



SUENY KELLY SANTOS DE FRANÇA

**QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO E VARIABILIDADE DE
Sclerotinia sclerotiorum EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

**LAVRAS/MG
2017**

SUENY KELLY SANTOS DE FRANÇA

**QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO E VARIABILIDADE DE
Sclerotinia sclerotiorum EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

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

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS/MG
2017**

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

França, Sueny Kelly Santos de.

Quantificação de inóculo e variabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e feijão / Sueny Kelly Santos de França. - 2017.

81 p. : il.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Coorientador(a): Carolina da Silva Siqueira.

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

Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Potencial de inóculo. 3. Patologia de sementes. I. Machado, José da Cruz. II. Siqueira, Carolina da Silva. III. Título.

SUENY KELLY SANTOS DE FRANÇA

**QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO E VARIABILIDADE DE
Sclerotinia sclerotiorum EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

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

APROVADA em 28 de Abril de 2017

Dra. Carolina da Silva Siqueira

Dra. Elaine Aparecida de Souza – UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA

Dr. Mario Sobral de Abreu – UFLA

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS/MG
2017**

A Deus,

Aos meus pais Cícero e Eliete

Ao meu irmão Wendel

Ao meu marido Rômulo

Todo amor e eterna gratidão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença viva e constante em minha vida, dando-me paz, sabedoria e discernimento nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, ao programa de pós-graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do doutorado.

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

Ao professor José da Cruz Machado pela oportunidade, orientação, amizade, ensinamentos transmitidos e confiança em meu trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em participar e contribuir para este trabalho, professor Renato Guimarães, professor Mario Sobral, professora Elaine Souza e Dra. Carolina Siqueira.

À equipe do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS), Ângela, Elenice, Poliana, Iara, Anny, Paulo, Rodrigo, Lucas, Pedro, Vanessa, Gabriel, Stélio e Bárbara por toda amizade, momentos de descontração e apoio nos trabalhos conduzidos.

Agradecimento especial à Carol, Marina, Yasmim, Thaissa, Stéfanny e Natália pela excelente convivência, amizade e ajuda. Minha eterna gratidão.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT), por todo aprendizado ao longo da gestão, pela experiência compartilhada e convivência maravilhosa.

À minha família por não medirem esforços para que eu pudesse realizar este sonho, sempre apoiando em todos os momentos.

RESUMO GERAL

O agente causal do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é considerado um dos patógenos mais importantes no mundo, distribuído em todas as regiões produtoras, sejam temperadas, subtropicais ou tropicais. Este pode causar doença em mais de 200 gêneros de plantas, incluindo 408 espécies de hospedeiros. O fungo pode ser transmitido pelas sementes por meio de micélio dormente ou através de escleródios misturados às sementes, estes são estruturas de resistência de difícil erradicação depois de introduzido em uma área. Este trabalho teve como objetivo avaliar a interação de *S. sclerotiorum* com sementes de soja e feijão em quatro diferentes potenciais de inóculo (P24 -24h, P48 -48h, P72-72h e P96-96h) e a sua qualidade por meio da germinação, vigor, sanidade, além de verificar a localização do patógeno e a quantificação do inóculo nas partes das sementes inoculadas artificialmente e avaliadas pela técnica de PCR em tempo real, validando o termo potencial de inóculo; e detectar e dimensionar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* procedentes de sementes de diferentes lotes de feijão e entre diferentes sementes provenientes de um mesmo lote oriundos de localidades do estado de Minas Gerais. Em relação à qualidade e os efeitos do fungo em sementes das espécies em estudo foram utilizados quatro potenciais de inóculo do patógeno nas duas culturas (soja e feijão), sendo avaliados: germinação, condutividade elétrica, incidência do fungo pelo método do neon, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final e matéria seca e análise molecular por meio do PCR em tempo real para sementes inteiras e dissecadas em tegumento e embrião. Pelos resultados observados, pôde-se constatar que houve correlação entre os potenciais de inóculo e as variáveis analisadas tanto para soja, quanto para feijão, pois no maior potencial (P96) foi possível observar danos mais severos nas sementes e conseqüentemente nas plantas emergidas. Já pelas análises de qPCR, observou-se que a concentração de DNA do fungo nas sementes foi crescente de acordo com o aumento do potencial de inóculo e localizado nas partes que compõem a semente. Com relação à variabilidade, 103 isolados de *S. sclerotiorum* coletados de sementes de feijão foram caracterizados por meio da coloração de colônia, produção de escleródios, índice de velocidade de crescimento micelial em meio neon (IVCMN), grupos de compatibilidade micelial (GCMs) e marcadores Rep-PCR (REP, ERIC e BOX). Os isolados de *S. sclerotiorum* avaliados apresentaram ampla variabilidade genética de acordo com as características avaliadas. A coloração de colônia adulta predominante entre os isolados foi bege, representando mais de 70% dos isolados. O IVCMN e a produção de escleródios tiveram crescimento máximo acima de 40 mm/dia e sua produção máxima de escleródios foi de 90,66 por placa. Pela análise de GCM, os isolados agruparam-se em nove clusters. Os primers REP, ERIC e BOX separaram as populações em seis clusters, cujos resultados da ANOVA confirmaram que a maior variabilidade de *S. sclerotiorum* encontrada foi dentro de lotes de sementes de feijão.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Potencial de inóculo. Patologia de sementes. Lotes de sementes. Variabilidade genética.

ABSTRACT

The causal agent of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) is considered one of the most important pathogens in the world, distributed in all producing regions, whether temperate, subtropical or tropical. This can cause disease in more than 200 plant genera, including 408 species of hosts. The pathogens can be transmitted through the seeds by means of dormant mycelium or through sclerotia mixed seeds, these are structures of resistance difficult to eradicate after being introduced into the area. The objective of this work was to evaluate the interaction of *S. sclerotiorum* with soybean and bean seeds in four different inoculum potentials (P24 -24h, P48-48h, P72-72h and P96-96h) and their quality by means of germination, vigor, sanity, besides verifying the location of the pathogen and the quantification of the inoculum in the parts of the seeds inoculated artificially and evaluated by the real time PCR technique, validating the term inoculum potential; and to detect and size the genetic variability of *S. sclerotiorum* isolates from different bean lots and from different seeds from the same lot from Minas Gerais state. In relation to the quality and effects of the fungus on seeds of the species under study, four potentials of pathogen inoculum in the two cultures (soybean and beans) were used, being evaluated: germination, electrical conductivity, fungus incidence by the neon method, (IVE), initial booth, final stand and dry matter, and molecular analysis by means of real-time PCR for whole seeds and dissected in integument and embryo. From the observed results, it was possible to verify that there was a correlation between the inoculum potencies and the variables analyzed for soybeans and beans, since in the higher potential (P96) it was possible to observe more severe damage in the seeds and consequently in the emerged plants. By the analysis of qPCR, it was observed that the DNA concentration of the fungus in the seeds was increasing according to the increase of inoculum potential and located in the parts that make up the seed. Regarding the variability, 103 isolates of *S. sclerotiorum* collected from bean seeds were characterized by colony staining, sclerotia production, mycelial growth rate index in neon medium (IVCMN), mycelial compatibility groups (GCMs) and Rep-PCR markers (REP, ERIC and BOX). The isolates of *S. sclerotiorum* evaluated showed broad genetic variability according to the evaluated characteristics. The predominant adult colony staining among the isolates was beige, representing more than 70% of the isolates. IVCMN and the production of sclerotia, had maximum growth above 40 mm/day and their maximum production of sclerotia was 90.66 per plaque. By GCM analysis, the isolates were grouped into nine clusters. The REP, ERIC and BOX primers separated the populations into six clusters whose AMOVA results confirmed that the greatest variability of *S. sclerotiorum* found was within bean seed lots.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Potential for inoculum. Pathology of seeds. Lots of seeds. Genetic variability.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
1.1 Importância da cultura da soja e do feijão.....	12
1.2 Importância econômica do mofo-branco.....	13
1.3 Aspectos etiológicos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14
1.4 Variabilidade de <i>S. sclerotiorum</i>	16
1.5 Testes para avaliar a interação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com sementes de plantas hospedeiras.....	18
REFERÊNCIAS.....	21
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	27
ARTIGO 1 - Validação Conceitual de Potencial de Inóculo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja e feijão.....	27
ARTIGO 2 - Variabilidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> entre e dentro de lotes de sementes de feijão avaliada por Rep-PCR.....	49
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	80

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

O sucesso de uma exploração agrícola depende de inúmeros fatores dentre os quais a qualidade de sementes é um dos principais. O perfil de qualidade de um lote de sementes é indicado por características fisiológicas e sanitárias em complemento à identidade ou pureza genética do material.

Entre os atributos indicadores da qualidade das sementes, o aspecto sanitário apresenta um peso especial e de grande complexidade por envolver uma interação entre agentes fitopatogênicos e as sementes. Dependendo do grau de interação, o sucesso do cultivo pode ser comprometido tanto do ponto de vista de perdas diretas no campo, como falha de estandes, formação de fontes iniciais de inóculo infeccioso e queda de produção, bem como danos indiretos na forma de disseminação de patógenos a curta e longa distâncias. No caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, que é o agente causal do mofo-branco em feijoeiro e soja, a importância é ainda mais relevante por ser este patógeno um organismo de solo que pode associar-se às sementes de forma eficaz e permanecer em áreas de cultivo por longos períodos de tempo.

Uma das preocupações atuais sobre a interação de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de feijão é o nível de variabilidade populacional do fungo e o seu grau de associação com as sementes infectadas. No primeiro caso, o conhecimento é de grande interesse e fundamental para formulação do manejo da doença. O conhecimento sobre o grau de associação do fungo com as sementes de feijão e soja é um aspecto pouco considerado na prática pelas dificuldades metodológicas para este tipo de investigação. O potencial de inóculo de agentes fitopatogênicos em lotes de sementes pode determinar o modelo epidemiológico da doença no campo de cultivo. Este estudo é importante também para o entendimento do papel do tratamento sanitário de sementes no controle da doença. (MACHADO, 2000).

É importante ressaltar que culturas como soja, que ocupa posição de destaque na economia mundial e a do feijão, que apresenta sua devida importância econômica, social e nutricional, estão predispostas a serem atacadas por *S. sclerotiorum*, interferindo no potencial produtivo das plantas e consequentemente produzindo sementes de má qualidade.

A doença mofo-branco está entre as principais que acometem a cultura da soja e do feijão no Brasil, causando prejuízos quase sempre irreparáveis. Este patógeno é classificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como uma praga não quarentenária regulamentada, com nível de tolerância zero em amostras de sementes. Estudos já realizados no Brasil têm indicado que o nível de incidência deste fungo em lotes de sementes é relativamente baixo, raramente ultrapassando 2%, o que faz com que os métodos de detecção do patógeno devam ser de alta sensibilidade, reproduzíveis e de baixo custo (PERES, 1996).

Com relação às características morfológicas de *S. sclerotiorum* admite-se que há pouca variação na população do fungo, pois nos testes de rotina, há certa facilidade na sua identificação (BOTELHO, 2011). No que se refere a sua variabilidade fisiológica e molecular, alguns estudos realizados com esta espécie coletada de regiões do estado de Minas Gerais, foi comprovada como relativamente elevada (ABREU; SOUZA, 2015; GOLDFARB et al., 2016). A ampla variabilidade de isolados de *S. sclerotiorum* em áreas de cultivo pode dificultar o manejo da doença, principalmente no que diz respeito a tratamento de sementes. Em estudos relacionados à variabilidade de patógenos, é importante levar em consideração que o elevado nível de variabilidade genética estimado em populações de *S. sclerotiorum* é algo característico da espécie, assim como, já relatada em populações estudadas em outras regiões do Brasil e de outros países com uso de marcadores moleculares (GOMES et al., 2011; SEXTON; HOWLLET, 2004).

A partir das informações já conhecidas sobre o patossistema: *S. sclerotiorum* - feijoeiro, estudos relacionados ao potencial de inóculo em sementes desta leguminosa e os seus efeitos sobre as plantas emergentes são necessários, assim como, o conhecimento sobre a real variabilidade de isolados do fungo dentro de um mesmo lote e entre lotes oriundos de diferentes regiões produtoras no estado de Minas Gerais.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Importância da cultura da soja e do feijão

Glycine max L. (Merrill), conhecida como soja, é um dos grãos mais importantes para a economia mundial, sendo os Estados Unidos seu maior produtor e na segunda posição o Brasil, com produção estimada na safra 2016/2017 acima de 105,56 milhões de toneladas, cujo aumento foi de 10,6% em relação à safra 2015/2016.

Dentre os principais Estados produtores de soja estão: Mato Grosso (26,03 mil t), Paraná (16,84 mil t), Rio Grande do Sul (16,20 mil t) e Goiás (10,24 mil t), com produção referente à safra 2015/2016 (BRASIL, 2017).

A soja é considerada uma das principais “commodities” agrícolas, por apresentar elevada importância econômica a nível mundial e nacional. A produção mundial de soja foi o equivalente a 312,362 milhões de toneladas, com área plantada de 119,732 milhões de hectares. O continente americano é responsável por cerca de 82% dessa produção, com destaque para os Estados Unidos, Brasil e Argentina, onde o Brasil contribuiu com 33,177 milhões de hectares de área plantada de soja na safra 2015/2016 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2016).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) também é uma cultura que ocupa posição de destaque no cenário agrícola, sendo cultivado em vários países ao redor do mundo, e o Brasil está entre os três países que mais produzem, com produção estimada na safra 2016/2017 de 3.276,7 milhões de toneladas e área plantada de 2.837,5 milhões de hectares. Os maiores Estados produtores são: Paraná (588,5 mil t), Minas Gerais (520 mil t), Goiás (284,4 mil t), Mato Grosso (234 mil t) e São Paulo (177,3 mil t) na safra 2015/2016 (BRASIL, 2017).

O feijão está entre os alimentos mais consumidos no mundo e também um dos mais ricos em nutrientes, sendo excelente fonte de proteína, ferro e carboidratos para a dieta humana, considerado base na alimentação dos brasileiros. O feijão apresenta pouca expressão no cenário mundial, pelo fato de que quase todos os países produtores também são consumidores, logo o excedente exportável se torna limitante.

A produção tanto de soja quanto de feijão pode ser afetada por uma série de fatores que podem comprometer seu rendimento, dentre estes, as doenças são as mais importantes e de difícil controle. Cada doença possui a sua importância econômica e esta varia com o passar dos anos, de região para região e de acordo com as condições de clima de cada safra.

A maioria dos patógenos utiliza as sementes como veículo de disseminação e por consequência, introdução de doenças em novas áreas e isso tem sido importante devido ao aumento de novas doenças no campo ou raças fisiológicas de patógenos. Para tanto, perante a extensão desse problema, o uso de sementes livres de patógenos se torna algo imprescindível.

Os patógenos podem se associar às sementes de diferentes formas, seja contaminando-as superficialmente, seja colonizando os tecidos internos. Os fungos são os microrganismos mais ativos, ao contaminar a superfície das sementes podem sofrer a ação de alguns fatores externos, diminuindo as probabilidades de sua transmissão à planta, ou através da penetração, se alojando diretamente nos tecidos vegetais e assim ser transportado. O inóculo pode ser transportado na forma de micélio e/ou esporos, salientando que a transmissão depende, dentre outros fatores, da quantidade e da localização do inóculo nas sementes (MACHADO, 1988; TANAKA; MACHADO, 1985).

Existem diversos patógenos disseminados por sementes, dentre eles destaca-se o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Este patógeno é o agente causal da doença conhecida como mofo branco. Esta doença pode ser transmitida quando associada às sementes na forma de micélio dormente ou acompanhando o lote através da presença de estruturas de resistência, chamadas escleródios (KAWASAKI; MACHADO, 2013). Steadmam (1983) constatou que o fungo é capaz de formar na semente mais de um escleródio e este produzir até 20 apotécios, que por sua vez consegue liberar 2.000.000 de ascósporos no ambiente por apotécio. Desta forma, pode-se considerar que a semente apresenta um grande potencial de inóculo e a detecção preventiva do patógeno *S. sclerotiorum* em lotes de sementes pode evitar a sua disseminação para novas áreas.

1.2 Importância econômica do mofo-branco

A doença conhecida como mofo branco tem como agente etiológico o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que é um fungo necrotrófico e polífago, pertencente ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia*. É um patógeno de importância mundial, por ocorrer tanto em regiões temperadas, subtropicais e tropicais, que infecta mais de 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O mofo branco tem ocasionado perdas significativas em inúmeras culturas agrícolas de importância econômica no mundo e é um dos principais problemas enfrentados pelos produtores tanto de soja quanto de feijão.

S. sclerotiorum foi descrito, pela primeira vez, por Bary, em 1884 (PURDY, 1979). No Brasil, o seu registro ocorreu primeiramente no ano de 1921, no Estado de São Paulo, na cultura da batata; em 1954 foi detectado na cultura do feijoeiro, no Estado do Rio Grande do Sul (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2004). A primeira evidência do fungo em soja foi em 1976 no Estado do Paraná e em 1983 em lavouras de feijão no Estado de Minas Gerais (HENNING, 2004). A partir de 2003, ocorreu uma grande expansão do mofo branco para as regiões do Centro-Oeste e do Nordeste (Bahia).

Estima-se que por volta de 23% de áreas cultivadas com soja no Brasil estariam infestadas com o patógeno, tornando-se uma das principais doenças da cultura, principalmente para os produtores de sementes (MEYER et al., 2016). Epidemias causadas pelo patógeno têm sido responsáveis pela diminuição da produção em vários países, com perdas de até 100% na produção em condições favoráveis à doença (SILVA et al., 2008). O fungo se prolifera fácil e rapidamente nos campos, pois libera esporos e possui estruturas de sobrevivência denominada de escleródios de difícil controle.

Muitos produtores brasileiros tiveram suas lavouras atingidas pela referida doença e isto tem custado a eles um pesado ônus tanto do ponto de vista econômico pelas perdas diretas da produção como pelo aspecto de sustentabilidade da atividade agrícola nas regiões onde a doença já foi introduzida. 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, encontravam-se comprometidas com a referida doença. Kerr, Steadman e Nelson (1978) observaram que o número de sementes/planta é o componente de rendimento mais afetado, seguido do peso de grãos ou semente.

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 também pela sua persistência em cultivos subsequentes, a partir da produção de escleródios.

1.3 Aspectos etiológicos de *Sclerotinia sclerotiorum*

O mofo- branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é uma doença altamente destrutiva. O fungo produz micélio hialino, septado e bastante ramificado, formando assim, uma massa cotonosa na superfície dos órgãos atacados (PURDY, 1979). A partir deste micélio, ocorre a formação de um agregado de hifas com a parte externa de coloração preta e com várias camadas de melanina denominado escleródios. Estes são formados tanto na superfície, como no interior da haste e vagens infectadas (ALMEIDA et al., 2005). Os escleródios desempenham um papel importante no ciclo da doença, mantendo o inóculo por um longo tempo e também atua na proteção do fungo em condições adversas.

Os escleródios são estruturas de sobrevivência que apresentam dormência e são resistentes à dessecação (STEADMAN, 1983). Estes podem germinar tanto de forma miceliogênica, quanto na forma carpogênica, podendo formar um ou mais apotécios em condições favoráveis. Os apotécios produzidos a partir dos escleródios são corpos de frutificação, de tamanho reduzido, possuem hastes finas, terminando em taças de 5-15 mm de diâmetro. O apotécio contém os ascos com ascósporos, em média oito ascósporos em cada asca, que por sua vez, são liberados e levados pelo vento até atingirem um hospedeiro adequado. Os ascósporos então germinam e invadem os tecidos do hospedeiro através de micélio, causando a infecção (PEREIRA et al., 2013).

Com relação ao ciclo da doença, sabe-se que o fungo apresenta ciclo de vida monocíclico, visto que, os escleródios que se formam nas plantas durante o cultivo não germinam e não liberam ascósporos para novas infecções no mesmo ciclo da cultura (REIS et al., 2011).

S. sclerotiorum é capaz de causar infecções em quase todos os tipos de tecidos da planta, sendo que, o período crítico da doença vai do florescimento até a formação e o enchimento das vagens (BOLAND; HALL, 1994). Sua sintomatologia manifesta-se a partir do desenvolvimento de micélio na superfície dos tecidos infectados. Os sinais e os sintomas desta doença 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 e podem permanecer no solo e/ou em partes de plantas mortas até as próximas safras (AGRIOS, 2005; GRABICOSKI, 2012). 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 processo de colonização dos tecidos pelas hifas do fungo se dá pela secreção do ácido oxálico e de outras enzimas, tendo este ácido a função de suprimir a explosão oxidativa, que é necessária para várias respostas de defesa pós-induzidas, desativando um dos mecanismos mais importantes de resistência de plantas a patógenos (CESSNA, 2000).

Inúmeros trabalhos trazem referências sobre condições favoráveis para o mofo-branco, sendo destacadas temperaturas amenas, rotação de culturas com espécies altamente suscetíveis, cultivos irrigados, período de molhamento foliar prolongado e uso de sementes contaminadas, sendo esta a forma mais eficaz de entrada de inóculo no campo (JULIATTI; JULIATTI, 2010; MEYER; CAMPOS, 2009). Botelho (2011) demonstrou que a transmissão de *S. sclerotiorum* em soja pode ocorrer a partir das sementes contaminadas/infectadas para a planta mesmo em baixos potenciais de inóculo. Os ascósporos de *S. sclerotiorum* também podem ser disseminados pelo vento e estes podem alcançar distâncias de até 100 metros da fonte (STEADMAN, 1983).

Meyer e Campos (2009) e Ximenes (2013) constataram que uma pequena quantidade de inóculo do fungo no campo pode comprometer uma lavoura no mesmo ano agrícola e nos anos subsequentes, devido à ampla gama de hospedeiros e à formação de escleródios pelo fungo no campo.

A forma mais eficaz de se evitar a entrada do patógeno em uma área seria o uso de sementes livres de *S. sclerotiorum*. As medidas atuais de controle do mofo-branco ainda são consideradas pouco eficazes, e isto faz com que esquema de manejo integrado seja a alternativa para conter a ação drástica desta doença. A aplicação de fungicidas no campo de cultivo é uma das poucas medidas disponíveis de controle da doença, tendo em vista que o uso de material resistente ainda é um fator limitante para o sucesso na erradicação de *S. sclerotiorum* das áreas de produção.

1.4 Variabilidade de *S. sclerotiorum*

O estudo da variabilidade das populações de fitopatógenos é considerado importante para o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas (MCDONALD; LINDE, 2002).

Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do microrganismo às condições adversas. O conhecimento da variabilidade entre e dentro de populações é um componente importante na compreensão do sucesso evolutivo do patógeno (MCDONALD; WONG; WHITE, 2000).

Estudos envolvendo populações de *S. sclerotiorum* revelaram um modo de reprodução predominantemente clonal deste fungo (CUBETA et al., 1997; KOHLI et al., 1995), com algumas evidências de reprodução cruzada colaborando de tal modo para a estrutura da população em algumas regiões (ATALLAH et al., 2004; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O fungo possui uma fase somática haplóide, em que a clonalidade é o resultado tanto da reprodução assexuada por meio de escleródios, quanto por reprodução sexuada através da autofertilização (KOHN, 1995), com a expectativa de que a variação intraclonal é devido à mutação (CARBONE; ANDERSON; KOHN, 1999). Algumas evidências de variação genética de *S. sclerotiorum*, genotípica e fenotípica têm variado, dependendo da localização geográfica e da cultura hospedeira na qual os isolados são coletados.

A variabilidade genética de *S. sclerotiorum* tem sido constantemente avaliada através de interação de compatibilidade micelial e marcadores moleculares, (MEINHARDT et al., 2002). Estas técnicas têm sido comumente utilizadas para caracterizar a diversidade genotípica em populações (ATALLAH et al., 2004; LITHOLDO JÚNIOR et al., 2011). A classificação dos isolados através de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) é comumente utilizada como um rápido marcador genotípico entre as populações de *S. sclerotiorum*. Os grupos formados são determinados com base na capacidade de anastomose de hifas entre diferentes isolados quando combinados em cultura, isolados que apresentam incompatibilidade produzem uma barreira de células mortas entre si, deixando uma linha de reação, que é macroscopicamente visível (SCHAFER; KOHN, 2006).

Grupos de compatibilidade micelial podem ser vistos como uma evidência indireta da diversidade genética nas populações, esta técnica tem sido utilizada para determinar a variabilidade em isolados de *S. sclerotiorum* em soja, feijoeiro, alface, canola, couve-flor, repolho, no Brasil, Estados Unidos, China, Irã, Nova Zelândia, Austrália (ATTANAYAKE et al., 2013; CARPENTER; FRAMPTON; STEWART, 1999; CUBETA et al., 1997; KARIMI; SAFAIE; SHAMS-BAKSH, 2011; KOGA et al., 2014; LEHNER et al., 2015; ZANCAN et al., 2015).

Lehner et al. (2015) observaram 14 GCMs, em 118 isolados oriundos de campos de feijão das regiões Norte, Sul, Noroeste, Zona da Mata e Alto Paranaíba do Estado de Minas Gerais. Através da associação de GCM e marcadores SSR na população de *S. sclerotiorum* confirmou-se que esta é predominantemente clonal. Kull et al. (2004), em Illinois (Estados Unidos), verificaram 42 GCMs em 299 isolados provenientes de campos de soja na Argentina e dois isolados de Illinois. A maioria dos GCMs foi representada por um único isolado, observado em um mesmo local de coleta. Em estudos conduzidos por Karimi, Safaie e Shams-Bakhsh (2011) focando diversidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de canola, por meio de GCM e Rep-PCR (Reação em cadeia da polimerase baseada em sequência repetitiva), constatou-se a existência de 38 GCM entre 68 isolados coletados, além da elevada variação genética e a alta eficácia da Rep-PCR na identificação da diversidade entre populações *S. sclerotiorum*.

A técnica de Rep-PCR que é uma variação da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem sido utilizada com frequência na identificação de fitobactérias, sendo, porém, utilizada com sucesso em muitos estudos voltados para a diferenciação de isolados fúngicos quanto a sua diversidade genética (KARIMI; SAFAIE; SHAMS-BAKHS, 2011; RADEMAKER; BRUIJN, 1997; RAI et al., 2016; VERSALOVIC et al., 1994). As famílias das sequências de DNA repetitivas, denominadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), possuem de 35 a 40 pb, sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) que varia de 124 a 127 pb e o elemento BOX de 154 pb, estão dispersas em posições intergênicas distintas no interior do genoma de diversas espécies bacterianas (VERSALOVIC et al., 1994).

Embora os primers Rep-PCR tenham sido concebidos para elementos repetitivos em genomas procarióticos, os iniciadores BOX, ERIC e REP mostraram amplificar alguns genomas fúngicos com sucesso, como também têm sido utilizados para caracterizar a variabilidade a níveis inter e/ou intraespecíficos de vários fungos (ARRUDA et al., 2003; MCDONALD; WONG; WHITE, 2000; MEHTA; MEHTA; ROSATO, 2002).

1.5 Testes para avaliar a interação de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de plantas hospedeiras

A detecção e diagnose precisa de patógenos em sementes e em 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, responsável pela validação dos testes de sementes, e em sua maioria consistem em estimular os microrganismos a produzir estruturas ou metabólitos que permitam a sua identificação indireta (ISTA, 2017).

S. sclerotiorum é um fungo de difícil erradicação depois de introduzido na área de cultivo, desta forma, a detecção preventiva nas sementes constitui-se uma das medidas mais econômicas e importantes para se evitar a introdução do patógeno em novas áreas e a sua disseminação em lavouras comerciais (GOMES et al., 2011).

Há diferentes métodos de detecção do patógeno nas sementes, com variações na sensibilidade, na repetibilidade, na economia e na rapidez para a obtenção de resultados. Dentre estes métodos destacam-se: inspeção visual da amostra de sementes, a incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”), a incubação em rolo de papel e em meio semi-seletivo ágar azul de bromofenol (Neon), considerado um meio semi-seletivo para detecção de *S. sclerotiorum*, e mais recentemente as técnicas moleculares (BRASIL, 2009; MACHADO, 2002; NASSER; ARANCIBIA; NAPOLEÃO, 1999).

A detecção de *S. sclerotiorum* pode depender do nível de infecção do patógeno na semente. Quando a semente é infectada artificialmente em laboratório, o fungo é facilmente detectado por testes de sanidade. Henneberg et al. (2012), ao avaliar sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*, verificaram a formação de escleródios em poucos dias e os métodos tradicionalmente recomendados não conseguiram detectar de forma consistente a presença do patógeno em sementes provenientes de áreas no campo com incidência conhecida da doença. A semente pode estar infectada naturalmente pelo patógeno, porém, apresentar baixo nível de infecção, o que possivelmente dificultaria a detecção e faria com que esses talvez não expressassem a realidade do campo.

Estudos com base nas técnicas moleculares para algumas espécies já estão em fase avançada, todavia, a disponibilização desses métodos para constatar a detecção ainda é um fator limitante enfrentado nas análises de rotina, devido à interferência de alguns elementos celulares presentes nas sementes nas reações que constituem os protocolos desenvolvidos para essas espécies alvos das pesquisas (BRASIL, 2009).

Nenhum método molecular é utilizado oficialmente para detecção de fungos fitopatogênicos em sementes, tendo-se como argumento o fato de que os protocolos já desenvolvidos até o momento ainda requerem estudos adicionais para sua aplicação na prática (BRASIL, 2009). Para a detecção especificamente em sementes, é necessário que, independente do método adotado, os marcadores moleculares 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).

Os métodos moleculares, com base na técnica de PCR convencional e/ou quantitativa, têm sido investigados com o intuito de detectar diferentes patógenos em sementes, cujas propriedades morfológicas são muito próximas e por ser uma técnica que apresenta rapidez e eficiência, como já relatada em alguns patossistemas como *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas (GUILLEMETTE; IACOMI-VASILESCU; SIMONEAU, 2004), *Stenocarpella maidys* e *Stenocarpella macrospora* em sementes milho (SIQUEIRA et al., 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (BOTELHO et al., 2015), *Corynespora cassiicola* em sementes soja (SOUSA; SIQUEIRA; MACHADO, 2016).

Apesar dos avanços já alcançados no conhecimento sobre a biologia e identificação de *S. sclerotiorum* em diversas culturas, 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.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 6879-6896, Feb. 2015.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 2005. 922 p.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 61, p. 569-588.
- ARRUDA, M. C. C. de et al. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, Sutton Bonington, v. 52, n. 2, p. 236-244, Apr. 2003.
- ATALLAH, Z. et al. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 2, p. 737-742, Apr. 2004.
- ATTANAYAKE, R. N. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 7, p. 750-761, July 2013.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants of hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Salinas, EUA, v. 16, n. 2, p. 93-108, Jan. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-16, Feb. 2006.
- BOTELHO, L. D. S. et al. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 55-62, Jan./Mar. 2015.
- BOTELHO, L. S. **Deteção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 157 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**. Quinto levantamento. Monitoramento agrícola – Safra 2016/17. Fevereiro 2017. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_09_09_00_14_boletim_graos_fevereiro_2017.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365 p.

CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P. **Manejo do mofo-branco na cultura da soja**. Rondonópolis, 2009. Disponível em: <<http://www.fundacaomt.com.br/eventos/download.php>>. Acesso em: 26 fev. 2017.

CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, Lancaster, v. 53, n. 1, p. 11-21, Feb. 1999.

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-CNPAC. Documentos, 50).

CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 27, n. 1, p. 13-21, Mar. 1999.

CESSNA, S. G. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, Waterbury, v. 12, n. 11, p. 2191-2199, Sept. 2000.

CUBETA, M. A. et al. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 10, p. 1000-1004, Oct. 1997.

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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja: Paraná 2005, sistema de produção**. Londrina, 2004. 224 p.

GOLDFARB, M. et al. Technique IRAP (inter retrotransposon amplified polymorphism) to study the genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 357-360, Aug. 2016.

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, v. 159, n. 2, p. 94-99, Feb. 2011.

GRABICOSKI, E. M. G. **Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e detecção em sementes de soja**. 138 f. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

GUILLEMETTE, T.; IACOMI-VASILESCU, B.; SIMONEAU, P. Conventional 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.

HENNEBERG, L. et al. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 61-69, ago. 2012.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 52 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **International Rules Seed Testing**, Zurich, v. 2017, n. 1, p. 7-1; p. 7-5, Jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.15258/istarules.2017.07>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. A. **Podridão branca da haste da soja**: manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia: Composer, 2010. 35 p.

KARIMI, E.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKHS, M. Assessment of genetic diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* populations in canola fields by rep-PCR. **Trakia Journal of Science**, Stara Zagora, v. 9, n. 2, p. 62-68, June 2011.

KAWASAKI, V. H.; MACHADO, J. C. Establishment of a semi-selective method for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean and soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 435-442, Jan. 2013.

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.

KOGA, L. J. et al. Compatibilidade micelial e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* do Brasil e dos Estados Unidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 265-272, abr. 2014.

KOHN, L. M. The clonal dynamic in wild and agricultural plant pathogen populations. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1231-1240, Mar. 1995. Supplement 1.

KULL, L. S. et al. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 4, p. 325-332, Apr. 2004.

LEHNER, M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais state, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 64, n. 4, p. 921-931, Aug. 2015.

LITHOLDO JÚNIOR, C. G. et al. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 868-877, May 2011.

MACHADO, A. Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

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

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 3, p. 349-379, Sept. 2002.

MCDONALD, J. G.; WONG, E.; WHITE, G. P. Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1121-1125, Oct. 2000.

MEHTA, A.; MEHTA, Y. R.; ROSATO, Y. B. ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n. 5, p. 323-328, Aug. 2002.

MEINHARDT, L. W. et al. "Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil." **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 211-215, Jan. 2002.

MEYER, M.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 11, n. 120, p. 16-18, set. 2009.

MEYER, M. C. et al. (Ed.). **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja – safras 2012 a 2015**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368).

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, n. 5, p. 309-311, jun. 1999.

PEREIRA, F. de S. et al. Estratégia de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1354-1371, dez. 2013.

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

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 4, p. 875-880, June 1979.

RADEMAKER, J. L.; BRUIJN, F. J. de. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANE-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA makers**: protocols, applications and overviews. New York: J. Wiley, 1997. chap. 4, p. 151-171.

RAI, S. et al. Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. **SpringerPlus**, Gewerbestrasse, v. 5, n. 1, p. 1-16, Nov. 2016.

REIS, E. M. et al. Ciclo do mofo branco. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 122, p. 24-27, mar./abr. 2011.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, New York, v. 46, n. 6, p. 357- 365, Nov. 2004.

SILVA, G. C. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 29-34, ago. 2008.

SIQUEIRA, C. D. S. et al. Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 79-86, Nov. 2014.

SOUSA, M. V.; SIQUEIRA, C. da S.; MACHADO, J. da C. Uso potencial de PCR convencional para a detecção de *Corynespora cassiicola* em sementes de soja. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 85-91, jun. 2016.

SCHAFER, M. R.; KOHN, L. M. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 98, n. 4, p. 593-597, July 2006.

STEADMAN, J. R. White mold: a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, n. 4, p. 346-350, May 1983.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 40-46, set. 1985.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, Jan. 1994.

XIMENES, L. R. **Importância e manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo Branco) nos cultivos de feijão e soja**. 2013. 59 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ZANCAN, W. L. A. et al. Genetic and aggressiveness variation among *Sclerotinia sclerotiorum* dry bean isolates from Brazil fields. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 4, p. 1143-1151, Oct. 2015.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS

ARTIGO 1

**Quantificação e Validação Conceitual de Potencial de Inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*
em sementes de soja e feijão**

Preparado em acordo com Bioscience Journal (Versão preliminar)

França, S. K. S.¹; Siqueira, C. S.¹; Guimarães, M. R. F.¹; Machado, J. C.¹

¹ Universidade Federal de Lavras/ UFLA - Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil.

Resumo

O mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, encontra-se disseminado em todo o mundo sendo uma das principais doenças da soja e feijão no Brasil, onde causa danos severos e constitui uma ameaça para o cultivo continuado destas espécies onde ela é introduzida. O fungo *S. sclerotiorum* é disseminado pelas sementes de soja e feijão tanto na forma de escleródios como na forma de micélio no interior das sementes utilizadas para plantio. O objetivo neste trabalho foi avaliar a relação entre diferentes potenciais de *S. sclerotiorum* nas sementes de soja e feijão e o desempenho de sementes representadas por germinação, vigor e sanidade, bem como verificar a localização e quantificação do inóculo do referido patógeno nas sementes inoculadas artificialmente pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), validando o termo potencial de inóculo através deste ensaio. Sementes de soja e feijão foram inoculadas com o fungo pelo método do condicionamento osmótico baseado na exposição das sementes ao fungo pelos períodos de 24h, 48h, 72h, e 96h. A análise molecular foi realizada por meio de qPCR em sementes inteiras e dissecadas em: tegumento, cotilédone e eixo embrionário. Os resultados demonstraram que os efeitos de *S. sclerotiorum* na qualidade das sementes, germinação e vigor, foram progressivos e proporcionais aos aumentos dos potenciais de inóculo utilizados neste estudo. O inóculo do patógeno foi encontrado em todas as partes das sementes avaliadas evidenciando a elevada capacidade parasitária deste patógeno e comprovando a eficácia da técnica de inoculação das sementes pelo condicionamento fisiológico.

Palavras chaves: sanidade de sementes, localização, tempo de exposição, qualidade de sementes, detecção molecular.

Abstract

The white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, is widespread throughout the world being one of the main diseases of soybeans and beans in Brazil, where it causes severe damages and poses a threat to the continued cultivation of these species where It is introduced. The fungus *S. sclerotiorum* is disseminated by soybean and bean seeds both in the form of sclerotia and in the form of mycelium inside the seeds used for planting. The objective of this work was to evaluate the relationship between different potentials of *S. sclerotiorum* in soybean and bean seeds and the performance of seeds represented by germination, vigor and sanity, as well as to verify the localization and quantification of the inoculum of the pathogen in the seeds inoculated artificially by Real-time PCR technique (qPCR), validating the term inoculum potential through this assay. Soybean and bean seeds were inoculated with the fungus by the osmotic conditioning method based on the exposure of the seeds to the fungus for periods of 24h, 48h, 72h, and 96h. Molecular analysis was carried out by means of qPCR in whole seeds and dissected in: integument, cotyledon and embryonic axis. The results showed that the effects of *S. sclerotiorum* on seed quality, germination and vigor were progressive and proportional to increases in inoculum potentials used in this study. The inoculum of the pathogen was found in all parts of the evaluated seeds evidencing the high parasitic capacity of this pathogen and proving the effectiveness of the inoculation technique of the seeds by the physiological conditioning.

Keywords: seed health, location, exposure time, seed quality, molecular detection.

Introdução

O mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em diversas espécies de plantas cultivadas, encontra-se disseminado em todo o mundo e é considerado uma das doenças mais importantes no Brasil, onde causa danos severos e quase sempre irreversíveis em regiões onde encontra condições favoráveis de clima e outros fatores. A doença é encontrada em grande parte das lavouras de soja e feijão nas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste (CAMPOS et al., 2012).

Além de sua natureza devastadora *S. sclerotiorum* é um fungo que se associa às sementes de seus hospedeiros na forma de escleródios ou como micélio no interior das sementes infectadas. Nesta condição, alguns estudos têm demonstrado a transmissão do patógeno pelas sementes de soja e feijão, sendo as taxas de transmissão variáveis em função de fatores como temperatura, potencial de inóculo, genótipos dentre outros (BOTELHO, 2011; ZANCAN et al. 2015). Na literatura, cerca de 400 espécies de plantas de importância econômica, dentre estas, a soja (*Glycine max*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris*), são citadas como hospedeiros de *S. sclerotiorum* o que significa um risco dos mais sérios do ponto de vista de segurança de alimentos para as populações que dependem do cultivo das plantas hospedeiras (FAO, 2016).

Em razão de sua natureza epidemiológica e dos avanços desta doença nas principais regiões agrícolas do Brasil, o referido patógeno tem sido categorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como uma praga não quarentenária regulamentada junto aos programas de certificação de sementes de soja, feijão, algodão e girassol (BRASIL, 2009), sendo proposto o padrão zero de tolerância deste patógeno em amostras de sementes destas culturas (MACHADO; POZZA, 2005).

É de grande importância em sanidade de sementes, o conhecimento do grau de associação de patógenos com sementes, pois isto possibilita estimar o modelo epidemiológico de desenvolvimento das doenças em ambientes de cultivo, além de proporcionar bases para desenvolvimento de métodos de detecção dos patógenos em sementes e formular estratégias de manejo por meio de tratamentos de sementes com produtos sanitários diversos (SCHUSTER e COYNE 1974; COLHOUN, 1983). Para alguns outros patossistemas, tem sido demonstrado que a localização do inóculo de patógenos nas diferentes partes das sementes pode gerar consequências diversas, algumas desastrosas do ponto de vista epidemiológico, como queda no rendimento, principalmente quando coloniza seu embrião,

reduções na porcentagem de germinação e no vigor, e isto consequentemente causando reflexos negativos sobre a aprovação dos lotes (MACHADO, 1988; NEERGAARD, 1979; DUTTA et al 2016).

Diante da escassez de informações na literatura sobre os eventos que envolvem a interação de *S. sclerotiorum* com espécies de hospedeiras, como a soja e feijão, é que se propôs este estudo, pelos quais foram levados em consideração alguns fatores como potencial de inóculo do fungo das sementes e seus efeitos na qualidade de sementes, sendo selecionadas as variáveis germinação, índice de velocidade de emergência, vigor e sanidade das sementes em condições de laboratório. Neste estudo também foi avaliado o nível de interação por meio da técnica molecular, PCR em tempo real, que tem se mostrado mais eficaz e precisa para estimar o grau de associação entre organismos.

Material e Métodos

Origem, manutenção do isolado fúngico e perfil das sementes

Foi utilizado neste estudo um isolado de *S. sclerotiorum* virulento, selecionado com base em testes de patogenicidade realizados em estudos anteriores, identificado como CMLAPS 242. O fungo foi armazenado em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e mantido na micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

As sementes de soja da cultivar M7110 IPRO e sementes de feijão da cultivar Pérola utilizadas neste ensaio não apresentaram indicações da presença de *S. sclerotiorum* conforme resultados de teste de sanidade. Para as sementes de feijão, foram detectados *Penicillium* sp. com incidência de 21% e 5,5% de *Aspegillus* spp. e para sementes de soja, observou-se inicialmente a incidência de 17,25% de *Aspergillus* spp., 5% de *Penicillium* sp. e 1,25% de *Cladosporium* sp. Os índices de germinação foram de 91% para soja e 89% para o feijão.

Multiplicação do isolado e inoculação das sementes de soja e feijão

O isolado fúngico de *S. sclerotiorum* foi multiplicado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) com o soluto manitol, ajustado para o potencial hídrico de - 1,0 MPa de acordo com o software MPPS (MICHEL, RADCLIFFE, 1995). Após o processo de autoclavagem, o meio foi vertido em placas de Petri de 15 cm acrescidos de 5 discos de

micélio de 5 mm de diâmetro, repicados de colônia fúngica pura, sendo mantida em BOD com fotoperíodo de 12h a temperatura de incubação 20 ± 2 °C por 7 dias. A partir do crescimento dos isolados nas placas, algumas destas foram separadas para inoculação das sementes e o restante para posterior extração de DNA.

As sementes de soja e feijão utilizadas foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, em seguida lavadas em água destilada e colocadas para secar em papel germitest por 48h em temperatura ambiente. Após esse período, as sementes foram colocadas de maneira uniforme sobre as colônias fúngicas e mantidas em contato por diferentes períodos de tempo: 24h, 48h, 72h, 96h para ambas as culturas, correspondendo estes períodos aos potenciais de inóculo de P24, P48, P72 e P96.

A incubação ocorreu em uma câmara BOD com temperatura de 20 ± 2 °C e 12h de fotoperíodo. Para os tratamentos de controle, as sementes de soja e feijão foram colocadas em diferentes períodos de tempo conforme mencionado para inoculação, na qual as mesmas foram colocadas em placas de Petri contendo apenas o meio de BDA com o soluto manitol para a avaliação do possível efeito da restrição de água na qualidade fisiológica das sementes de soja e feijão. Após a inoculação referente a cada período de incubação, as sementes foram retiradas e secas por 48 horas, em seguida mantidas em câmara de armazenamento (15 °C e 50 % de UR) até sua utilização.

Avaliação dos efeitos na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja e feijão inoculadas artificialmente com *S. sclerotiorum* e não inoculadas

Teste de Germinação em laboratório: foi feito através do método do rolo de papel Germitest, com três unidades de papéis com dimensão 38 x 28 cm, previamente esterilizado para cada tratamento. Em seguida, foi adicionada água destilada e esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Foi realizado o exame laboratorial com 200 sementes de soja e 200 sementes de feijão inoculadas e não inoculadas, distribuídas em 4 rolos com 50 sementes cada um, incubadas em germinador a 25°C, por um período de 7 dias, sob condições de 100% de umidade relativa, em regime de escuro contínuo. As avaliações foram realizadas por meio da observação visual de plântulas normais no quinto e oitavo dia para soja e feijão conforme RAS (Regras para análise de sementes).

Teste de Sanidade de sementes: Para este teste, foi seguida a metodologia utilizada por Kawasaki & Machado (2013), pela qual foram colocadas aleatoriamente, 25 sementes em cada uma de 8 placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio neon (39g de BDA, 150mg/l de Azul de bromofenol, 50g de cloranfenicol, 70,1g de manitol, pH a 4,7) totalizando 200 sementes para cada tratamento. As placas foram incubadas a 20 °C no escuro e as leituras realizadas com cinco a oito dias após o início da incubação. A determinação do número de sementes com *S. sclerotiorum* contaminadas na amostra foi considerada a partir formação de micélio e escleródios característicos e de halo amarelo em torno da semente com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Condutividade Elétrica: Foram utilizadas 200 sementes, divididas em 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento, as sementes foram previamente pesadas e inseridas em copos plásticos de 300mL. Em seguida, foram adicionados 75 mL de água deionizada em cada copo e estes mantido por 24h em BOD no escuro a 25 °C. Após esse período, a condutividade elétrica da solução foi medida por meio de leituras com o auxílio de um condutivímetro de marca MS TECNOPON e os resultados expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de sementes (KRZYZANOWSKI et al., 1999).

Emergência em substrato de solo: Para a avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), estande inicial, estande final e peso de matéria seca de plantas emergidas, foram semeadas 200 sementes de cada cultura, inoculadas e não inoculadas por tratamento em copos de plástico de 200 ml, distribuídas de forma individual em bandejas contendo areia, solo e substrato comercial PLANTIMAX®, na proporção de 1:1:1, sendo dispostos num total de 25 copos por bandeja, sendo que cada uma correspondente a uma repetição com delineamento em bloco ao acaso. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento vegetal, com temperatura ajustada em 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h. Foram realizadas contagens diárias da emergência das plantas a partir da primeira emergência de plântula até a estabilização do estande, por doze dias consecutivos. Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento até 28 dias após a semeadura. O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962). Os estandes inicial e final foram avaliados aos 5 e 25 dias após a semeadura, a qual foram transformados

em porcentagem. O peso de matéria seca foi feito aos 30 dias após a semeadura, através da pesagem de todas as plantas emergidas por repetição, sendo que, antes as mesmas foram cortadas 2cm acima do solo, na região do colo e colocadas em estufa com fluxo de ar forçado, à temperatura de 50 °C. Após 144 horas, o material foi pesado em balança semi-analítica e os resultados expressos em gramas.

Quantificação e localização de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e feijão com avaliação pela técnica de PCR tempo real (qPCR)

Extração de DNA: foi realizada a partir de cultura pura de *Sclerotinia sclerotiorum* crescida por sete dias em meio de cultura BDA com manitol. Após esse período, foi feita a raspagem do micélio produzido, lavado com água esterelizada, seco e macerado em almofariz com nitrogênio líquido até adquirir consistência de um pó fino, em seguida colocados em microtubos.

Para a extração do DNA a partir das sementes inteiras inoculadas, foram utilizadas 400 sementes, moídas separadamente em moinho A11 Basic IKA, contendo nitrogênio líquido. Para a dissecação das sementes, foram utilizadas 40 sementes por tratamento, estas foram mantidas em câmara úmida por 18h, após esse período foram colocadas sobre um papel toalha e com a ajuda de um bisturi o tegumento foi assepticamente seccionado e removido, possibilitando a separação do embrião. As partes separadas dos tecidos da semente (tegumento e embrião) foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até atingir a consistência de um pó fino, em seguida, sub-amostras de 40 mg do pó de cada tecido foram utilizadas para a extração de DNA utilizando Kit Wizard® Genomic DNA Purification conforme recomendações do fabricante (Promega).

Quantificação de *S. sclerotiorum* em tecidos de sementes por PCR tempo real

Cada amostra de DNA foi testada em duplicata com um volume de reação de 25 µL por amostra utilizando o Kit PCR SYBR Green (Qiagen). Para cada reação foi adicionada 12,5 µL de SYBR Green, 1,56 µL de cada primer proposto por Freeman et al. (2002), 2 µL do DNA molde (50 ng). No processo de amplificação, foi utilizada a temperatura de 95 °C por 10 minutos com um total de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, empregando

a técnica denominada de “touchdown” nas temperaturas de anelamento que consiste em reduzir de forma decrescente 1 °C a cada ciclo de 72 °C a 65 °C por 1 minuto, extensão de 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 10 minutos (FREEMAN et al., 2002).

Foram considerados os valores em nanogramas de DNA expressos através do Ct (Cycle Threshold) para cada reação, este por sua vez consiste no ponto que detecta o ciclo em que a reação atingiu o seu limiar da fase exponencial, então, neste ponto é possível observar a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Como controle positivo, foi utilizado o DNA puro do fungo alvo, em que foi estabelecida uma curva padrão com cinco pontos de 100 ng μL^{-1} a 0,01 ng μL^{-1} e como controle negativo água ultrapura estéril. Os valores de Ct foram determinados usando o Rotor-Gene (Corbett) software versão 1.7.75.

A curva padrão foi calculada com base em duas réplicas para cada nível de diluição de DNA. Os resultados de qPCR foram baseados nas diluições seriadas do DNA de *S. sclerotiorum*, os quais mostraram que a amplificação com os iniciadores ocorreu até a concentração de 10 pg de DNA do fungo com um valor de Ct correspondente de 16,08 (Figura 1). A eficiência relativa foi de 1,13 determinada pela equação de regressão linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,934, portanto, este foi determinado através da equação $Y = -3,038X + 15,53$.

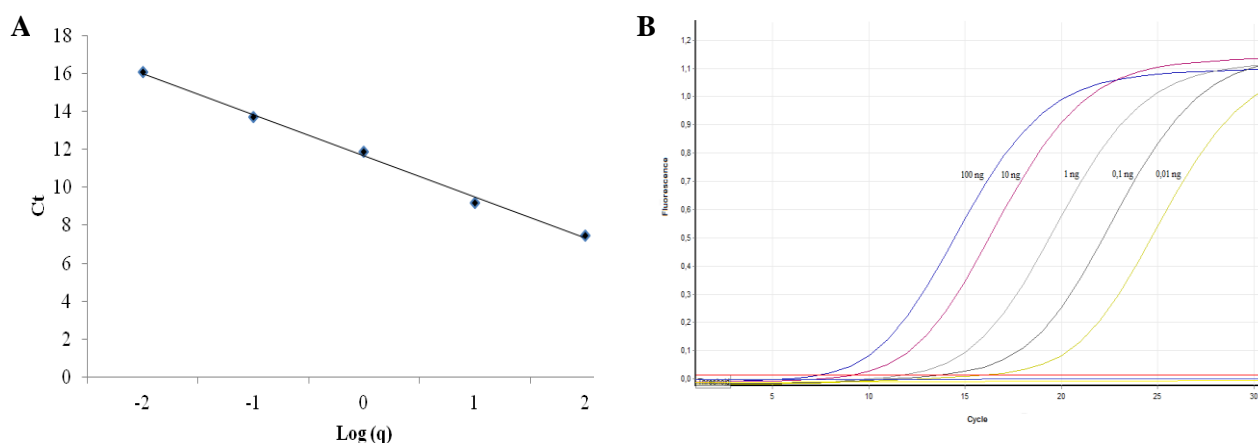


Figura 1. Curva padrão (A) e curva de amplificação (B) com diluição seriada do DNA de *Sclerotinia sclerotiorum*. Ciclos threshold (Ct) foram representados graficamente em função do log da diluição e em função da fluorescência respectivamente. O DNA do patógeno foi diluído com concentrações de 100 ng μL^{-1} a 0,01 ng μL^{-1} .

Os experimentos foram realizados de forma simultânea, cada um correspondeu a um delineamento inteiramente casualizado, sendo duas culturas (soja e feijão) e quatro potenciais de inóculo mais o controle sem inoculação, totalizando duas repetições para cada tratamento.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados de qualidade e sanidade de sementes, foi utilizado o programa SISVAR® VERSÃO 5.3 (FERREIRA, 2003). O delineamento foi inteiramente casualizado e as médias entre os tratamentos foram comparadas por regressão.

Resultados

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

Os diferentes potenciais de inóculo do fungo *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão proporcionaram diferenças significativas para os parâmetros avaliados. Com base nos resultados deste ensaio verificou-se que *S. sclerotiorum*, foi capaz de causar reduções drásticas na germinação e vigor em função dos diferentes potenciais de inóculo utilizados.

No teste de germinação para as sementes de soja, ocorreu uma redução de 15,5% em P24 e valores bem próximos foram observados em P48, com redução de 17,5% em relação a P0. Nos potenciais mais elevados, P72 e P96, a germinação foi reduzida em 55,5% e 67,5% respectivamente (Figura 2A). Já para as sementes de feijão, a redução foi de 8% em P24 e de 11% em P48. Nos potenciais P72 e P96 os valores de germinação foram semelhantes, apresentando reduções de 16% e 19% (Figura 2B).

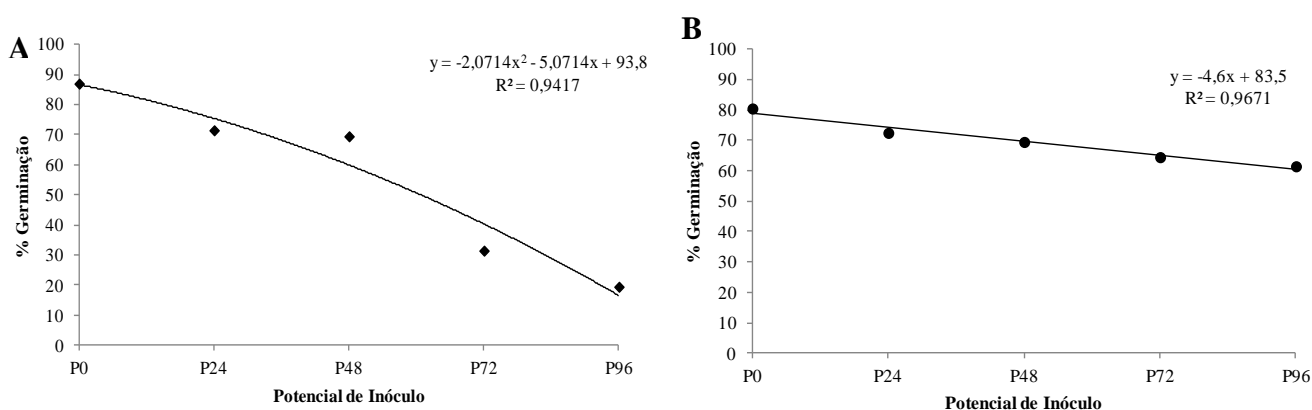


Figura 2. Porcentagem de germinação de sementes de soja (A) e feijão (B) em função do potencial de inóculo (P0 - sem fungo; P24 - 24h; P48 - 48h; P72- 72h e P96- 96h) de *Sclerotinia*³⁶ *sclerotiorum*.

Com relação ao teste de vigor, baseado na condutividade elétrica, pôde-se notar que houve um aumento proporcional dos valores desta variável à medida que se aumentava o potencial de inóculo, tanto para sementes de soja quanto para feijão (Figura 3A e 3B).

Estes resultados mostraram que os menores valores de vigor das sementes para soja e feijão inoculados foram observados no potencial de inóculo P24, no qual as diferentes espécies de sementes apresentam médias de 94,4 e 86,4 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto que no potencial P96 as médias foram 134,97 e 94,93 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Nas sementes inoculadas de feijão, a condutividade foi semelhante em P48 e P72 da ordem de 92,7 e 92,8 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. (Figura 3B).

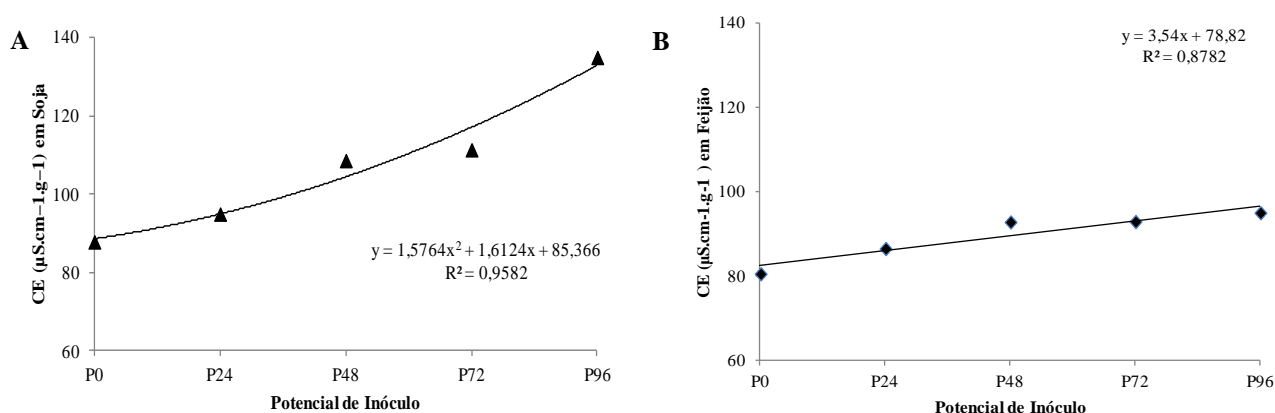


Figura 3. Condutividade elétrica de sementes de soja (A) e Feijão (B) inoculados com *Sclerotinia sclerotiorum* em função do potencial de inóculo (P0 - sem fungo; P24 - 24h; P48 - 48h; P72- 72h e P96- 96h)

A incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão quando incubadas em meio semi seletivo (Neon) foi crescente com o aumento do tempo de contato das sementes com o fungo (potencial de inóculo).

Para as sementes de soja, no P24 o percentual de incidência do patógeno nas sementes foi de 40,5%; nos potenciais de P48, P72 e P96 os percentuais foram de 69%, 80% e 82%, respectivamente (Figura 4A). Para as sementes de feijão, ocorreu a mesma tendência, em que a incidência no potencial de P72 foi de 36,5% e em P96 foi de 38,75%, valores superiores ao observado em P24 com 27,2% (Figura 4B).

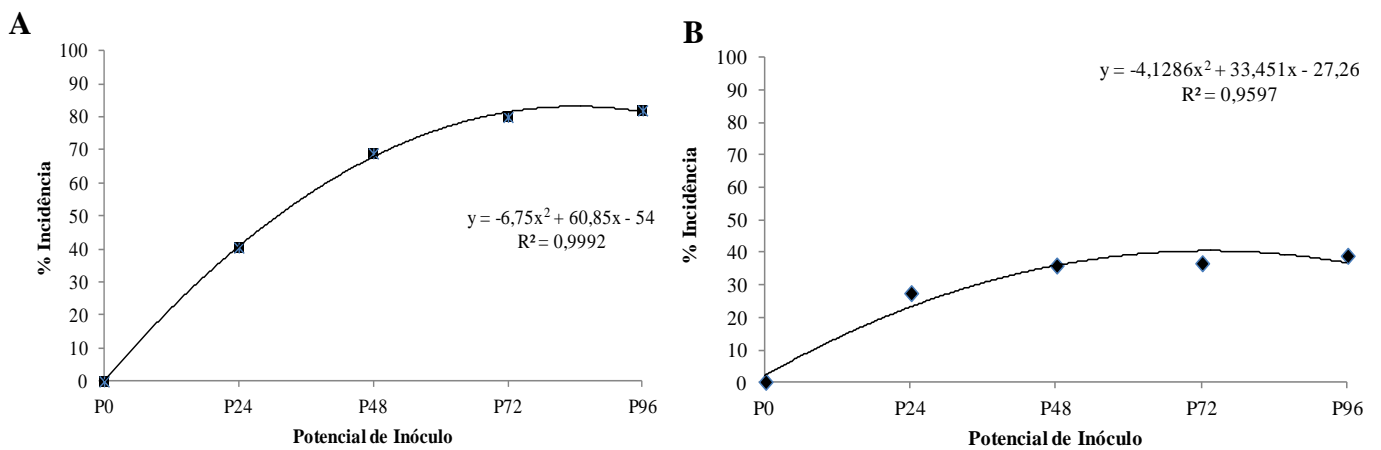


Figura 4. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (A) e Feijão (B) sob meio semi seletivo Neon em função do potencial de inóculo (P0 - sem fungo; P24 - 24h; P48 - 48h; P72- 72h e P96- 96h).

O índice de velocidade de emergência foi reduzindo à medida que o potencial de inóculo aumentava para soja e feijão, com exceção do potencial P48 em feijão, que obteve média superior ao P24, porém não diferindo estatisticamente. Os maiores índices observados em plântulas de soja a partir de sementes inoculadas foram no P24 com 2,08, enquanto que para plântulas de feijão foi no P48 com 2,4, porém não diferenciou estatisticamente de P24 (Figura 5A e 5B). Já os menores índices foram constatados no maior potencial de inóculo (P96) tanto para as plântulas de soja quanto para as de feijão com 1,61 e 0,23 respectivamente. Estes valores correspondem a uma redução do índice de velocidade de emergência de aproximadamente 55% e 91% para as culturas correspondentes.

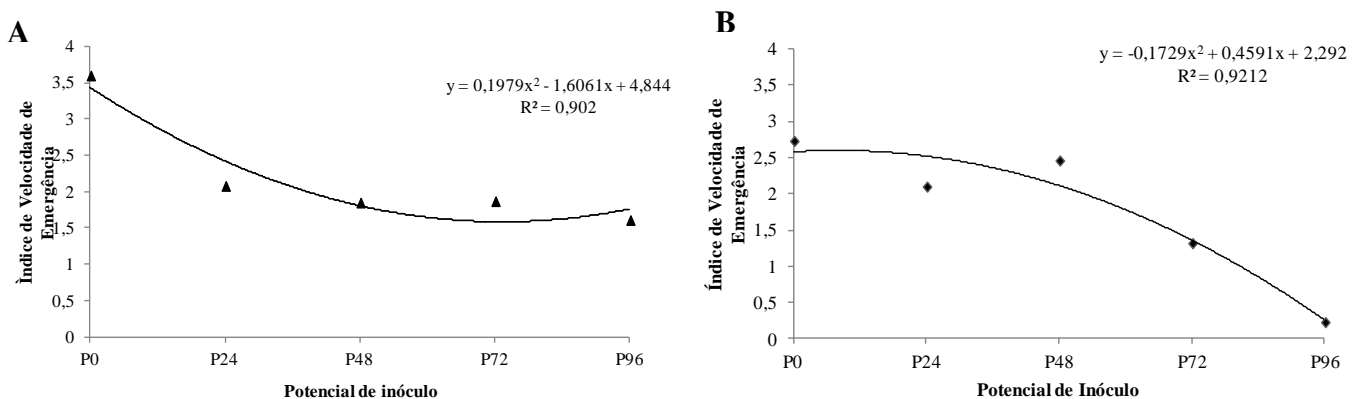


Figura 5. Índice de Velocidade de Emergência de soja (A) e Feijão (B) inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em função do potencial de inóculo (P0 - sem fungo; P24 - 24h; P48 - 48h; P72- 72h e P96- 96h).

Pelas análises do estande inicial, final e peso matéria seca, pôde-se observar que a diminuição dessas variáveis seguiu uma tendência de redução do valor à medida que se aumentava o tempo de contato do patógeno com as sementes tanto de soja quanto para feijão.

No estande inicial verificou-se que nas sementes inoculadas, no menor potencial de inóculo em soja e feijão, a maior emergência de plantas foi em média de 17,5%, e menores níveis de emergência ocorreu nos maiores potenciais (P96) com 7,5% e 4,5% respectivamente (Figura 6A e 6B). No estande final, ocorreu de forma semelhante, os efeitos causados pelos diferentes potenciais de inóculo ao estande inicial. Nos resultados obtidos em soja, constatou-se maior estande de plantas emergidas aos 28 dias em P24 com 28%, com redução de 8,2%, já a menor emergência em P96 apresentou 17,5%, o que representa uma diminuição de 42,6% em relação a P0. Em plantas de feijão, o maior estande observado foi parecido com o de soja, representado pelo P24 com 26% de emergência, este valor corresponde a uma queda de 30,6% e a menor emergência foi em P96 com 3,5% com redução drástica na emergência de 90,6% (Figura 6C e 6D).

Ao avaliar o efeito dos potenciais de inóculo sobre a matéria seca das plantas inoculadas, constatou-se que seguiu a mesma tendência das demais variáveis, em que os tratamentos que tiveram menor potencial de inóculo (P24) para a cultura da soja e do feijão, apresentaram média de 10,9g e 9,6g com diminuição de 28,81 a 37,3% respectivamente. Enquanto que a no P96, média observada foi de 1,03 g e 5,06 g reduzindo 93,3% e 67,16% (Figura 6E e 6F).

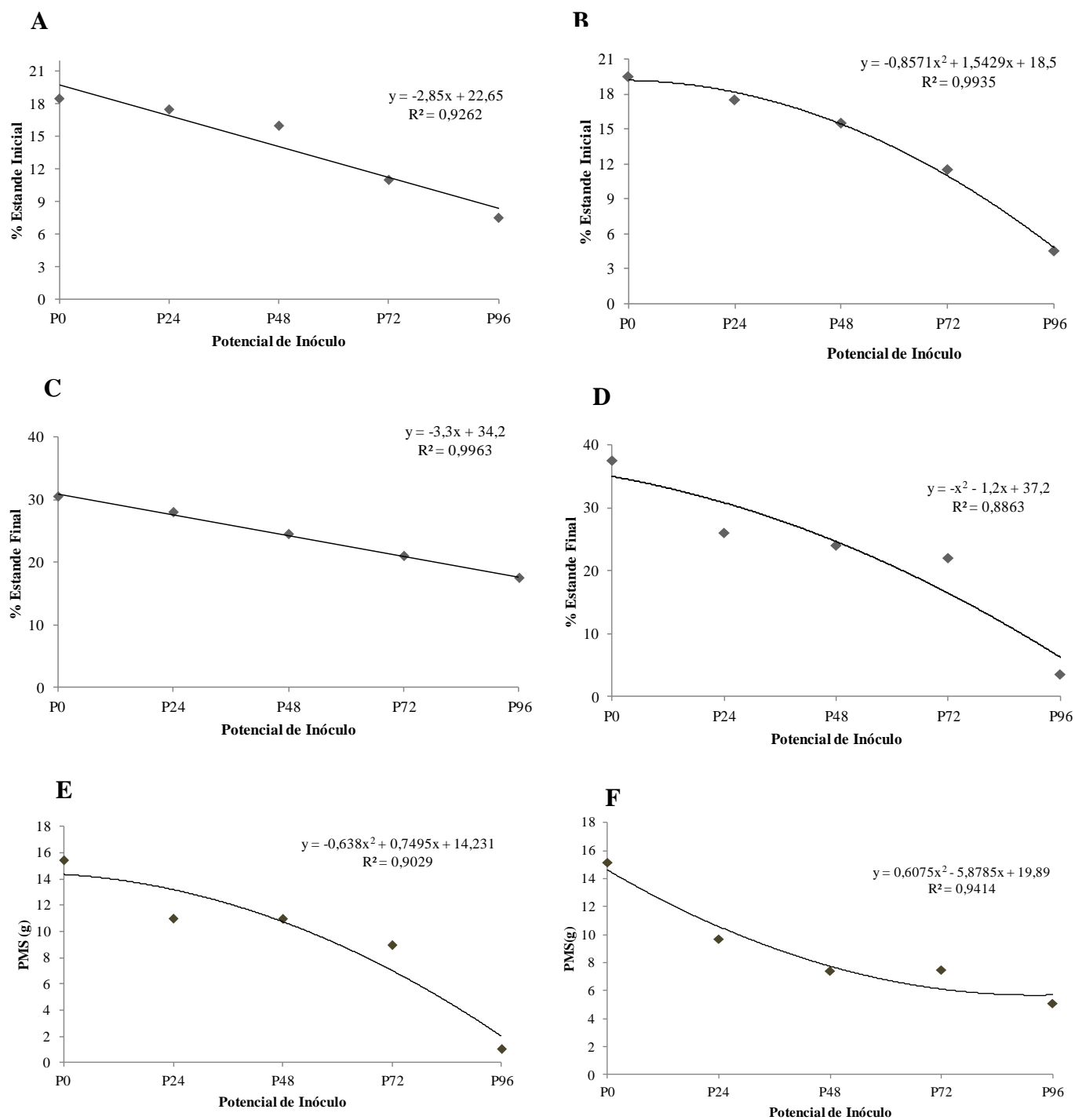


Figura 6. Estande inicial (A e B), estande final (C e D) e matéria seca (E e F) de plantas de soja e feijão respectivamente, oriundas de sementes inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes potenciais de inóculo (P0 – sem fungo, P24 -24h, P48-48h, P72-72h, P96-96h).

Pelas análises de qPCR, foi possível observar a presença do patógeno associado a todas as partes das sementes que foram inoculadas pela técnica de condicionamento fisiológico, demonstrando que mesmo as partes mais internas, como o embrião, podem abrigar o micélio do fungo (Tabela 1).

Para as sementes íntegras, ocorreu uma variação da concentração de DNA, de $3,40 \times 10^{-3}$ (P24) a $0,17 \times 10$ (P96) nanograma (ng) para soja e de $2,30 \times 10^{-3}$ (P24) a $2,60 \times 10^{-2}$ (P96) para as sementes de feijão à medida que se aumentava o potencial de inóculo (Tabela 1). Para as sementes de soja e feijão dissecadas, foi possível constatar que os valores da concentração de DNA para o tegumento em todos os potenciais foi elevado, em relação aos valores da concentração de DNA encontrado no embrião, na qual variou no tegumento de $6,80 \times 10^{-4}$ (P24) a $1,06 \times 10$ (P96) em soja e de $2,87 \times 10^{-3}$ (P24) a $2,20 \times 10^{-2}$ (P96) no feijão. É possível observar que a quantidade de DNA presente nas sementes de feijão é inferior a encontrada nas sementes de soja.

Tabela 1. Valores médios da concentração de DNA (ng/ μ L) detectados por PCR tempo real em sementes inteiras e dissecadas de soja e feijão em cada potencial de inóculo (P24 – 24h; P48 – 48h; P72- 72h e P96- 96h) UFLA, Lavras, MG, 2017.

Estrutura	Soja			
	P24	P48	P72	P96
Semente Inteira	$3,40 \times 10^{-3}$	$6,40 \times 10^{-3}$	$8,40 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10$
Tegumento	$6,80 \times 10^{-4}$	$2,24 \times 10^{-2}$	$0,15 \times 10$	$1,06 \times 10$
Embrião	$5,70 \times 10^{-7}$	$7,60 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-1}$	$4,04 \times 10^{-1}$
Feijão				
Semente inteira	$2,30 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$
Tegumento	$2,87 \times 10^{-3}$	$5,92 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-2}$	$2,20 \times 10^{-2}$
Embrião	$3,44 \times 10^{-6}$	$1,81 \times 10^{-4}$	$4,66 \times 10^{-4}$	$9,77 \times 10^{-4}$

Discussão

Pelos fundamentos de patologia de sementes, diversos fatores podem interferir no grau de interação entre patógenos e sementes de espécies hospedeiras. Pelos atuais testes de sanidade de sementes, os resultados quase sempre indicam apenas a incidência dos patógenos nas amostras analisadas, pouco informando sobre a intensidade ou potencial de inóculo dos patógenos presentes nas sementes hospedeiras. Desta forma, os resultados neste trabalho deixam claro que o potencial de inóculo de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão é um aspecto de extrema importância tendo-se como base os seus efeitos negativos observados na germinação, sanidade, matéria seca, vigor por meio da condutividade, IVE e estandes.

Importante salientar que a interação entre *S. sclerotiorum* e sementes de soja e feijão produziu efeitos diferenciados entre estes dois patossistemas. Nota-se que, embora o tempo de exposição das sementes das duas espécies ao fungo em foco tenham sido os mesmos, os valores de germinação, estande inicial, estande final, matéria seca e vigor das sementes e a incidência do patógeno nas sementes foram consistentemente variados, tendo havido efeitos mais severos em sementes de soja, enquanto que, para o índice de velocidade de emergência esses efeitos foram mais evidentes em sementes de feijão. Do ponto de vista epidemiológico, a interpretação desta constatação requer ainda mais aprofundamento antes de conclusões mais concretas neste sentido. Peres (1996) verificou que sementes de feijão em contato com colônia de *S. sclerotiorum* por um período de 30h apresentaram eficiência de zero a 31%, avaliadas pelo método do papel de filtro, enquanto que para sementes de soja essa eficiência variou de 35 a 100%. Estudos mais detalhados sobre possíveis componentes adversos a *S. sclerotiorum* nas sementes de feijão, em comparação com sementes de soja, além de outros fatores que podem interferir nesta relação se fazem necessários.

Os resultados deste estudo corroboram com os resultados encontrados em estudos nesta mesma linha de pesquisa para outros patossistemas como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão e *Stenocarpella maydis* em milho; *S. sclerotiorum* em algodão, girassol (COSTA et al., 2003; BOTELHO et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2014, ZANCAN et al., 2015). É importante salientar que esta tendência entre resultados observados em diferentes patossistemas se deve provavelmente ao uso de um mesmo modelo padronizado de abordagem deste tipo de pesquisa, pelos quais aspectos como temperatura, níveis de potencial de inóculo, genótipos do hospedeiro e dos patógenos e outros fatores favoráveis ao desenvolvimento das doenças em condições controladas, são utilizados.

Chama atenção também neste estudo, os resultados do teste de vigor, observados pela aplicação do método de condutividade elétrica, uma vez que os valores desta variável entre os potenciais de inóculo mais baixos não se correlacionaram proporcionalmente com os valores observados para germinação nestes mesmos níveis de potencial de inóculo. Verifica-se que no potencial de inóculo P48 as reduções do poder germinativo das sementes já eram acentuados o que não foi verificado para vigor pelo método utilizado neste trabalho. Presume-se que outros mecanismos, além da interferência do patógeno nas membranas protetoras das sementes, devem ter atuado para proporcionar os valores altos de germinação e IVE no potencial P48 em relação ao potencial P24 (KRZYZANOWKI et al., 1999). É importante salientar que nos potenciais de inóculo mais baixos, pelo teste de condutividade elétrica, o fungo não causou maiores injúrias nas membranas das sementes inoculadas.

De modo geral, sabe-se que por pesquisas realizadas com sementes de várias espécies tem sido demonstrado que o decréscimo na germinação e no vigor é diretamente proporcional ao aumento da lixiviação de solutos, indicando que a condutividade elétrica é um método eficiente para a avaliação do vigor (MENEZES et al., 2010; BOTELHO, 2011; SIQUEIRA, 2013).

Outro aspecto interessante que pode ser observado nos resultados deste estudo é que as sementes de soja e feijão inoculadas, quando submetidas à restrição hídrica em meio semi seletivo (Neon), apresentaram aumentos progressivos da incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes, com aumento dos potenciais de inóculo nos dois patossistemas avaliados. Neste caso, os valores de incidência do fungo nas sementes avaliadas por este método foi proporcionalmente mais elevados em sementes de soja do que em sementes de feijão. Estes resultados ratificam os resultados observados por Botelho (2011), Henneberg et al., (2012), Siqueira (2013) e Kawasaki et al., (2013).

Em alguns estudos realizados com outros patossistemas, foi possível observar reduções do IVE, estande inicial, estande final e matéria seca das plantas, pois os resultados obtidos neste estudo foram consistentes com outros trabalhos desenvolvidos (BOTELHO, 2013; SIQUEIRA, 2013; ARAÚJO, 2006; ZANCAN, 2013). Nestas variáveis, os resultados foram inversamente proporcionais aos potenciais de inóculo colocados sob os diferentes tempos de contato com as sementes, pois ficou evidente que o potencial inóculo do patógeno quando está em associação com as sementes, por meio do micélio dormente, pode ocasionar danos afetando o desempenho destas em campo.

Em relação às análises de qPCR realizadas em todos os tratamentos, observou-se que a presença de *S. sclerotiorum* nas sementes íntegras de soja e feijão e em suas respectivas estruturas, foram detectadas mesmo no seu menor potencial de inóculo, apresentando uma concentração de DNA crescente nas partes das sementes avaliadas, em que o tegumento obteve maior quantidade de DNA que o embrião quando comparadas. Deve-se neste caso, considerar que o tegumento por ocupar a parte mais externa das sementes, pode-se estabelecer o primeiro contato com o patógeno, no qual, o tegumento pode ser colonizado de forma mais rápida que no embrião das sementes e neste a colonização de seus tecidos podem ser parciais, que por sua vez pode levar a um menor valor da concentração de DNA, avaliada pela qPCR. Por outro lado não se pode descartar a interferência de outros fatores, que possam também explicar os menores valores relativos de DNA no embrião de sementes inoculadas no presente trabalho. De qualquer forma estes resultados referentes a análise molecular expressão a elevada sensibilidade da técnica de qPCR utilizada neste trabalho.

Segundo Bolland e Hall (1988), todas as partes das sementes podem ser colonizadas por *S. sclerotiorum*, pois o fungo é capaz de atingir as vagens das sementes em formação causando destruição da maioria. A presença do micélio de *S. sclerotiorum* infectando internamente sementes, também tem sido relatada por outros autores, que por sua vez concluíram que a semente como portadora do fungo pode originar inóculo para infectar plantas e elevar a quantidade de escleródios presentes no solo para as posteriores estações do ano ou na mesma estação de cultivo. (YANG et al., 1998).

A aplicação da técnica de qPCR neste estudo deixa evidente que a interação de *S. sclerotiorum* com as sementes de soja e feijão implica no processo infeccioso, que é caracterizado pela associação do inóculo do patógeno com tecidos vivos do hospedeiro. Percebe-se que com o aumento do potencial de inóculo houve detecção de DNA em quantidades crescentes no embrião, tendo isto reflexos na qualidade das sementes na forma de redução do poder germinativo, vigor e estandes. Nos potenciais de inóculo mais elevados houve uma nítida relação inversa dos valores de germinação, vigor e estandes com valores de sanidade e concentração de DNA de *S. sclerotiorum* nas sementes inoculadas.

Conclusões

O conceito de potencial de inóculo aplicado nos patossistemas envolvendo *S. sclerotiorum* e sementes de soja e feijão pode ser validado com base nos efeitos avaliados nas sementes inoculadas, tendo se como parâmetros germinação, vigor das sementes (condutividade elétrica e IVE), estande inicial e final, peso de matéria seca e a concentração de DNA nos tecidos das sementes avaliadas pela técnica de qPCR.

A atuação de *S. sclerotiorum* em associação com as sementes de soja e feijão infectadas artificialmente afeta de forma drástica e progressiva o desempenho das sementes de soja e feijão, proporcional aos potenciais de inóculo utilizados neste estudo em ambas as culturas, porém sendo este efeito mais evidente nas sementes de soja.

É possível afirmar pelos testes de sanidade (Neon), germinação em rolo de papel e molecular (qPCR), ficou claro que *S. sclerotiorum* é capaz de penetrar as sementes de soja e feijão e colonizar todas as partes componentes das sementes como tegumento e embrião.

Referências

- ARAÚJO, D. V., POZZA, E. A., MACHADO, J. C., ZAMBENEDETTI, E. B., CELANO, F. A., CARVALHO, E. M., & CAMARGOS, V. N. (2006). Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides. *Fitopatologia Brasileira*, 31(1), 035-040.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. *Phytopathology*, v. 78, n. 9, p. 1241-1245, 1988.
- BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E.N. (2013) Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Seed Science*. v.35, n.2, p.153-160.
- BOTELHO, L. S. (2011) Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Lavras: UFLA, 2011. 157f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS.
- CAMPOS, E. D.; SILVA, L. H. C.; SILVA, J. (2012) Avanço branco. *Cultivar: Grandes culturas*, Pelotas, n. 153, p. 14-17.
- COLHOUN, J. (1983) Measurement of inoculum per seed and its relation to disease expression. *Seed Sci. Technol.* 11 , 665-671.
- COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. *Ciência e Agrotecnologia*, vol.27, no.5, p.1023-1030.

DUTTA, B.; SCHINEIDER, R. W.; ROBERTSON, C. L.; WALCOTT, R. R. (2016) Embryo Localization Enhances the Survival of *Acidovorax citrulli* in Watermelon Seeds. *Phytopatology*. V. 12: p. 1-9.

FAO, 2016. Faostat Database Collections <<http://apps.fao.org/page/collections>>.

FERREIRA, D. F. (2003) Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.0 (Build 67). Lavras: DEX/UFLA.

FREEMAN, J.; WARD, E.; CALDERON, C.; MCCARTNEY, A. (2002) A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 877-886.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. DE S.; PANOBIANCO, M. (2012) Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. *Pesq. agropec. bras.* vol.47 no.6 Brasília.

KAWASAKI, V. H.; MACHADO, J. C. (2013) Establishment of a semi-selective method for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean and soybean seeds. *Journal of Seed Science*, v. 35, p. 435-442.

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

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.

MACHADO, J. C. (1988) *Patologia de sementes : fundamentos e aplicações*. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988.

MENEZES, V. O. ; PEDROSO, D. C.; PIVETA, G.; MUNIZ, M.; MENEZES, N. L.; GARCIA, DANTON C.; ETHUR, L. Z. ; SANTOS, R.; TUNES, L. M. (2011) Detecção e

Influência de *Fusarium* spp. na Qualidade Fisiológica de Sementes de Pepino.. Ciência Rural (UFSM. Impresso) , v. 41, p. 193-199.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A (1985) Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, v. 87, n. 1, p. 131-136.

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

SIQUEIRA, C. S. (2013) Transmissão e desempenho de sementes de milho portadoras do complexo *Stenocarpella* sob condições controladas. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

PERES, A. P. Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.)MerriI): Desenvolvimento de metodologias. Lavras: UFLA, 1996.51p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

SIQUEIRA, C. S.; BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; SILVA, U. A.; DIAS, I. E. (2014) Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn, *Journal of Seed Science*, v.36, n.1, p.079-086.

SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. (1974) Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.12, p.199-221.

YANG, X. B.; WORKNEH, F.; LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. *Plant Disease*, v. 82, n. 2, p. 264-264, 1998.

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

ARTIGO 2

Variabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* entre e dentro de lotes de sementes de feijão avaliada por Rep-PCR

Preparado em acordo com Tropical Plant Pathology (Versão preliminar)

França, S. K. S. ¹; Siqueira, C. S. ¹; Machado, J. C. ¹

¹ Universidade Federal de Lavras/ UFLA - Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil.

RESUMO

Sanidade de sementes é de suma importância no controle de doenças, pois, esta pode se tornar um agente de disseminação de patógenos no campo. *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo altamente destrutivo que ataca a cultura do feijão podendo causar sérios danos econômicos. Com o intuito de detectar e dimensionar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* entre diferentes lotes de sementes de feijão, produzidos em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais e dentro de um mesmo lote, foram coletados amostras de 39 lotes de sementes oriundos de lavouras de produção de sementes de feijoeiro, com histórico de ocorrência de mofo-branco. Foi realizada a incubação de 1000 sementes por lote, em seguida, foi retirada uma única estrutura típica de *S. sclerotiorum* desenvolvida sobre ou próximo à semente, a qual foi individualmente transferida para uma nova placa de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose e Ágar) e devidamente incubada. A caracterização dos isolados foi realizada através do índice de velocidade de crescimento micelial em meio neon (IVCMN), produção de escleródios, coloração de colônia, grupos de compatibilidade micelial (GCMs) e a análise molecular por meio de Rep-PCR. Para as características morfo-fisiológicas, os isolados formaram quatro grupos para IVCMN, com máxima de 42,04 mm/dia, já na produção de escleródios houve a formação de três grupos com produção máxima de 90,66 de escleródios por placa. Alguns isolados não produziram escleródios. A coloração predominante dos isolados foi bege, branco e marrom respectivamente. A partir da análise do GCM, houve a formação de nove grupos, com o GCM1 presente em todos os 19 lotes de sementes, representando 80,5% dos isolados estudados. Os primers separaram as populações em seis grupos, na qual, BOX formou o maior grupo de isolados, seguido por ERIC e REP. Os resultados confirmaram por meio das análises que a maior variabilidade encontrada foi dentro de lotes de sementes de feijão, em vista disso, a caracterização da população de *S. sclerotiorum* é importante, pois pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de manejo do mofo branco, podendo reduzir os danos causados pelo patógeno.

Palavras chaves: diversidade genética, mofo branco, Rep-PCR, *Phaseolus vulgaris*, grupo de compatibilidade micelial

ABSTRACT

Seed health is of paramount importance in the control of diseases, as this can become an agent of dissemination of pathogens in the field. *Sclerotinia sclerotiorum* is a highly destructive fungus that attacks bean culture and can cause serious economic damage. In order to detect and size the genetic variability of *S. sclerotiorum* isolates among different bean seed lots, produced in different locations in the State of Minas Gerais and within the same lot, samples were collected from 39 seed lots from Production of bean seeds, with a history of occurrence of white-mold. 1000 seeds were incubated per lot, then a single typical *S. sclerotiorum* structure developed on or near the seed was removed, which was individually transferred to a new Petri dish containing the BDA culture medium (Potato Dextrose and Agar) and duly incubated. The isolates were characterized by mycelial growth rate in neon medium (IVCMN), sclerotia production, colony staining, mycelial compatibility groups (GCMs) and molecular analysis by means of Rep-PCR. For the morpho-physiological characteristics, the isolates formed four groups for IVCMN, with a maximum of 42.04 mm / day, whereas in the production of sclerotia there were three groups with a maximum production of 90.66 sclerotia per plaque. Some isolates did not produce sclerotia. The predominant coloration of the isolates was beige, white and brown respectively. From GCM analysis, nine groups were formed, with GCM1 present in all 19 seed lots, representing 80.5% of the isolates studied. The primers separated the populations into six groups, in which BOX formed the largest group of isolates, followed by ERIC and REP. The results confirmed by means of the analyzes that the greatest variability found was within lots of bean seeds, in view of this, The characterization of the *S. sclerotiorum* population is important, as it may help in the development of white mold management strategies and may reduce the damage caused by the pathogen.

Keywords: genetic diversity, white mold, Rep-PCR, *Phaseolus vulgaris*, mycelial compatibility group

Introdução

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) é o agente causador da doença mofo branco. É um patógeno cosmopolita e identificado pelo micélio cotonoso de coloração branca que se desenvolve na superfície dos tecidos vegetais, ou mesmo ocasionando sintomas de murcha e podridão. O fungo é considerado um dos microrganismos mais agressivos, podendo causar doença em mais de 500 espécies de hospedeiros, quando as condições são favoráveis ao seu desenvolvimento, podendo ocasionar perdas de rendimento de até 100% na produção, sendo este, um dos maiores ameaçadores a agricultura brasileira (CARNEIRO et al. 2011; SAHARAN & MEHTA, 2008).

O Brasil é o principal produtor e consumidor de feijão do mundo, pois é considerado um dos alimentos básicos da população, apresentando importância como fonte de proteína e elevado valor energético. O cultivo de *Phaseolus vulgaris* L., conhecido como feijão comum, tem se demonstrado uma atividade tradicional no estado de Minas Gerais, pois é uma cultura de grande importância econômica para a região, sendo o segundo maior produtor no cenário nacional com produção média de 178, 3 mil toneladas/ano, principalmente na estação outono-inverno, a produção é concentrada na região noroeste do estado, entretanto, condições de baixa temperatura e elevada umidade pode acarretar no aparecimento de epidemias como o mofo branco, que encontra condições favoráveis para o seu desenvolvimento (CONAB, 2017; LEHNER et al., 2014).

O uso de lotes de sementes de boa qualidade é essencial para o estabelecimento de uma lavoura, deste modo, é importante observar que a semente é considerada um dos maiores veículos de disseminação de patógenos, pois são levadas a distâncias consideráveis ao longo do processo de comercialização. O patógeno pode ser transmitido pela semente quando infecta as partes mais internas, podendo ser considerada um grande potencial de inóculo. Portanto, os métodos de detecção de forma preventiva constituem em uma das medidas mais importantes para se evitar a entrada desse patógeno em novos locais e impedindo a sua disseminação na lavoura (GOMES et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011).

Steadman (1983) realizou estudos na qual pôde observar que uma semente é capaz de formar mais de um escleródio, que por sua vez, pode produzir até 20 apotécios, os quais podem ter a capacidade de liberar 2.000.000 ascósporos individualmente no ambiente.

O manejo de controle da doença por meio do uso de fungicidas e outras práticas têm sido difíceis e dispendiosas, além disso, a formação de estruturas de sobrevivência denominada escleródios, encontrados tanto nos solos, em restos de cultura quanto nas partes das plantas, podem permitir sua sobrevivência por longos períodos no campo. Em vista disso, os estudos relacionados a populações de *S. sclerotiorum* tem evidenciado alta diversidade genética entre os isolados de regiões tropicais (GOMES et al., 2011; LEHNER et al., 2011, ABREU et al., 2015).

Em estudos de populações são utilizados alguns marcadores com o intuito de revelar a variabilidade existente. Dentre estes, destacam-se as características da morfologia da colônia, velocidade de crescimento micelial, número de escleródios produzidos, grupos de compatibilidade micelial (GCM), que podem ser vistos como uma medida indireta da diversidade genética em populações, DNA fingerprint, microsatélites, AFLP e mais recentemente o Rep-PCR (KOHN et al., 2008; KARIMI et al., 2011; LITHOLDO JÚNIOR et al., 2011).

Estudos baseados em PCR utilizando iniciadores degenerados para sequências de Rep-PCR foram descritos inicialmente para bactérias, porém, estas sequências repetitivas de DNA também já foram adaptadas a genomas de eucarióticos com aplicações na caracterização genética, através da variabilidade a nível inter e/ou intra-específicos de vários gêneros fúngicos com sucesso como *Fusarium Oxysporum*, *Verticillium chlamydosporium*, *Rhizoctonia solani*, *C. pernicioso* e *S. sclerotiorum* (MCDONALD et al., 2000; EDEL et al., 1995; ARORA et al., 1996; TODA et al., 1999; ARRUDA et al. 2001; KARIMI et al, 2011).

Considerando o exposto, o objetivo do estudo foi detectar e dimensionar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* entre diferentes lotes de sementes de feijão produzidos em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais, e dentro de um mesmo lote.

Material e Métodos

Isolados fúngicos

Neste estudo, foram coletadas amostras de sementes tipo carioca representativa de 39 lotes oriundos de lavouras de produção de sementes de feijoeiro, com histórico de ocorrência

de mofo-branco na mesorregião do Noroeste de Minas Gerais. Em laboratório, foi realizada o procedimento de separação dos lotes já devidamente identificados, em seguida, foram plaqueadas 1000 sementes não desinfestadas de cada lote em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio de cultura neon, com pH ajustado para 4,7 e mantidas a 20 °C no escuro por um período de aproximadamente 5 a 7 dias (KAWASAKI & MACHADO, 2013). Após a incubação, com auxílio de microscópio estereoscópico, uma única estrutura típica de *S. sclerotiorum* (micélio ou escleródio) desenvolvida sobre ou próximo à semente foi individualmente transferida para uma nova placa de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e devidamente incubada em BOD a ± 20 °C.

Cada cultura pura originada, proveniente da estrutura fúngica isolada, especificamente, foi considerada uma representante de uma única semente, portanto, oriunda de um determinado lote e origem geográfica, logo, esta foi identificada como um "isolado". Para assegurar-se da manutenção da identidade genética de cada isolado, após a formação da colônia pura, as pontas miceliais foram transferidas para placas contendo BDA e mantidas a 23°C no escuro por até 15 dias para posteriormente serem preservadas a 4 °C.

Dos 39 lotes de sementes de feijão avaliados, por meio do plaqueamento de 1.000 sementes por lote em meio semi seletivo neon, foi observada a incidência de *S. sclerotiorum* em 19 lotes. Destes lotes, foi possível retirar 103 isolados oriundos de 103 sementes (Tabela 1).

Tabela 1. Relação do número populacional de *Sclerotinia sclerotiorum* e porcentagem de incidência detectada em 19 lotes de sementes de feijão cultivar Pérola oriundos da região noroeste de Minas Gerais. Lavras, UFLA, 2017.

Lotes	Nº de Isolados	*% de Incidência	Localidade	Cultivar
AMG1	8	0,8%	Unaí - MG	Pérola
BMG2	1	0,1%	Unaí - MG	Pérola
CMG3	5	0,5%	Bonfinópolis - MG	Pérola
DMG4	2	0,2%	Unaí - MG	Pérola
EMG5	24	2,4%	Unaí - MG	Pérola
FMG6	5	0,5%	Paracatu - MG	Pérola
GMG7	1	0,1%	Unaí - MG	Pérola
HMG8	14	1,4%	Paracatu - MG	Pérola
IMG9	5	0,5%	Unaí - MG	Pérola
JMG10	4	0,4%	Unaí - MG	Pérola
KMG11	16	1,6%	Bonfinópolis - MG	Pérola
LMG12	3	0,3%	Paracatu - MG	Pérola
MMG13	3	0,3%	Unaí - MG	Pérola
NMG14	2	0,2%	Bonfinópolis - MG	Pérola
OMG15	4	0,4%	Unaí - MG	Pérola
PMG16	2	0,2%	Paracatu - MG	Pérola
QMG17	1	0,1%	Paracatu - MG	Pérola
RMG18	1	0,1%	Paracatu - MG	Pérola
SMG19	2	0,1%	Paracatu - MG	Pérola

* Porcentagem de incidência com base em mil sementes

Avaliação de Caracteres Morfológicos e Fisiológicos

Índice de Velocidade de Crescimento Micelial em meio Neon (IVCMN)

Isolados de *S. sclerotiorum* foram colocados para crescer em meio neon com pH ajustado para 4,7 e fotoperíodo de doze horas, a 20 °C, em câmara de crescimento. O crescimento micelial foi mensurado diariamente, a partir do momento da inoculação, no delineamento inteiramente casualizado utilizando-se três repetições (placas) por isolado. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado utilizando-se a fórmula adaptada de Oliveira (1991):

$$IVCM = \Sigma[(D - D_a) / N]$$

sendo:

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial

D=diâmetro médio da colônia

Da=diâmetro médio da colônia do dia anterior

N=número de dias após a inoculação

Produção de escleródios e coloração de colônias

Os escleródios dos 103 isolados de *S. sclerotiorum* foram produzidos em meio de cultura BDA. Discos de micélio foram colocados no centro da placa de Petri de 90 x15 mm contendo o meio agarizado e mantidos em incubadoras a 20°C por 30 dias no escuro. Após esse período foi realizada a contagem dos escleródios e a avaliação da coloração da colônia. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições para cada isolado.

Grupo de Compatibilidade Micelial (GCM)

O teste de GCM foi realizado de acordo com Schafer & Kohn (2006) com adaptações para todos os 103 isolados amostrados formando um total de 10.609 combinações. Para implantação do experimento, todos os isolados foram cultivados em meio BDA por um período de até 8 dias sob condições de escuro e temperatura de 20 °C. Após este período, pedaços do fungo medindo aproximadamente 5x5 mm foram retirados da borda da colônia e depositados, equidistantemente, três por placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA acrescido de corante alimentício (300 µL/L), sendo todos os isolados pareados consigo mesmo e com os demais isolados. As placas de Petri foram incubadas em câmara de crescimento, sob condições de escuro e temperatura de 20 °C. As reações de interação micelial foram avaliadas 7 dias após incubação, considerando reação incompatível quando ocorreu a formação de linha vermelha na superfície ou reverso das colônias e micélio aéreo na linha de interação e reação compatível quando não houve formação da linha indicando que os mesmos se misturaram de forma uniforme (Figura 1). Cada pareamento foi realizado duas vezes.

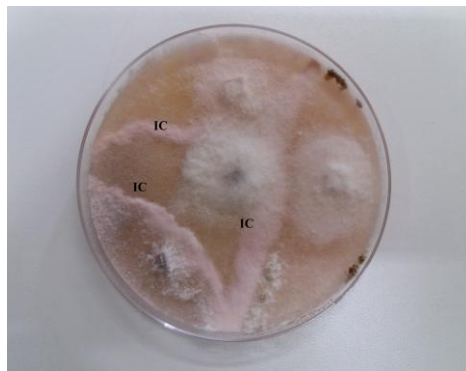


Figura1. Reação de incompatibilidade micelial (IC) de *Sclerotinia sclerotiorum* isolados de sementes de feijão da região noroeste do Estado de Minas Gerais.

Caracterização Molecular

Extrações de DNA

Para a extração de DNA, os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA por 7 dias, após esse período, foi realizada a raspagem do micélio produzido, macerado em almofariz com nitrogênio líquido até adquirir consistência de um pó fino, sendo posteriormente colocados em microtubos. As extrações de DNA foram feitas utilizando o kit Wizard®. Genomic DNA Purification (Promega Corporation) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. A qualidade e concentração do DNA extraído foram mensuradas por espectrofotometria (Nanodrop) e a concentração final ajustada para 40 ng/ μ L.

Análise por Rep-PCR

Os 103 isolados de *S. sclerotiorum* representativos dos lotes foram submetidos a análise da diversidade genética. O conjunto de primers usados para ERIC-PCR, REP-PCR e BOX-PCR assim como a temperatura de anelamento otimizada estão descritas na Tabela 2. As amplificações da PCR foram realizadas em Termociclador (Multigene, Labnet, NJ, USA) em pelo menos duas vezes. Utilizou-se o volume total de reação de 25 μ l contendo 2 μ l de DNA molde (40 ng), 1 μ M do primer, 200 μ M de cada um das quatro dNTPs, 1,5 unidades de Taq polimerase (Invitrogen), 2 Mm MgCl₂ e 2,5 μ l de buffer. Os ciclos da Rep-PCR foram realizadas da seguinte forma: desnaturação inicial durante 2 minutos a 95 °C seguiu-se por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C; 90s em temperatura de anelamento, 2 min a 72 °C com extensão

final por 8 minutos a 72 °C (KARIMI et al., 2011). Para cada PCR, foi incluso um controle negativo (água). Os produtos de PCR foram revelados por eletroforese a 1,5% em gel de agarose, por aproximadamente 3 h a 80 V em 1X TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA) seguido de coloração com Gel Red (Biotium), após a corrida, os produtos da PCR foram observados em transluminador UV L-PIX – Transiluminator (Loccus-Biotecnologia, Brasil).

Tabela 2. Sequência e temperatura de anelamento (T) dos primers Rep-PCR usados para os 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Primer	Sequência	T (C°)	Referência
ERIC 1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	45	Purkayastha et al., 2008
ERIC 2I	5'-ATGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	51	Purkayastha et al., 2008
REP2-I	5'-ICGITTATCIGGCCTAC-3'	41	Purkayastha et al., 2008
BOX 1AR	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	66	Purkayastha et al., 2008

Análises dos Dados

As análises estatísticas referentes às características morfológicas e fisiológicas do patógeno foram feitas com o uso do programa estatístico R. Foi realizado o teste de Scott Knott para IVCN em meio neon, produção de escleródios a 1% de significância. A coloração de colônia foi estimada através da porcentagem de isolados de cor bege, branca e marrom. Para o GCM, após as avaliações, foi gerada uma matriz binária, em que 0 (zero) correspondia aos isolados que não foram compatíveis e 1 (um) para os isolados compatíveis. O dendrograma foi obtido a partir da matriz de distância genética gerada utilizando o coeficiente de Jaccard. Os isolados foram agrupados pelo método do grupo de pares não ponderados

usando médias aritméticas (UPGMA) utilizando o programa GENES versão 2014.6.1 (CRUZ, 2008).

Os perfis eletroforéticos obtidos por REP, ERIC e BOX, foram analisados separadamente, pelo sistema binário, zero (0) para ausência de bandas e um (1) para a presença de bandas para cada isolado. Para a análise da diversidade genética das populações utilizou-se o software POPGENE, versão 1.32 (YEH et al., 1997), onde foram estimados: número efetivos de alelos (ne), diversidade genética de Nei (He) (NEI, 1973), índice de Shannon (I) e porcentagem de locos polimórficos ($P\%$). Para a estruturação genética e análise da variância de seus componentes dentro e entre as populações, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA), por meio do programa GENES versão 2014.6.1 (CRUZ, 2008).

Resultados

Características morfológicas e fisiológicas

Para o IVCMN, foi possível constatar que houve diferença significativa entre os isolados pelo teste de média de Scott-Knott, que separou os isolados em quatro grupos distintos. Os isolados do grupo **A** obtiveram média de IVCMN de 35,13 a 42,04 mm/dia, os do grupo **B** de 29,26 a 34,32 mm/dia, o grupo **C** variou de 25,50 a 29,11 mm/dia e o grupo **D** de 18,61 a 24,61 mm/dia. Os grupos que tiveram maior número de isolados foram os **C** e **D** (Tabela 3).

Tabela 3. Agrupamento de médias do índice de velocidade de crescimento micelial em meio neon (IVCMN) (mm/dia) dos 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, pelo teste de Scott Knott a $P \leq 0,01$.

Isolados	IVCMN	Isolados	IVCMN	Isolados	IVCMN	Isolados	IVCMN
A-29	42,04A	F-91	34,32B	C-79	29,11C	S-43	23,77D
R-132	41,10A	E-48	34,12B	N-122	28,94C	K-96	23,38D
O-68	40,13A	K-109	33,66B	A-53	28,74C	E-49	23,22D
E-26	40,00A	S-82	33,61B	F-90	28,72C	L-124	23,01D
M-19	38,53A	A-16	33,05B	K-118	28,66C	H-38	22,83D
E-10	37,87A	M-125	32,46B	L-100	28,45C	I-20	22,77D
I-13	37,87A	H-77	32,35B	M-18	28,27C	H-76	22,74D
A-15	37,83A	H-115	32,27B	A-34	28,01C	H-80	22,72D
B-130	37,64A	A-58	32,22B	E-4	27,88C	J-39	22,50D
K-116	37,51A	K-117	32,22B	H-126	27,38C	H-88	22,44D
J-14	37,00A	E-5	31,90B	N-92	27,27C	C-57	22,11D
I-33	36,43A	E-129	31,77B	G-101	27,27C	O-111	22,05D
F-103	35,70A	K-120	31,34B	E-22	27,27C	J-40	22,05D
A-105	35,56A	E-47	30,66B	A-89	27,27C	Q-133	21,77D
E-98	35,51A	C-106	30,50B	L-134	27,22C	E-28	21,77D
K-119	35,33A	E-6	30,27B	E-85	27,11C	C-78	21,72D
E-51	35,13A	H-56	30,27B	E-9	27,00C	F-62	21,66D
H-52	30,00B	E-94	26,38C	I-36	26,94C	K-17	21,50D
D-84	30,00B	E-2	26,27C	E-104	26,94C	F-70	21,50D
K-25	29,94B	E-7	26,03C	E-87	26,88C	K-69	21,44D
E-3	29,84B	A-59	25,83C	K-54	26,83C	D-83	21,22D
H-37	29,83B	K-24	25,72C	O-41	24,61D	E-30	20,83D
I-60	29,66B	H-45	25,61C	K-27	24,61D	J-12	20,44D
P-112	29,50B	K-97	25,61C	O-42	24,38D	K-46	20,05D
C-107	29,44B	E-55	25,55C	H-127	24,38D	K-95	18,61D
P-131	29,26B	H-113	25,50C	H-114	23,88D		

*médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 1%.

Em relação à produção de escleródios, os isolados H-56 e H-126 obtiveram maior número de escleródios diferindo estatisticamente dos demais isolados, os quais formaram três grupos a partir do teste de médias. Dentre os isolados do grupo C, houveram alguns que não produziram escleródios (Tabela 4).

Tabela 4. Agrupamento de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* com base nas médias de produção escleródios por placa de um total de 103 isolados, pelo teste de Scott Knott a $P \leq 0,01$.

Isolados	Produção de escleródios	Isolados	Produção de escleródios	Isolados	Produção de escleródios	Isolados	Produção de escleródios
H-126	90,66A	E-55	34,66B	E-22	24,33C	O-41	16,33C
H-56	67,33A	R-132	34,66B	M-125	24,33C	E-129	16,00C
E-2	50,33B	H-52	34,00B	N-92	24,33C	K-119	15,00C
E-85	46,00B	I-60	33,66B	E-26	24,00C	L-134	15,00C
E-3	45,66B	D-84	32,66B	A-16	23,66C	P-131	15,00C
E-9	45,33B	E-48	32,66B	F-91	23,00C	G-101	14,66C
I-20	42,66B	K-96	31,66B	F-62	22,66C	K-118	14,66C
C-106	42,33B	E-6	30,33B	K-46	22,66C	O-42	14,66C
H-45	42,00B	C-107	30,33B	A-89	22,00C	K-97	13,00C
H-80	41,66B	E-87	29,00B	F-103	22,00C	E-10	12,66C
A-59	41,33B	A-105	28,66B	E-94	21,33C	K-54	12,66C
E-51	40,66B	H-38	28,66B	H-76	21,00C	E-49	10,66C
I-33	40,66B	A-34	28,33B	H-115	21,00C	J-40	10,66C
S-43	39,66B	E-104	28,33B	K-17	21,00C	J-14	10,00C
C-57	39,00B	C-78	27,66B	E-7	20,66C	N-122	10,00C
D-83	38,00B	H-114	27,66B	C-79	20,33C	K-27	8,33C
H-88	38,00B	K-69	27,66B	E-98	20,33C	A-15	1,33C
H-127	38,00B	S-82	27,66B	I-13	20,33C	F-90	0,33C
B-130	37,33B	K-24	27,33B	E-5	20,00C	A-53	0,00C
I-36	36,66B	Q-133	26,66B	H-77	2,33C	H-37	0,00C
O-111	36,66B	F-70	26,33C	K-25	18,00C	K-109	0,00C
A-58	36,33B	E-4	26,00C	A-29	17,33C	K-117	0,00C
L-100	36,00B	E-47	26,00C	J-12	17,00C	K-120	0,00C
E-30	35,33B	K-116	25,66C	O-68	16,66C	M-18	0,00C
L-124	35,33B	K-95	25,00C	H-113	16,33C	M-19	0,00C
E-28	35,00B	P-112	25,00C	J-39	16,33C		

*médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 1%.

Coloração da colônia

Após o período de incubação, observaram-se três categorias distintas quanto a coloração de colônia: bege, branca e marrom (Figura 2). Dos 103 isolados de *S. sclerotiorum* avaliados, 69,9% (72 isolados) apresentaram coloração bege, 17,4% (18 isolados) branca e 12,6 % (13 isolados) marrom.

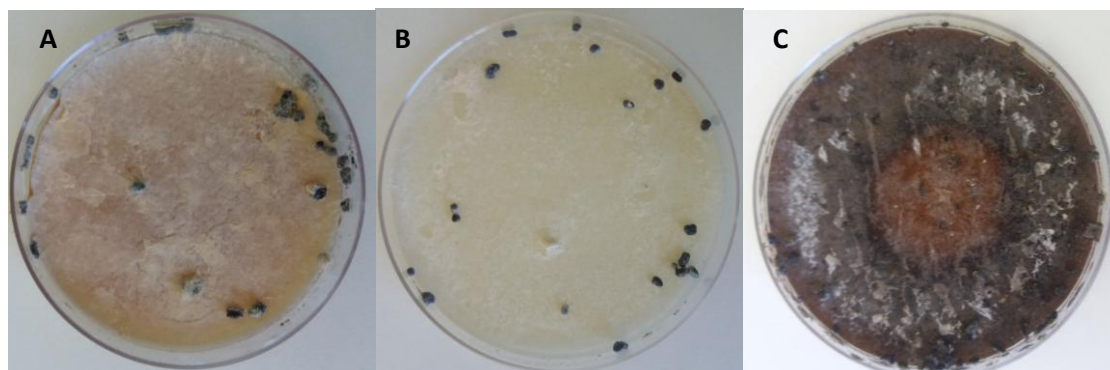


Figura 2. Coloração predominante das colônias de *S. sclerotiorum* em meio BDA, após 30 dias de crescimento, sendo A: coloração bege; B: coloração branca; C: coloração de marrom.

Grupo de compatibilidade micelial

Pode-se observar entre as populações de *S. sclerotiorum* que dentro de uma mesmo lote, ocorreu variação de GCM de um a seis totalizando 9 grupos (Figura 3). Apenas nove lotes de sementes continham mais de um GCM. O GCM mais comum foi o GCM 1, pois este foi confirmado em todos os 19 lotes de sementes, representando 80,5% dos isolados estudados. O segundo maior grupo foi o GCM 7, com 7,76% de isolados e o terceiro maior grupo foi o GCM 8 com 3,88% do total de isolados presentes no lotes. Os isolados pertencente ao GCM 9 e o GCM 4 não foram compatíveis com nenhum isolado. Os lotes que tiveram maior variabilidade em relação ao GCM foram EMG, KMG, HMG e AMG representantes das cidades de Unaí, Bonfinópolis e Paracatu. O isolado que obteve maior percentual de reações compatíveis foi o K-120 (93%) seguido do K-09 e K-117 (86,4%). A análise de cluster com base no índice de Jaccard e agrupamento por UPGMA apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,82 com formação de nove grupos (Figura 4).

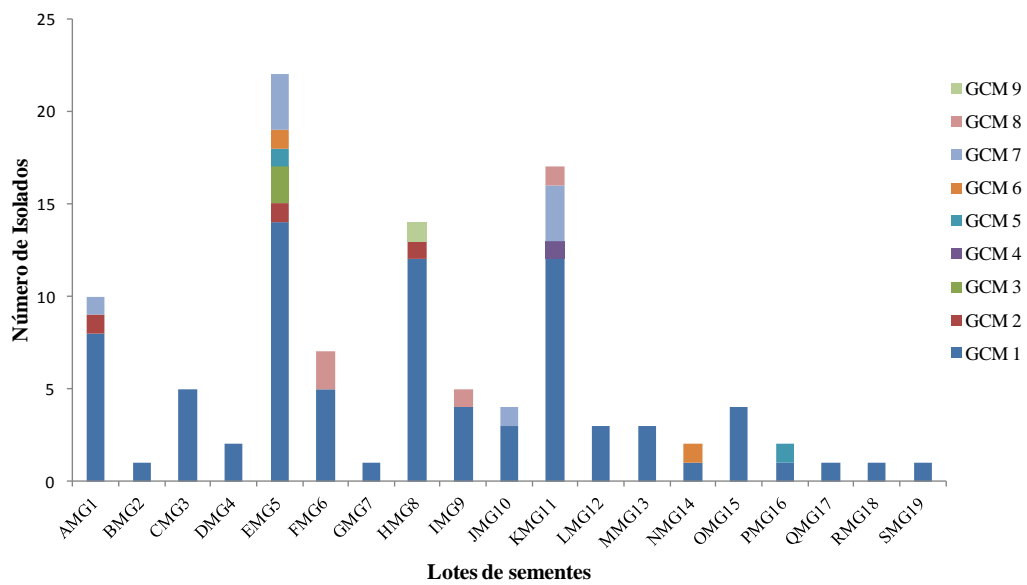


Figura 3. Frequência de ocorrência de nove grupos de compatibilidade micelial (GCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* isolados de sementes de feijão do Estado de Minas Gerais em função dos lotes.

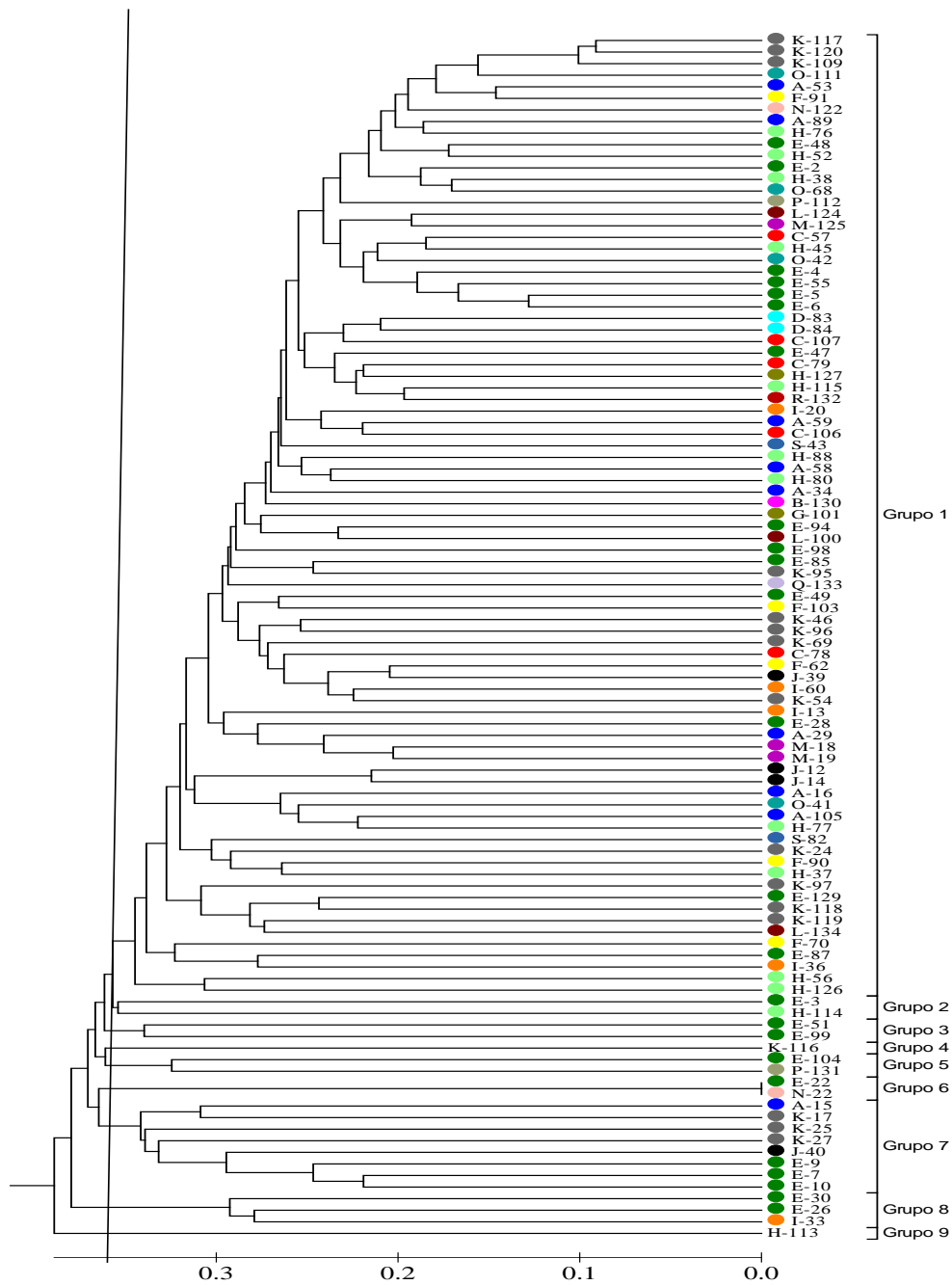


Figura 4. Dendrograma dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* agrupados de acordo com o comportamento de compatibilidade micelial com os demais isolados. A linha de corte representa o valor máximo de 0,35.

Análise da diversidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* por Rep-PCR

Os iniciadores separaram as populações em seis grupos em REP-PCR e BOX-PCR, sete em ERIC-PCR, com 87,37% da população de isolados formaram um grande grupo no primer BOX (Grupo 1), seguido pelo primer ERIC (Grupo 1) com 78,64% e REP (Grupo 1) com 35,92%. Os dendrogramas foram obtidos a partir da matriz de dissimilaridade, com base na análise de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard.

Para o REP PCR, os 103 isolados foram subdivididos em seis grupos, este apresentou CCC (coeficiente de correlação cofenética) de 0,85, este avalia o grau de ajuste do agrupamento, quanto maior CCC melhor agrupamento. A maior similaridade genética observada foi de 85% no grupo 3 (Figura 5). Já para o primer ERIC, foi possível observar a formação de sete grupos distintos, com CCC de 0,73, sendo a maior porcentagem de similaridade genética de 82% no grupo 1 (Figura 6). Os isolados O-68, M-19 e E-104 não se agruparam com os demais formando um *out group*. No primer BOX, observou-se que além da formação dos seis grupos, este apresentou CCC equivalente a 0,77, assim como, a maior porcentagem de similaridade genética foi de 86% no grupo 1. O isolado S-82 não se agrupou com os demais isolados (Figura 7).

Os resultados obtidos a partir da AMOVA para REP, ERIC e BOX indicaram diferença significativa entre os isolados (Tabela 6). Todos apresentaram taxa de 100% de polimorfismo. A maior parte da diversidade genética observada está concentrada dentro das populações dos lotes por BOX (92,05%). Os valores de variação genética foram significativos com probabilidades calculadas por 1.000 permutações ao acaso. O PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) para cada iniciador variou de 0,31 a 0,34, sendo que o maior PIC foi em BOX. PIC corresponde ao poder do marcador em detectar o polimorfismo existente na população e em BOX foi de 0,34, assim como o número de alelos efetivos que foi de 1,49. A diversidade genética de Nei foi maior em ERIC com valor de 0,28 assim como o índice de Shannon 0,48, informando que quanto mais próximo de 1, mais diversificada genotipicamente é a população, logo, podemos observar que a população estudada possui diversidade genética intermediária. Levando em consideração a diversidade genética de Nei e o índice de Shannon, por meio do uso do iniciador ERIC constatou-se maior diversidade entre os isolados.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) das 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes dos 19 lotes estudadas a partir de REP, ERIC e BOX PCR.

FV	GL	SQ	QM	Variância	% Variação	p
REP						
Entre Lotes	18	841.846	46.769	0.4312	14.714	< 0,001
Dentro de Lotes	84	2.099.319	24.992	2.492	85.286	
Total	102	2.941.165	28.835	29.304	100.0	
ERIC						
Entre Lotes	18	80.434	4.4686	0.4528	17.1908	< 0,001
Dentro de Lotes	24	183.2359	2.1814	2.1814	82.8092	
Total	102	263.6699	2.585	2.6342	100.0	
BOX						
Entre Lotes	18	2.801.318	155.629	0.9359	7.9498	< 0,001
Dentro de Lotes	24	9.102.371	108.362	108.362	92.0502	
Total	102	11.903.689	116.703	11.772	100.0	

Tabela 7. Estimativa de diversidade da população de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundas de 19 lotes de sementes com base molecular através do uso dos iniciadores REP, ERIC e BOX.

Primers	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Total bandas amplificadas	Locos polimórficos	Polimorfismo (%)	PIC
REP	1,44 (0,28)	0,28 (0,13)	0,44 (0,16)	18	18	100	0,317
ERIC	1,48 (0,19)	0,31 (0,09)	0,48 (0,11)	16	16	100	0,320
BOX	1,49 (0,26)	0,30 (0,12)	0,47 (0,15)	17	17	100	0,342

ne: número de alelos efetivos; *h*: diversidade genética de Nei; *I*: Índice de Shannon; PIC: conteúdo de informação polimórfica. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão.

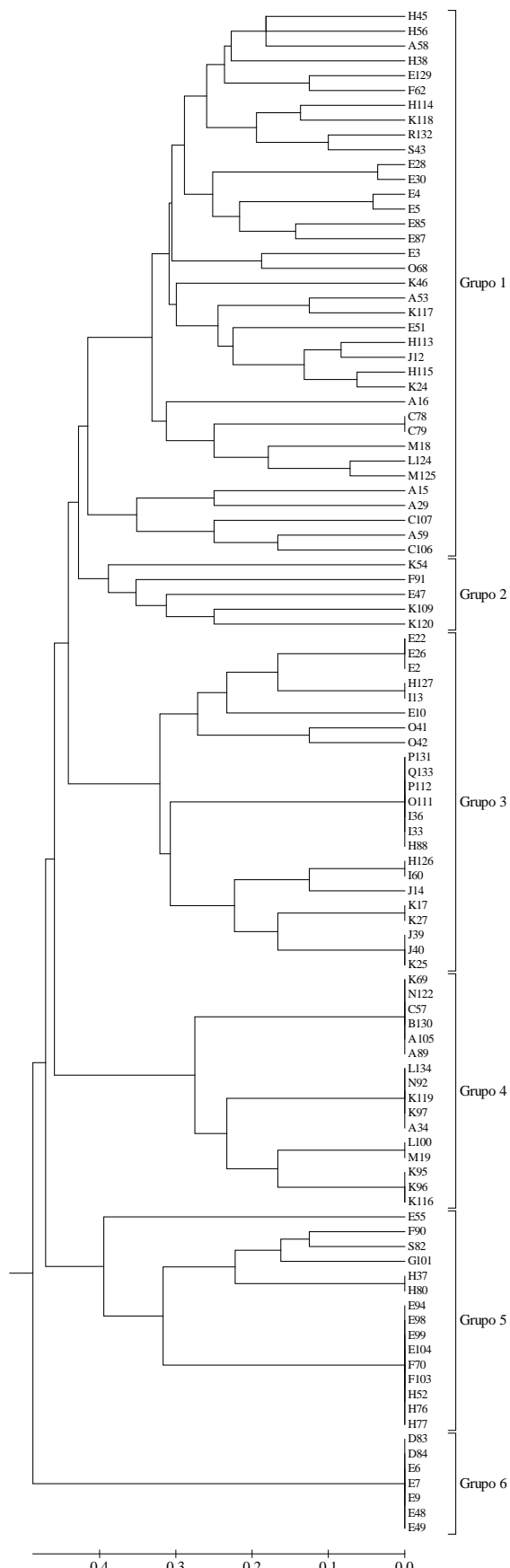


Figura 5. Análise de agrupamento dos 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método UPGMA por REP PCR.

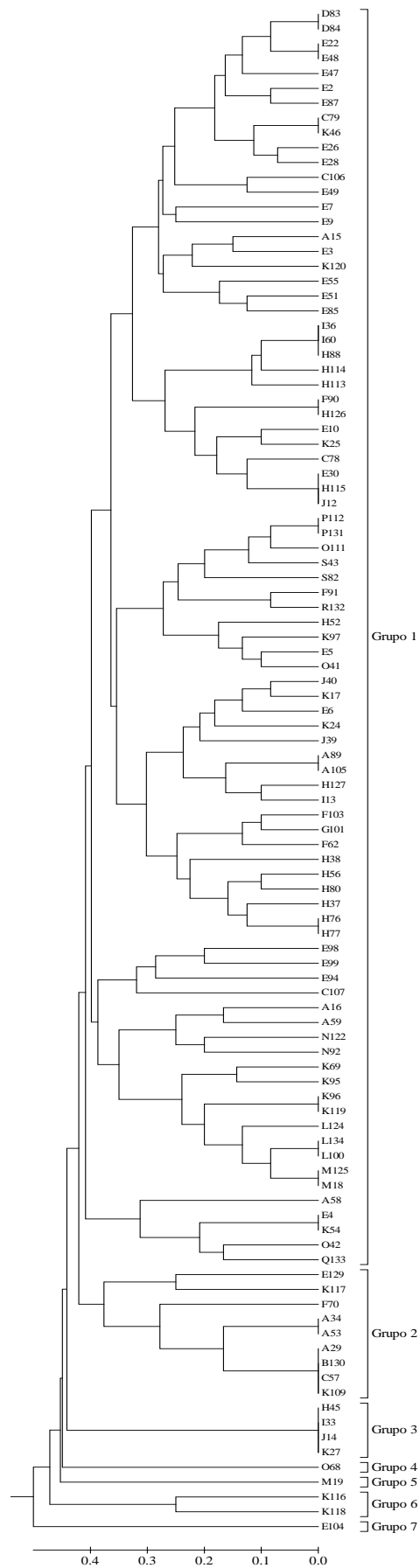


Figura 6. Análise de agrupamento dos 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método UPGMA por ERIC PCR.

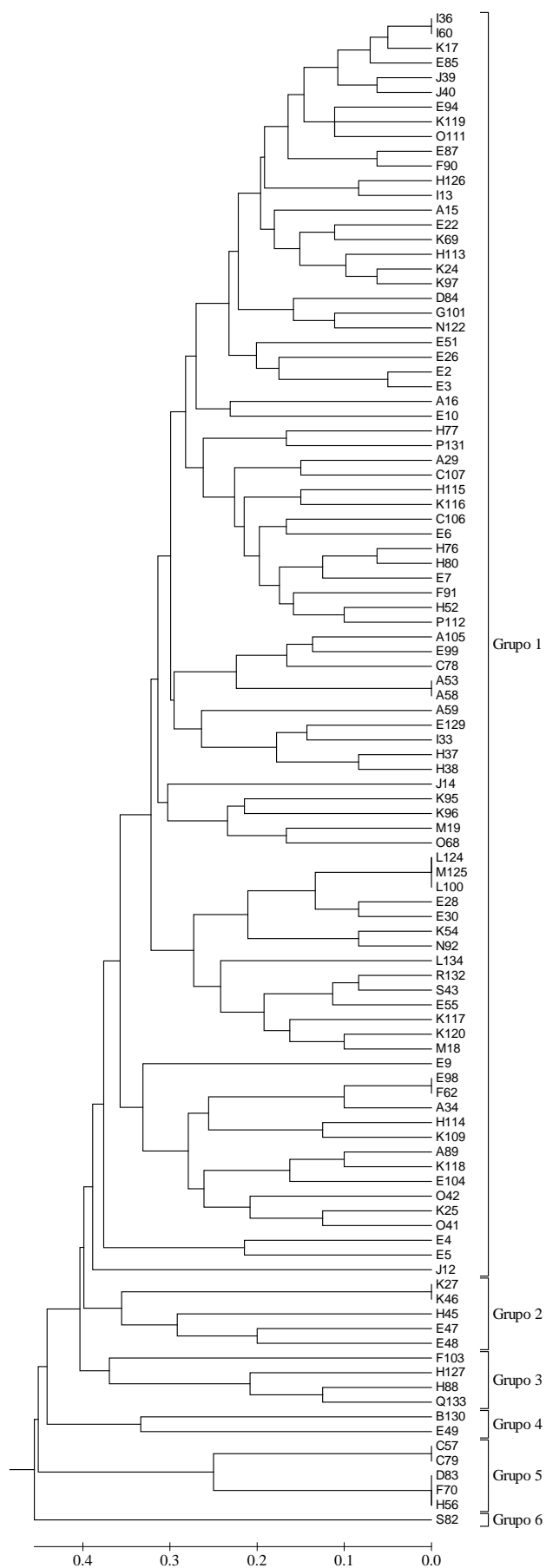


Figura 7. Análise de agrupamento dos 103 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método UPGMA por BOX PCR.

DISCUSSÃO

O conhecimento das características morfológicas, fisiológicas ou genéticas dos patógenos, é indispensável para a formulação de diferentes estratégias no manejo de doenças de plantas. Por ser um patógeno de difícil controle, ser bem sucedido e possuir vários hospedeiros, *S. sclerotiorum* pode causar danos quase sempre irreversíveis, tornando-se necessário obter o conhecimento sobre as principais características envolvendo sua diversidade.

Informações adquiridas por meio da velocidade de crescimento micelial, está diretamente relacionada ao tempo em que o patógeno leva para se multiplicar; a produção de escleródios que está associado à sobrevivência e a multiplicação; a coloração de colônia, através da produção de melanina pelo fungo, está relacionada a proteção e a formação de grupos de compatibilidade micelial, outro tipo de informação que tem sido amplamente usada para avaliar a variabilidade genética existente em fungos patogênicos em plantas em que é possível estabelecer estratégias de manejo de maneira eficiente (LESLIE, 1993; DANTAS, 1999).

Este é o primeiro estudo a verificar a diversidade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de um mesmo lote e entre lotes de sementes de feijão, portanto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que houve diferença entre os isolados quanto à velocidade de crescimento, pois houve a formação de quatro grupos com intervalos de crescimento variando de 42,04 (isolado A-29) a 18,61 (K-95) mm/dia. Li et al. (2008) também encontraram velocidades de crescimento diferentes entre 39 isolados de *S. sclerotiorum* de girassol, porém, Durman et al. (2003) não observaram diferenças na velocidade de crescimento em relação aos isolados de *S. sclerotiorum* de girassol e alface. As diferenças encontradas no IVCMN podem ser atribuídas à variabilidade genética entre os isolados, fato que pode ser observado nos outros aspectos estudados no presente trabalho.

Segundo Chaves (1964), existe variabilidade entre as diversas características morfológicas observadas entre isolados deste fungo, como exemplo, coloração micelial, velocidade de crescimento, quantidade dos escleródios produzidos, entre outros. Lehner et al. (2014) afirmam que existe uma alta variabilidade morfológica entre isolados de *S. sclerotiorum*, no entanto, as características de micélio e de escleródios podem mudar rapidamente tornando-os marcadores inadequados para estudos populacionais e concluem que

as características fenotípicas avaliadas em seu estudo não foram marcadores confiáveis para investigar populações de *S. sclerotiorum*.

A coloração escura de *S. sclerotiorum* está relacionada a produção de melanina, que protege o fungo de condições biológicas e ambientais adversas (HENSON et al., 1999). Segundo Merk-Turk et al.(2007), afirmam que a variação na coloração de colônia está relacionada a diferenças genéticas dentro da população. Com relação a avaliação da coloração de colônia dos isolados, foi possível constatar que houve predominância da coloração bege (69,9% -72 isolados) entre os isolados. Em trabalho realizado por Abreu e Souza (2015), a maioria dos isolados apresentaram coloração bege (58%), seguido de coloração branca e os demais com coloração marrom avermelhada. Kreici (2016) ao avaliar a coloração de colônia de 150 isolados de *S. sclerotiorum* em meio BDA, verificou que a maioria apresentava coloração branca (62%), assim como, em trabalhos anteriores desenvolvidos por Grabicoski (2012) e Kohn (1979), houve predominância de isolados com coloração de colônia branca.

A coloração bege foi predominante no GCM 4, GCM 5 e GCM 9, enquanto que, no MCG1, por ter um maior número de isolados, foi mais diversificado apresentando colônias além de bege, marrom e branca. Já o GCM 6 e GCM 8 a coloração predominante dos isolados foi a marrom. Merk-Turk et al. (2007) avaliaram as cores das colônias dos isolados dentro dos mesmos MCG e verificaram que foram semelhantes, exceto para o GCM 2, que consistiu de seis isolados e alguns tiveram coloração castanha e bege.

A quantidade de escleródios produzidos pelo fungo foi variável, pois houve a formação grupos separando-os de acordo com a sua produção que variou de 0 a 90,66 escleródios por placa. Apenas dois isolados tiveram produção acima de 65 escleródios formando um grupo. Sete isolados não produziram escleródios. Dos isolados que não produziram escleródios, um obteve índice de velocidade de crescimento micelial relativamente mais rápido (M-19) que os demais indicando que a velocidade de crescimento não tem relação com a produção de estrutura de sobrevivência. Lehner et al. (2014) observaram que a velocidade de crescimento micelial não teve influência na produção de escleródios, portanto, os resultados foram semelhantes a estudos anteriores (VLEUGELS et al., 2013; LI et al., 2008).

Pelas análises de compatibilidade micelial, verificou-se que existe variabilidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum* a partir das análises intrapopulacionais, resultando em diferentes níveis de variabilidade quando comparado às análises de Rep PCR,

indicando que os isolados não foram agrupados por características genéticas específicas. Estudos anteriores relacionados à população de *S. sclerotiorum*, revelaram que este apresenta caráter evolutivo quanto ao seu modo de reprodução clonal, sugerindo que podem ocorrer recombinações genéticas e mutações gerando novos indivíduos, sendo este um fator decorrente do processo natural do próprio organismo ou por exposição a fatores externos resultando na variabilidade (CUBETA et al., 1997; KOHLI & KOHN, 1998; CARBONE et al., 1999).

Zancan et al. (2015) verificaram que a associação de GCM e marcadores microssatélites revelaram alta variação genética entre os isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de diversas regiões do Brasil. Litholdo et al. (2011) constataram que GCM e RAPD demonstraram alto nível de variabilidade entre isolados de *S. sclerotiorum*. Entretanto, pesquisas realizadas por Lehner et al. (2015) avaliando a população de *S. sclerotiorum* coletada de algumas regiões de Minas Gerais comprovaram a baixa variabilidade entre 118 isolados, no qual formaram 14 GCM, porém a diversidade de Nei apresentou variação de 0 a 0,26.

Os resultados baseados nas análises de Rep-PCR foram consistentes, pois observou-se a formação de grupos com alto nível de diversidade entre os isolados, apresentando maior variação dentro dos lotes de sementes. Em estudo realizado por Karimi et al. (2011), revelaram que em populações de *S. sclerotiorum*, houve formação de quatro grupos por Rep-PCR a partir de 64 isolados coletados de canola, formando 38 GCM, indicando elevada diversidade entre isolados. Purkayastha et al. (2006) identificaram uma grande diversidade entre os isolados de *Macrophomina phaseolina* de feijão por Rep-PCR quando comparou com outras técnicas demonstrando que as informações são consistentes e que estes elementos repetitivos mesmo sendo altamente conservados em bactérias, também, estão presentes em fungos.

O maior grupo de isolados identificado foi em BOX-PCR com 87,37% do total de isolados, similaridade de 86% e variação de 92,05% dentro dos lotes, isto corresponde a uma alta diferenciação entre as populações. Resultados semelhantes foram encontrados por Sexton e Howlett (2004) que verificaram a maior variabilidade de *S. sclerotiorum* em campos de canola foi dentro das populações na Austrália. O valor de PIC, conforme supracitado, representa a capacidade do marcador em detectar a variabilidade existente entre os indivíduos, sendo que quanto maior a sua capacidade, maior é o seu valor e nos resultados observados, o

maior PIC foi em BOX com 0,34. Conforme a classificação de Botstein et al. (1980), este pode ser considerado medianamente informativo. O autor classifica marcadores com PIC acima de 0,5 como satisfatórios em conteúdo informativo, valores entre 0,25 e 0,50 como medianamente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos.

Zancan et al. (2015) sugerem que a introdução do fungo em novas áreas ou novos patótipos nas mesmas áreas, utilizando a semente como veículo de disseminação, pode contribuir explicando a similaridade genética entre os isolados do mesmo GCM. Lehner et al (2015) relatou que o comércio livre de sementes é uma prática comum em algumas regiões de Minas Gerais, pois alguns produtores acabam comprando sementes de diferentes localidades do país, o que facilita a entrada de novos genótipos de patógenos.

Os resultados deste trabalho dão suporte para entender que as sementes desempenham um papel importante, pois através de métodos de detecção é possível impedir comercialização de sementes infectadas que podem trazer prejuízos futuros. O fungo *S. sclerotiorum* possui ciclo sexual e também, um comportamento homotálico, isso pode fornecer subsídios para entender a variabilidade que é gerada a partir de suas características genotípicas e fenotípicas, os quais necessitam de estudos mais aprofundados. É importante saber que dentro e entre lotes de sementes pode haver variabilidade do patógeno como constatado no presente estudo e que segundo os padrões de tolerância estabelecidos pelo ministério da agricultura, a tolerância é zero para detecção do fungo em lotes de sementes. Esta variabilidade detectada nos lotes pode futuramente dificultar o manejo da doença neste patossistema.

Conclusões

As populações de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes lotes de sementes de feijão variam amplamente em relação às características morfológicas, fisiológicas e moleculares.

Os isolados apresentam variações tanto dentro dos lotes de sementes como entre os lotes considerados neste estudo. As variações foram mais acentuadas entre isolados de um mesmo lote.

Estes resultados indicam que *S. sclerotiorum* encontra-se geneticamente variável dentro de uma mesma área representada por um lote de sementes conforme as Regras para Análises de Sementes do Brasil (RAS). Estas informações tornam-se fundamentais para a formulação do manejo adequado do mofo-branco.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. (2015). Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 6879-6896.
- ARORA, D. K., HIRSCH, P. R., AND KERRY, B. R. 1996. PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporum* isolates. *Mycology. Res.* 100:801-809.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*.
- CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. (1999). Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution, Lancaster*, v. 53, n. 1, p. 11-21.
- CARNEIRO, F. F.; ZEVIANI, W. M.; SANTOS, J. B.; CARVALHO, R. S. B.; ALVES, F. C.; DIAS, J. A. (2011) Minimum number of common bean plants per plot assess field resistance to white mold. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 11, p. 358-364.
- CHAVES, G.M. (1964) Estudos sobre *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Experientiae*, Viçosa, v.4, n.2, p. 69-133.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (2017) Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Quinto levantamento. Monitoramento agrícola – Safra 2016/17. Fevereiro 2017. ISSN: 2318-6852. Brasília: CONAB.
- CRUZ, C. D. (2008) *Programa Genes: diversidade genética*. UFV.
- CUBETA, M. A. (1997) Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 87, n. 10, p. 1000-1004.

DANTAS, S.A.F. (1999). Métodos de inoculação de *Sclerotium rolfsii* Sacc., identificação de fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e caracterização dos isolados do patógeno. (Tese de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

DURMAN, S. B.; MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. M. (2003) Mycelial compatibility groups in Buenos Aires field populations of *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae). Australian Journal of Botany, Melbourne, v. 51, n. 4, p. 421-427.

EDEL, V., STEINBERG, C., AVELANGE, I., LAGUERRE, G., AND ALABOUVETTE, C. (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathology 85:579-585.

GOMES EV, NASCIMENTO LB, FREITAS MA, NASSER LCB (2011). Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. J. Phytopathol. 159: 94-99.

GRABICOSKI, E. M. G. (2012). Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e detecção em sementes de soja. Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.

HENSON, J. M., BUTLER, M. J., & DAY, A. W. (1999). The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 447-471.

KARIMI, E., SAFAIE, N., SHAMS-BAKHSH, M. (2011). Assessment of genetic diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* populations in canola fields by rep-PCR. *Trakia Journal of Science*, 9(2), 62-68.

KAWASAKI, V. H. ; MACHADO, J. C. (2013) Establishment of a semi-selective method for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean and soybean seeds. Journal of Seed Science, v. 35, p. 435-442.

KOHLI, Y.; KOHN, L. M. (1998). Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v. 23, n. 2, p. 139-149.

KOHN, L. M. (1979) "A monographic revision of the genus *Sclerotinia*." *Mycotaxon* 9.2: 365-444.

KOHN, L. M. et al. Marker stability throughout 400 days of in vitro hyphal growth in the filamentous ascomycete, *Sclerotinia sclerotiorum*. (2008) *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v. 45, n. 5, p. 613- 617.

KREYCI, P. F. (2016) “*Sclerotinia sclerotiorum*: características morfológicas, agressividade, sensibilidade "in vitro" a fungicidas e resistência de isolados a tiofanato metílico”. Tese de Doutorado. Piracicaba: ESALQ.

LEHNER MS, PAULA JÚNIOR TJ, TEIXEIRA H, VIEIRA RF (2011). Morphological variability of *Sclerotinia sclerotiorum* sampled from bean fields in Minas Gerais State, Brazil. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 54: 128-129.

LEHNER MS, PAULA TJ JÚNIOR, HORA BT JÚNIOR, TEIXEIRA H, VIEIRA RF, CARNEIRO JES. (2015). Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathol.* 64:921–931.

LEHNER, M. S., PAULA JÚNIOR, T. J., SILVA, R. A., VIEIRA, R. F., CARNEIRO, J. E. S., & MIZUBUTI, E. S. (2014). Sclerotia morphology traits and mycelial growth rate are not informative variables for population studies of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Tropical Plant Pathology*, 39(6), 471-477.

LESLIE, J.F. (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annual Review Phytopathology* 31:127-150.

LI Z, ZHANG M, WANG Y, FERNANDO WGD (2008) Mycelial compatibility group and pathogenicity variation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower from China, Canada and England. *Plant Pathology* 7:131–139.

LITHOLDO JÚNIOR, C. G.; GOMES, E. V.; LOBO JÚNIOR, M.; NASSER, L. C. B.; PETROFEZA, S. (2011) Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n. 2, p. 868-877.

MCDONALD, J. G., WONG, E., & WHITE, G. P. (2000). Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 84(10), 1121-1125.

MERT-TURK F, IPEK M, MERMER D, NICHOLSON P (2007) Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale province of Turkey. *Journal of Phytopathology* 155: 182–187.

NEI M, (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70, 3321–3.

OLIVEIRA, J. A. (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.) 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PURKAYASTHA, S., KAUR, B., ARORA, P., BISYER, I., DILBAGHI, N. CHAUDHURY, A., (2008) Molecular genotyping of *Macrophomina phaseolina* isolates: comparison of microsatellite primed PCR and repetitive element sequence-based PCR. *Phytopathology*, 156:372-381.

SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. (2008). *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer, Berlin, Germany.

SCHAFER, M.R.; KOHN, L.M. (2006) An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, v.98, p.593-597.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. (2004) Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Current Genetics*, New York, v. 46, n. 6, p. 357- 365.

STEADMAN, J.R. (1983). White mold: a serious yield-limiting disease of bean. *Plant Disease* 67: 346-350.

TODA T, HYAKUMACHI M, ARORA DK, (1999). Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiological Research* 154, 247–58.

VLEUGELS T, BAERT J, BOCKSTAELE EV (2013) Morphological and pathogenic characterization of genetically diverse *Sclerotinia* isolates from European red clover crops (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Phytopathology* 161:254-262.

YEH, F. C., YANG, R. C., BOYLE, T. B., YE, Z. H., & MAO, J. X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada*,10.

ZANCAN WLA, STEADMAN JR, HIGGINS R, JHALA R, MACHADO JC. (2015). Genetic and aggressiveness variation among *Sclerotinia sclerotiorum* dry bean isolates from Brazil fields. *Bioscience J.*; 31:1143–1151.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As culturas da soja e do feijão estão entre os principais cultivos da produção agrícola no país, os quais movimentam a cadeia produtiva do agronegócio, contudo, ainda apresentam produção abaixo do esperado e isso, provavelmente, está relacionado a alguns fatores, dentre estes, as doenças, com destaque para o mofo-branco, que é causado pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. O fungo pode ser transmitido por sementes e este pode causar sérios prejuízos à agricultura no Brasil e no mundo.

Pelo fato do patógeno possuir uma ampla gama de hospedeiros, possuir sobrevivência no campo por longos períodos, o seu controle passa a se tornar um desafio para o produtor. O manejo da doença deve ser adotado para se obter sucesso no controle no campo. Dentre as principais medidas, que atuam de forma preventiva da doença, está o uso de sementes saudáveis, pois, por meio desta, é possível evitar a entrada do patógeno em novas áreas e assim evitar a sua disseminação a longas distâncias.

O mofo-branco, quando detectado, pode trazer consequências graves em um campo de produção, tais como: redução do rendimento e na qualidade de sementes, uma vez que a contaminação das mesmas pode constituir um problema grave, podendo resultar em rejeição do lote de sementes. O nível de tolerância proposto pelo MAPA, junto aos programas de certificação, tanto para sementes de soja, quanto para sementes de feijão, é zero, e isso consequentemente pode afetar a economia trazendo sérios prejuízos ao produtor já que esta é considerada uma praga não quarentenária regulamentada.

O presente estudo teve como propósito avaliar por meio dos potenciais de inóculo estabelecidos, as implicações da associação de *S. sclerotiorum* com sementes de soja e feijão e sua quantificação, pois através desta, pôde-se constatar a presença do patógeno nas suas partes mais internas, como o embrião. Também foi possível verificar neste estudo, a real condição de lotes de sementes, oriundos de uma das principais regiões produtoras de feijão, em relação à presença do patógeno e o grau de variabilidade existente dentro de um lote e entre lotes.

A partir dos resultados alcançados, pôde-se constatar a importância dos testes aplicados para a confirmação da presença do patógeno, assim como, a validação do termo potencial de inóculo, que é a habilidade do patógeno em infectar uma semente a partir de determinada tempo de contato, é prática comum, na qual é possível verificar o dano causado

pelo patógeno. Esses danos foram evidentes em plantas pelo teste de emergência, na qual se confirmou que, o patógeno mesmo em pouco contato com as sementes, ou seja em baixo potencial de inóculo, pode causar uma redução significativa no número de plantas emergidas. A concentração de DNA detectada nas partes das sementes, principalmente no embrião, mesmo em baixa quantidade, é uma indicação do efeito danoso do patógeno na qualidade de sementes de soja e feijão na forma de deterioração e morte de sementes. Outro fator agravante confirmado neste trabalho foi a variabilidade do fungo *S. sclerotiorum* encontrada nos lotes de sementes, pois a qualidade de lotes que estão sendo comercializados e a variabilidade existente do patógeno dentro de um lote, passa ser algo preocupante, principalmente em razão da dificuldade encontrada em controlar esta doença.

De modo geral, os conhecimentos advindos a partir deste estudo, tanto colaboram com os programas de certificação de sementes, como também, fornece informações que podem dar subsídios ao estabelecimento de padrões sanitários para que o produtor não tenha sua produção comprometida pelo mofo-branco. É importante ressaltar que além da contribuição com os programas de controle, os resultados deste estudo também colaboram de forma indireta para a elaboração de um sistema de manejo integrado mais eficaz e eficiente da referida doença.