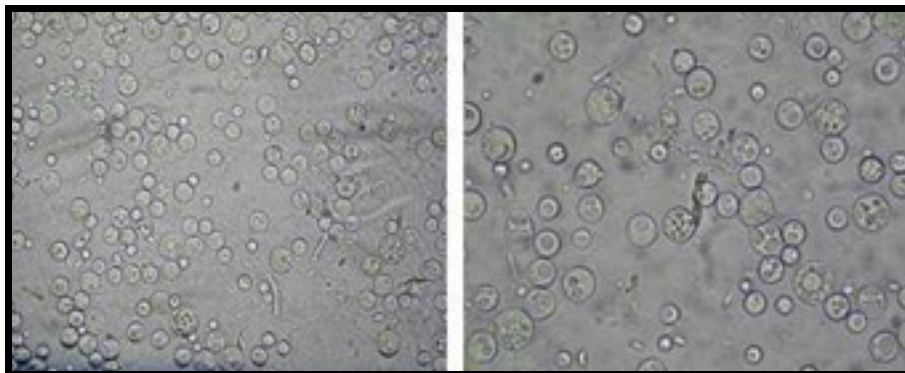


Figura 1 Protoplastos de *S. sclerotiorum* produzidos de acordo com os protocolos de Boland e Smith (1991) e Marchi, Borges e Brommonscheke (2006), com modificações

Em relação à obtenção de transformantes contendo o plasmídeo (pSC001), os resultados podem ser considerados satisfatórios, uma vez que 45 transformantes contendo o gene GFP foram obtidos, e, destes, 15 que apresentaram maior intensidade da fluorescência foram avaliados para teste de estabilidade mitótica e patogenicidade. Esses transformantes foram capazes de crescer em meio seletivo contendo higromicina na concentração de 100mg/ml, entre 8 e 14 dias após a repicagem, o que não foi evidenciado na testemunha.

Em relação à estabilidade, a maioria dos transformantes não permaneceu estável. Foram também observadas hifas parcialmente fluorescentes, as quais, após sucessivas repicagens, perderam esta característica em alguns dos casos.

A fluorescência verde foi evidenciada nos transformados com GFP, sendo a intensidade da fluorescência variável entre transformados e outros que apesar de crescerem na higromicina, não foram capazes de expressar tal fluorescência (Figuras 2 e 3).

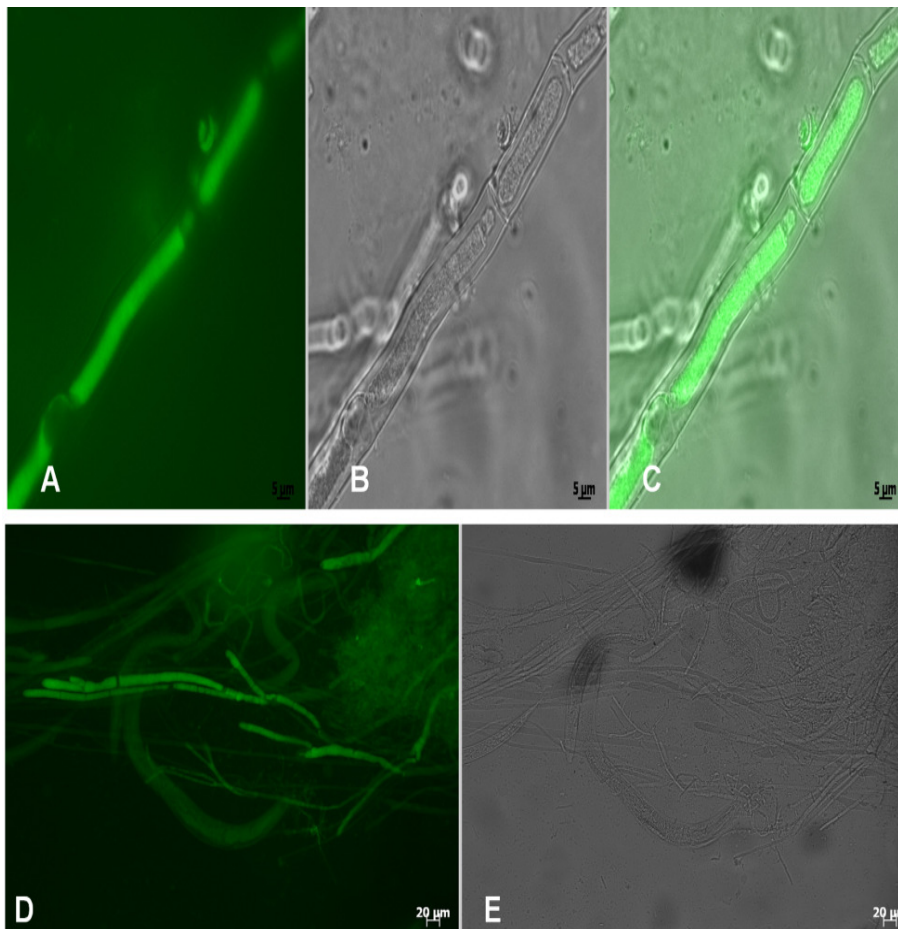


Figura 2 Fotomicrografia de fluorescência de hifas de *S. sclerotiorum*, com GFP, analisadas em microscópio de fluorescência (A) objetiva de 40x de aumento, sob luz UV a 558nm de comprimento de onda; (B) objetiva de 40x, sob luz branca; (C) objetiva de 60x- imersão sob luz UV 558nm; (D) tecido da raiz de planta de soja colonizado, após transmissão de sementes inoculadas com o fungo transformado e (E) hifa do isolado transformado com GFP sob luz branca

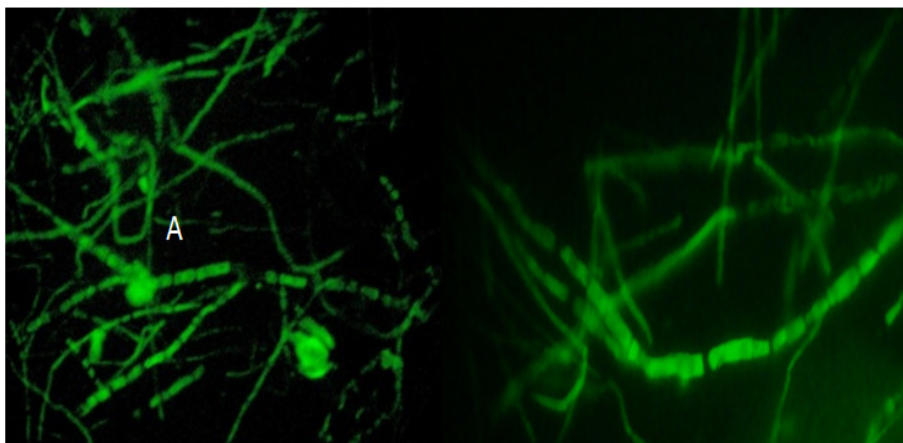


Figura 3 Fotomicrografia de fluorescência de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* por marcador *Green fluorescent protein* (GFP) com início de enovelamento de hifa configurando possível formação de escleródios

A perda da fluorescência em alguns dos transformantes de *S. sclerotiorum* pode ter sido devido ao tipo de núcleo dos protoplastos. Segundo Lorang et al. (2001), nos transformantes gerados a partir de protoplastos uninucleados a fluorescência é mais uniforme, como acontece com alguns fungos já transformados e relatados na literatura, como, *Colletotrichum magna*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria alternata*, *Cochliobolus sativus*, *C. sambucinum* e *Fusarium* spp. Já os transformantes gerados a partir de protoplastos multinucleados como é o caso de *Botrytis cinerea*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Sclerotinia sclerotiorum*, muitas vezes são expostos à fluorescência apenas algumas células fúngicas, que mantêm a expressão do fenótipo de fluorescência, necessitando ser transferidos várias vezes para meios seletivos, para uniformizar a expressão do gene marcador nas hifas.

Em relação às características morfológicas, os transformantes estáveis mantiveram crescimento similar em relação à testemunha. Apenas um deles não foi capaz de produzir escleródios.



Em relação ao teste de patogenicidade, os transformantes analisados mantiveram-se virulentos quando foram inoculados em plantas de soja em dois períodos de avaliação. Observou-se que a inoculação ocasionou maior severidade da doença na primeira semana após a inoculação no isolado não transformado (CMLAPS242) que não diferiu do transformado (GFP22). Após 2 semanas da inoculação tanto o transformado GFP22 quanto o GFP15 foram semelhantes, estatisticamente, em relação ao fungo não transformado diferindo da testemunha (DSF) (Tabela 1). As lesões e o crescimento do patógeno nas plantas foram observados e, após duas semanas, o fungo ocasionou morte das plantas de soja (Figura 4).

Tabela 1 Avaliação da severidade, de acordo com escala de notas, de lesões causadas por *S. sclerotiorum* em plantas de soja inoculadas com o patógeno

| Isolado      | Média das lesões por <i>S. sclerotiorum</i> |      |              |      |
|--------------|---|------|--------------|------|
|              | 1ª avaliação                                | EP   | 2ª avaliação | EP   |
| CMLAPS 242   | 5,3 a*                                      | 0,30 | 7,50a        | 0,43 |
| GFP 22       | 4,2 a                                       | 0,30 | 6,56a        | 0,43 |
| GFP 15       | 3,5b  | 0,30 | 6,32a        | 0,43 |
| DSF          | 1c  | 0,30 | 1b           | 0,43 |
| <b>CV(%)</b> | <b>17,13</b>                                |      | <b>13,83</b> |      |

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Legenda: CMLAPS242 = coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes; GFP22= transformante com *sgfp*; GFP15= transformante com *sgfp*; DSF= discos de ágar-água sem o fungo; EP= erro padrão da média



Figura 4 Teste de patogenicidade em plantas de soja: (A) formação do micélio e da lesão no caule da planta de soja, duas semanas após a inoculação; (B) transformantes contendo o gene *sgfp* (C); plantas inoculadas com discos de ágar-água (testemunha)

A incorporação, contudo, foi satisfatória. O fato de os transformados terem mantido as mesmas características do fungo não modificado geneticamente com o gene *sgfp* podendo, assim, ser utilizados para diversos estudos, tais como detalhes do processo de infecção, o modo exato de penetração, o crescimento do fungo dentro do tecido e a expressão de certos genes em diferentes estádios do processo de infecção, pode ser facilmente acompanhado usando isolados que expressam GFP (ABOUL-SOUD et al., 2003; DUMAS et al., 1999; MAOR; PUYESKY; SHARON, 1998).

Entretanto, trabalhos com fungos geneticamente modificados em Patologia de Sementes para elucidar os mecanismos de transmissão semente-planta são escassos.

Siqueira (2009) realizou a transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e testou a patogenicidade dos transformados em sementes de milho. O fungo manteve suas características morfológicas e infectividade, quando comparado aos isolados originais, sem transformação. Trabalho semelhante foi realizado por Pedrozo (2009), que obteve transformantes provenientes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* oriundos de sementes de algodão e verificou que não houve alteração na patogenicidade entre os isolados transformados em relação aos não transformados e verificou a presença do fungo quando foi inoculado nos tecidos internos de plantas de algodoeiro.

As análises de DNA por PCR confirmaram as observações realizadas em microscopia de epifluorescência, tanto para os isolados transformados como para o controle. A confirmação foi realizada por meio da utilização de *primers* específicos para o GFP. A amplificação de uma banda de 600 pb ocorreu apenas para os fungos transformados com o GFP, o que não foi observado no controle (Figura 5). Silva, Bolton e Nelson (2009), utilizando os mesmos pares de bases para a confirmação, obtiveram os mesmos resultados. Outros trabalhos relatam a

utilização de *primers* específicos na confirmação da transformação com GFP, após a transformação dos fungos (ABOUL-SOUD et al., 2004; BALINT-KURTI; MAY; CHURCHILL, 2000; DUMAS et al., 1999; FERNÁNDEZ-ÁBALOS et al., 1998; LEE; KIM; BREUIL, 2002; SILVA; BOLTON; NELSON, 2009).

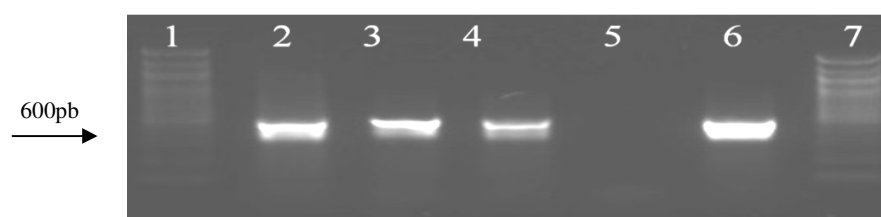


Figura 5 Análise eletroforética das bandas originadas da multiplicação do DNA plasmidial, sendo: 1 = marcador 100pb (Amresco); 2-4 = *Sclerotinia sclerotiorum* marcado com GFP; 5 = *Sclerotinia sclerotiorum* não transformada; 6 = plasmídeo; 7 = marcador 100pb (Amresco)

De posse do transformado de *S. sclerotiorum*, espera-se que a partir de agora, as pesquisas passem a gerar novos e importantes conhecimentos sobre a interação desse fungo com sementes de espécies hospedeiras e sua transmissibilidade via sementes. Estas informações são de grande valor no sentido de se estabelecer medidas mais eficazes de controle das doenças que o referido patógeno causa nas condições brasileiras e elucidar os processos de transmissão da semente para a planta de espécies hospedeiras desse patógeno.

## 6 CONCLUSÕES

A adequação do protocolo para a produção de protoplastos e a incorporação de genes codificadores de GFP em *S. sclerotiorum* foi eficiente e pode ser considerada satisfatória para estudos de interesse em Patologia de Sementes.

No processo de protoplastização de *S. sclerotiorum*, constatou-se que os estabilizadores salinos foram melhores do que os estabilizadores compostos de açúcares.

A transformação gênica do isolado de *S. sclerotiorum* não alterou as características originais do mesmo, no que tange à virulência e aos aspectos morfológicos considerados.

## REFERÊNCIAS

- ABOUL-SOUD, M. A. M. et al. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 158, n. 4, p. 1-8, Dec. 2003.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922 p.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interaction between Glycine max and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 8, p. 891-895, Aug. 2004.
- BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. L. Development of a transformation system for Mycosphaerella pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 9-15, Dec. 2001.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.
- BOLAND, G. J.; SMITH, E. A. Variation in cultural morphology and virulence among protoplast: regenerated isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 766-770, July 1991.
- CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.
- DIAS, E. S. et al. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 116-120, fev. 1997.
- DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.
- ELBOUAMI, F. Isolation and regeneration of protoplast from mycelium of *Fusarium solani*. **African Crop Science Journal**, Pretoria, v. 9, n. 2, p. 351-358, 2000.

FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J. M. et al. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 27, n. 1, p. 121-130, Jan. 1998.

KIM, B. K. et al. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. **Life Sciences**, Elmsford, v. 66, n. 14, p. 1359-1367, 2000.

LEE, S.; KIM, S. H.; BREUIL, C. The use green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 153-161, July 2002.

LILJEROTH, E.; JANSSON, H. B.; SCHAFFER, W. Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1484-1489, Dec. 1993.

LORANG, J. M. et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MAOR, R.; PUYESKY, B. A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycology Research**, New York, v. 102, n. 4, p. 491-496, Apr. 1998.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; BROMMONSCHEKEL, S. H. Obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 12, n. 4, p. 23-32, dez. 2006.

MARCHI, C. E. et al. Isolation and regeneration of *Magnaporthe grisea* protoplasts. **Summa Phytopathologica**, Saint Paul, v. 32, n. 3, p. 232-238, June 2005.

\_\_\_\_\_. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 3, p. 232-238, June 2006.

PEBERDY, J. F. et al. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 23-26, 1976.



PEDROZO, R. **Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum com os genes marcadores GFP E DsRed**. 2009. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PETZOLT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142-143, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 136 p.

SEH, M. L.; KENERLEY, C. M. Protoplast isolation and regeneration and nuclear staining of mycoparasitic *Gliocladium* species. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 121-130, July 1988.

SILVA, A. P. de; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 487-496, June 2009.

SINGH, S. O. Registration of white mold resistant dry bean germplasm line A 195. **Journal of Plant Registrations**, Madison, v. 1, p. 62-63, May/June 2007.

SIQUEIRA, C. S. **Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho**. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SPELLING, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular General Genetics**, New York, v. 252, n. 5, p. 503-509, Nov. 1996.

TOMBOLINI, R. et al. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 3674-3680, Nov. 1999.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O cultivo da soja no Brasil, ao longo dos últimos anos, embora venha apresentando um crescimento dos mais expressivos, com produções recordes alcançadas em sucessão, encontra-se, de certa forma, ameaçado em termos de sustentabilidade, pela ocorrência de algumas doenças. Entre elas o mofo-branco, causado por *S. sclerotiorum*, é o maior risco.

O principal fator atribuído ao aumento da incidência do mofo-branco em uma grande área de cultivo da soja no Brasil tem sido o uso de sementes contaminadas com escleródios deste fungo, sendo esse fato decorrente do uso de material sem a devida certificação, em outras palavras, sem o controle da qualidade sanitária de sementes, que é praticado em testes de sanidade em laboratório.

Com o uso intensivo do sistema de plantio direto, já por muitos anos, as chances de disseminação e estabelecimento do mofo-branco em áreas com plantio de soja são cada vez maiores, principalmente considerando-se que *S. sclerotiorum* é um fungo típico de solo, capaz de sobreviver na forma de escleródios por muitos anos. Pela falta de um programa adequado de rotação de culturas, voltado para o controle da referida doença, e pelo uso de lotes de sementes portadoras do patógeno em foco, as perspectivas do cultivo da soja e das demais espécies hospedeiras deste fungo, como feijão, algodão, girassol e inúmeras outras espécies de interesse agrônômico, tornam-se uma preocupação de dimensão incalculável. Atualmente estima-se que mais de 30% da área cultivada com soja em altitudes maiores esteja contaminada com a referida doença e isso se deu pelo acúmulo de inóculo do fungo ao longo dos anos.

Diante deste cenário, a necessidade de estudos sobre o mofo-branco em soja, de maneira mais integrada e em maior profundidade torna-se uma realidade que passa a constituir uma das mais importantes prioridades dos atuais

programas de apoio a pesquisa, a cargo dos órgãos de fomento à pesquisa tanto na esfera pública como pelo setor privado ligados ao agronegócio no país. A condução de projetos de pesquisa, sobre a referida doença, como foi a proposta nesta tese, teve, portanto o intuito principal de esclarecer algumas dúvidas sobre os verdadeiros mecanismos de transmissão do fungo em relação às sementes de soja, buscando também determinar as taxas de transmissão do patógeno por esta via, além de avaliar a aplicação de técnicas moleculares na detecção do fungo em sementes, tendo como alvo o desenvolvimento de protocolos que sejam adotados em programas de controle de qualidade sanitária de sementes de soja no Brasil.

Os estudos desenvolvidos sobre a transmissão de *S. sclerotiorum*, alvos do capítulo 3 desta tese, revelaram que este fungo pode ser veiculado pelas sementes na forma de micélio, sendo essa fonte das mais eficazes em disseminar e introduzir o inóculo do patógeno em ambientes nos quais os plantios de soja são realizados, além de seu efeito extremamente danoso ao desempenho de sementes a partir da semeadura. A premissa de que a doença é disseminada exclusivamente por escleródios do fungo em mistura com sementes em lotes comerciais, hipótese que tem sido defendida por inúmeros pesquisadores e produtores rurais, não tem sustentação, sendo este fato, possivelmente, uma das principais causas da surpreendente disseminação da doença nos últimos anos, no Brasil. A infecção de sementes pelo patógeno na forma de micélio, além do papel de disseminação de inóculo, é também uma causa da redução drástica da qualidade cultural das sementes, sob condições favoráveis à doença, sendo detectada uma grande influência sobre o estande e o vigor das plantas emergidas. Por meio de um modelo epidemiológico proposto para avaliar a taxa de transmissão do patógeno via sementes, foi possível, neste trabalho, verificar que o aumento da intensidade desta transmissão é proporcional ao aumento do potencial de inóculo do patógeno nas sementes infectadas. Por meio do referido

modelo, as relações entre *S. sclerotiorum* e sementes de soja puderam ser dimensionadas e, dependendo do potencial de inóculo do fungo presente nos tecidos das sementes, a transmissão do patógeno a progênie atinge níveis de 100%. Em alguns casos, a infecção pelo referido patógeno estabeleceu-se de forma assintomática, o que constitui uma informação das mais relevantes, do ponto de vista epidemiológico. A infecção da planta emergida, iniciada na haste, como o resultado da ação do inóculo presente nos cotilédones colonizados pelo fungo a partir das sementes, é mais um dos mecanismos, até então desconhecido, pelos quais a doença se estabelece a partir de sementes infectadas.

Por se tratar de um patógeno categorizado no Brasil como uma praga não quarentenária regulamentada (PNQR), a diagnose desse fungo em associação com sementes requer métodos de alta precisão e que sejam viáveis de adoção pelos programas de certificação de sementes no país. Neste trabalho, os resultados observados com o uso de técnicas moleculares, PCR convencional ou sua variação BIO-PCR, focados no capítulo 2, demonstraram que o uso de *primers* já conhecidos para *S. sclerotiorum* podem ser aplicados com segurança para a detecção do fungo em associação com sementes de soja. O protocolo estabelecido para este tipo de diagnose surge, portanto, como uma contribuição das mais importantes atualmente, uma vez que, após alguns aprimoramentos ainda requeridos, estas técnicas já poderão ser disponibilizadas aos setores produtivos e de controle de qualidade para soja no Brasil.

Por meio de análises ultraestruturais de sementes de soja inoculadas e não inoculadas com o fungo em questão, objeto do capítulo 4, foi possível verificar a proporcionalidade do efeito de *S. sclerotiorum* no desempenho das sementes de soja em função de seu potencial de inóculo, diferenciado por meio do método de inoculação de sementes, que é pautado no contato entre sementes e a colônia do fungo em substrato com condicionamento fisiológico, conforme já tem sido recomendado para outros patossistemas. Esta demonstração constitui

uma contribuição pioneira no âmbito das relações entre *S. sclerotiorum* e sementes de soja.

Alvo de uma atenção pontual no capítulo 5 desta tese, foi a adaptação de um protocolo de transformação de *S. sclerotiorum* por meio de marcadores GFP. Por esta tecnologia foi possível obter isolados deste fungo, portadores do gene em questão, o que representa mais um avanço importante para o melhor entendimento do processo de parasitismo do agente do mofo-branco partindo de seu acesso aos tecidos da semente. Apesar da instabilidade dos transformantes neste estudo, após sucessivas repicagens em condições de laboratório, percebeu-se que este recurso ainda é de grande utilidade para estudos sobre mecanismos de acesso do patógeno entre sementes e plantas e vice-versa.

De modo geral, os resultados deste trabalho propiciam bases adicionais importantes ao conhecimento atual disponível sobre a interação do agente causal do mofo-branco e sementes de soja, fazendo com que a elaboração de programas de controle desta doença seja fortalecida, principalmente pela diagnose preventiva de seu agente causal e pelo manejo sanitário das sementes.