

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO

EDILAINE MAURICIA GELINSKI GRABICOSKI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary E
DETECÇÃO EM SEMENTES DE SOJA**

PONTA GROSSA

2012

EDILAINÉ MAURÍCIA GELINSKI GRABICOSKI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary E
DETECÇÃO EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. David de Souza Jaccoud
Filho

PONTA GROSSA – PR

2012

G728c Grabicoski, Edilaine Mauricia Gelinski
Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e detecção em sementes de soja / Edilaine Mauricia Gelinski Grabicoski. Ponta Grossa, 2012.
136f.
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração : Fitopatologia) , Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

1. Mofo branco. 2. Populações. 3. *Glycine max*. 4. Detecção molecular. 5. PCR. 6. Inibidores. I. Jaccoud Filho, David de Souza. II. T.

CDD: 632



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

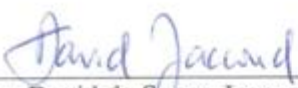
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

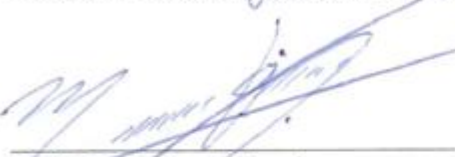
Título da Dissertação: "CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *SCLEROTÍNIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY E DETECÇÃO EM SEMENTES DE SOJA".

Nome: Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski

Orientador: David de Souza Jaccoud Filho

Aprovado pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho


Prof. Dr. Marcos Pileggi


Prof.^a. Dr.^a. Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre

Data da Realização: 09 de fevereiro de 2012.

À minha mãe Maria Gelisnki e aos meus
padrinhos Divanir Eulália Naréssi Munhoz e José
Alinor Munhoz,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por todas as bênçãos recebidas e por mais essa vitória.

Ao Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho, pelo apoio, amizade, confiança e pela contribuição com seus conhecimentos e sugestões na orientação e condução desse trabalho.

À minha amada escola de Agronomia, e a toda a Universidade Estadual de Ponta Grossa, por ter sido minha segunda moradia durante esses sete anos de estudo, e pela honra e privilégio de ter estudado aqui.

À Capes, pela Bolsa Concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela aprovação e auxílio financeiro ao Projeto Edital 064/2008-3.

À minha querida Família F-12: Prof. David, Luciane, Zima, Carlos Rafael, Raquel, Claudio, Miguel, Marcelo, Ayrton, Felipe, Matheus, Lucas, Hamilton, Guilherme, Camila, Rubiane, César, Daniele e Janaine, pela amizade, ajuda, companheirismo e por serem tão especiais para mim.

À Nilcélia, secretária do Mestrado de Agronomia, à Denise e ao Robson, secretários gerais dos Programas de Pós-graduação da UEPG, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao coordenador do curso de Mestrado (Prof. Dr. Adriel Ferreira da Fonseca), por todo auxílio e atenção, e principalmente pela dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

A todos os professores e colegas do Mestrado, pelo tempo e conhecimento compartilhado, em especial ao Prof. Dr. Rodrigo Matiello e à sua orientada Dayane pelo apoio; e às minhas queridas Patrícia, Raquel e Nataly, pela amizade, apoio e parceria.

Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi e à Prof^a. Dr^a Sônia Pileggi, pela amizade, pela paciência e por todo o apoio e compreensão sempre; e a todo o pessoal do laboratório de microbiologia, principalmente a Jana.

Ao pessoal do Laboratório de Genética da Profa. Dr^a. Mara Matiello, pelo apoio e pela amizade.

A todos os queridos funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, principalmente a Ana, “tia” Lúcia, “tia” Edite; às telefonistas Maristela, Kátia e Tânia; ao César, Jilmar; aos laboratoristas Jaque, Dirce, Verônica, Wilson, Nilson e Luzia, por toda a amizade, simpatia e pelo constante apoio.

Ao Eng. Agr. Robson de Paula (e demais integrantes da equipe Pioneer), ao Prof. Dr. João Vida (UEM), ao Prof. Dr. Juliatti e ao Dr. Ailton Reis, pela colaboração no envio de isolados de *Sclerotinia* de outras regiões.

Ao Senhor José Bento Azambuja Germano, Eng^o.Agr^o. Ely de Azambuja Germano Neto, Sr. Ivo Frare, Sr. Antônio Luiz Frare, Sr. Herculano, Sra. Joelma, Sr. Claudinei, Sr.

Júlio, Seu Luís e aos demais funcionários da Fazenda Mutuca, pelo grande incentivo à pesquisa e por todo carinho e apoio recebido.

Ao Eng^oAgr^o Joaquim Mariano Costa e ao Eng^oAgr^o José Ricardo Pedron e demais integrantes da equipe da Coamo pelo grande incentivo à pesquisa e por todo apoio recebido.

Ao Eng^oAgr^o Carlos Klenki e equipe da cooperativa Bom Jesus pelo apoio.

À equipe da cooperativa Castrolanda, principalmente ao Eng^oAgr^o Charles Allan Telles e Eng^oAgr^o Enio de Oliveira, pelo apoio.

À cooperativa Batavo, principalmente ao Eng^oAgr^o Luiz Henrique Deschamps, pelo apoio.

Ao Eng^oAgr^o André Giostri e seu gerente Orlei; ao Reinaldo Garmater e seu gerente Eloir; ao Eng^o.Agr^o Edimilson Rickly e ao Eng^oAgr^o Carlos Olivetti da Empresa Futuragro, e ao Eng^oAgr^o José Ariovaldo Sartori, e à empresa Forquímica, pelo apoio sempre.

Aos demais produtores, cooperativas e empresas que colaboram com o desenvolvimento do nosso projeto.

Aos professores Dr^a Ana Dionísia L. C. Novembre, Dr. Marcos Pileggi, Dr^a Maristella Dalla Pria e Dr Osmar Paulo Beckert, que em muito contribuíram com suas sugestões e observações.

Finalmente, e muito especial a toda a minha família, principalmente, à minha mãe, Maria Gelinski, aos meus padrinhos, Divanir E. N. Munhoz e José Alinor Munhoz, pelo incentivo, carinho, proteção, educação e muitos ensinamentos. À minha querida irmã Paula, pela eterna parceria, e aos meus queridos irmãos, cunhados e sobrinhos de coração Cecília e Fábio, Alexandre e Cíntia, Cesár, Filipe e Enrico. Ao meu pai José Marcos Grabicoski. E aos meus pais de coração Geraldo T. Ahrens (*in memorian*) e Paulo Renato Friedrich.

A todos os meus queridos amigos, que sempre estiveram me apoiando.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa, agradeço sinceramente.

O prazer do trabalho aperfeiçoa a obra. (Aristóteles)

RESUMO

O Mofo branco, doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, vem causando grandes prejuízos na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e, por apresentar mais de 400 hospedeiros e a formação de uma estrutura de resistência (escleródios), o seu controle torna-se difícil, aumentando a importância do patógeno para a agricultura brasileira. As sementes são o principal meio de disseminação da doença, detectar rápido e corretamente a presença do patógeno nas mesmas é importante no controle do Mofo branco, principalmente, para não infestar áreas isentas do patógeno. No presente trabalho, 57 isolados de *S. sclerotiorum* foram caracterizados morfológica e patologicamente para avaliar variações dentro da espécie. Também se desenvolveu uma metodologia de detecção do patógeno em sementes de soja embebidas, através de PCR diretamente do líquido de embebição das mesmas. Comparou-se a metodologia proposta com as tradicionais recomendadas para o patógeno. Os isolados do patógeno apresentaram algumas variações morfológicas entre si, como quantidade e peso dos escleródios formados. Patologicamente, foram verificados dois e sete níveis de patogenicidade segundo, respectivamente, a inoculação dos isolados na haste e em trifólios destacados de plantas de soja. Diretamente a partir do líquido de embebição das sementes, foi possível detectar uma semente artificialmente contaminada em 400 sementes totais. Em sementes naturalmente contaminadas, detectou-se a presença do patógeno em amostra que, segundo o método de incubação em rolo de papel e em Neon-S apresentava, respectivamente, 1 e 3 sementes contaminadas em quatrocentas totais. A metodologia proposta é promissora para a detecção de *S. sclerotiorum*, no entanto, necessita de otimização, pois muitos resultados falsos-negativos foram obtidos, principalmente devido a substâncias liberadas pelas próprias sementes que inibiram a reação de PCR. A utilização de um filtro nas amostras apresentou-se como uma possível ferramenta para driblar os inibidores de PCR. Para a otimização do método, técnicas como Nested-PCR, Real-Time PCR, utilização de sondas de DNA, aumento no tamanho de amostras de sementes e a utilização dos filtros podem ajudar a superar essas dificuldades.

Palavras-chave: Mofo branco. Populações. *Glycine max*. Detecção molecular. PCR; Inibidores.

ABSTRACT

The white mold disease, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, responsible for large losses in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). The pathogen has more than 400 hosts and presents the formation of a resistance structure (sclerotia), difficulting the disease control, thus increasing the importance of the pathogen in Brazilian agriculture. The seeds are the main spreading disease means, a quickly and correct presence detection of the pathogen is important to control the white mold, especially for non-infested areas by the pathogen. In this study, 57 *S. sclerotiorum* isolates were morphological and pathologically characterized to assess variations within the specie. Also was developed a method to detect the pathogen directly from seed-soak liquor of infected soybean seeds, through PCR. The proposed method was compared to the traditional recommended methods. The pathogen isolates showed some morphological variations among themselves, as the number and weight of the formed sclerotia. Pathologically, were observed two and seven pathogenic levels second, respectively, the soybean inoculation on the stem and on the detached trifoliate leaves. By the detection method, it was possible to detect one seed artificially contaminated in the sample with 400 total seeds. In naturally contaminated seeds, was possible to detected the pathogen presence in a sample that, according to the method of incubation on paper roll and on Neon-S medium, respectively, presented 1 and 3 seeds contaminated in four hundred seeds. The proposed methodology is promising for the detection of *S. sclerotiorum*, however, requires optimization because many false negative results were obtained, mainly due to substances released by the seeds that inhibited the PCR reaction. The use of filter in the samples has presented as a possible tool to overcome the PCR inhibitors. For the optimization of the method, increase the size of seed samples, use of filters, others techniques such as nested PCR, Real-Time PCR and DNA probes can help overcome these difficulties.

Keywords: White mold. Populations. *Glycine max*. Molecular detection. PCR. Inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO GERAL

- 1- Sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do Mofo branco, em plantas de soja..... 25
- 2- Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador do Mofo branco na soja 26

CAPÍTULO I

- 1.1- Demarcação do local da coleta de cada isolado utilizado, segundo o mapa do Paraná..... 33
- 1.2- Demarcação da localização da coleta dos isolados, segundo o estado brasileiro de sua origem..... 34
- 1.3- Representação das espessuras (características) do crescimento micelial apresentada pelos isolados. R – Micélio ralo (Isolado I-08); I – Micélio irregular (Isolado I-05) e A – Crescimento micelial abundante (Isolado I-34)..... 41
- 1.4- Isolados com mesma idade (12 dias após incubação), demonstrando a diferença entre os isolados quanto ao tempo necessário para a formação de escleródios. A – Isolado I-06; B – Isolado I-34..... 42
- 1.5- Placas de Petri contendo os isolados com diferentes quantidades de escleródios por placa, separados segundo teste Skott-Knott a 1% de probabilidade. A – 54 escleródios (Isolado I-01); B – 41 escleródios (Isolado I-26); C – 29 escleródios (Isolado I-10) e D - 17 escleródios (Isolado I-07)..... 43
- 1.6- Placa com isolado I-19, que apresenta seus escleródios com diferentes formas e tamanho em uma mesma placa de Petri..... 44
- 1.7- Isolado I-05, que apresenta formação de escleródios similares entre si..... 44
- 1.8- Diferentes tamanhos e formatos apresentados pelos escleródios..... 44
- 1.9- Isolados de *S. sclerotiorum*, inoculados em haste de plantas de soja onde A: I-54 (Serralha – Ponta Grossa-PR e B: I-30 (Guaragi-PR), após 96 horas de inoculação..... 48
- 1.10- Comparação entre os diferentes níveis de patogenicidade, segundo a formação da lesão em trifólio de soja, após 72 horas de inoculação. A: I-48 (Arinos-MG); B: I-15 (Guarapuava-PR); C: I-50 (Girassol – Ipiranga-PR); D: I-06 (Pinhão-PR); E: I-14 (Carambeí-PR); F: I-51 (Couve – Ponta Grossa-PR) e G: I-28 (Ponta Grossa-PR)..... 61

CAPÍTULO II

- 2.1- Sementes embebidas em água ultra-pura, na proporção de 100 sementes/100 mL de água, em um total de 400 sementes, prontas para a retiradas das alíquotas com o auxílio de uma micropipeta..... 76
- 2.2- Amplificação de um fragmento específico de 278 bp, através de reação de PCR com o par de primers específicos de *S. sclerotiorum* SSFWD/SSREV e o DNA dos isolados de *S. Sclerotiorum* . Controle Positivo: 10 ng do DNA do isoaldo padrão. Controle Negativo: Amostras sem DNA..... 79
- 2.3- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR utilizando um par de primers específicos para *S. sclerotiorum* (SSFWD/SSREV) e 10 ng de DNA de diversos fungos transmitidos pela semente de soja. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controles positivos: 5, 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 80
- 2.4- Amplificação por meio de PCR, utilizando o par de primers da região ITS (ITS4/ITS5) e 10 ng de DNA de diversos fungos transmitidos pela semente de soja e o DNA de soja. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controle positivo:10 ng de DNA do isolado padrão..... 80
- 2.5- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e a não amplificação de bandas de alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, e, 72 horas, retiradas do líquido de embebição das sementes sadias. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 81
- 2.6- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas do líquido de embebição das sementes sadias com 10 ng de DNA de *S. sclerotiorum*. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 82
- 2.7- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas de soluções incubadas de micélio ou de escleródio de *S. sclerotiorum*. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controle positivo:10 ng de DNA do isolado padrão..... 83
- 2.8- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 0 hora. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 84
- 2.9- Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 4 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 85
- 2.10- Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes após 8 horas de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles

Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	85
2.11- Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR, com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes após 12 horas de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	86
2.12- Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR, com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 24 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	87
2.13- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 48 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	87
2.14- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 72 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão Jataí-GO.....	88
2.15- Líquido de embebição de sementes sadias após 0, 12, 24, 48 e 72 horas de embebição e a condição da semente após esses períodos.....	89
2.16- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de amostra de sementes com 75% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	90
2.17- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de amostra de sementes com 50% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	90
2.18- Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes com 25% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	91
2.19- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 5% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	92
2.20- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 2,5% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.....	93

- 2.21- Amplificação do fragmento específico de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes da com 1% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 94
- 2.22- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 0,25% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão..... 94

CAPÍTULO III

- 3.1- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 5%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 107
- 3.2- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 50%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 108
- 3.3- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 80%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 109
- 3.4- “Blotter test” – Sementes com formação de micélio branco característico de *S. sclerotiorum* com (Tracejado vermelho) e sem (Tracejado verde) a presença de escleródios 110
- 3.5- Método de Rolo de Papel: Formação de escleródios externamente aos rolos de papel..... 110
- 3.6- Método Rolo de papel: papel com partes deterioradas e, ou, em decomposição. 111
- 3.7- Método Neon-S: A –Formação do halo amarelado característico sob diversas sementes; e B – Formação do halo amarelado sob sementes contaminadas por outros microrganismos..... 111
- 3.8- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial A (Ponta Grossa-PR) da cultivar CD 231 RR, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 114

- 3.9- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial B (Teixeira Soares-PR) da cultivar CD 219, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 114
- 3.10- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial C (Ponta Grossa-PR), da cultivar BRS 255 RR, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 115
- 3.11- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial D (Carambeí), da cultivar CD 206, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 115
- 3.12- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial E (Ventania-PR), da cultivar Don Mario 5,8i, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 116
- 3.13- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial F (Ipiranga-PR) da cultivar BRS 255, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 116
- 3.14- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial G (Ventania-PR) da cultivar Spring, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 117
- 3.15- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 1: Amostras 1 a 8). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 119

- 3.16- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 2: Amostras 9 a 16). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 120
- 3.17- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 3: Amostras 17 a 24). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 120
- 3.18- Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 4: Amostras 25 a 31). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão..... 121

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1.1-	Caracterização do local e hospedeiro de origem, ano de coleta e coletor de cada isolado de <i>S. sclerotiorum</i> utilizado.....	34
1.2-	Caracterização morfológica dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> e o resultado da comparação das médias entre os isolados.	39
1.3-	Resultado da avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> em inoculação na haste de plantas de soja, e o resultado do teste de médias segundo os teste estatísticos de Tukey e Skott-Knott, a 1% de probabilidade.....	46
1.4-	Comparação do resultado da avaliação do tamanho da lesão formada, 96 horas após a inoculação dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> na haste de plantas de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade, as características de cada região de coleta dos isolados e características morfológicas dos isolados.....	49
1.5-	Resultados obtidos na avaliação realizada 96 horas após a inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> na haste de plantas de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott (1% de probabilidade) e as características morfológicas de cada isolado.....	51
1.6-	Média dos resultados das características consideradas, segundo cada nível de patogenicidade pela inoculação dos isolados na haste de plantas de soja, e o resultado de comparação de médias.....	52
1.7-	Avaliações do diâmetro médio das lesões segundo a inoculação de diferentes isolados de <i>S. sclerotiorum</i> em trifólios de soja, e o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade.....	53
1.8-	Resultados obtidos na avaliação 60 horas AI dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> , quando estes foram inoculados em trifólios de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade e as características de cada região dos isolados.....	55
1.9-	Resultados obtidos na avaliação 60 horas após inoculação (AI) dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> , quando estes inoculados em trifólios de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade e as características morfológicas de cada isolado.....	58
1.10-	Níveis de patogenicidade segundo a inoculação em trifólios de soja dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> 60 horas AI, e a média dos critérios avaliados, segundo cada nível.....	60
1.11-	Comparação do resultado da inoculação dos isolados na haste e em trifólios de soja, nas avaliações de 96 horas e 60 horas AI, respectivamente.....	63

CAPÍTULO III

3.1- Resultado da incidência de <i>S. sclerotiorum</i> nas amostras de sementes de soja coletadas de plantas naturalmente infectadas com o patógeno, em diferentes níveis de severidade.....	105
3.2- Resultado dos testes de detecção tradicionais recomendados para <i>S. sclerotiorum</i> , com quatro repetições (R1, R2, R3, e R4) com amostras de sementes de soja retiradas de áreas comerciais.....	112
3.3- Comparação dos resultados das amostras de lotes comerciais de sementes de soja submetidas ao teste de detecção de <i>S. sclerotiorum</i> de incubação em Rolo de Papel e método molecular com avaliação as 3 e as 6 horas de embebição....	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2	REVISÃO GERAL.....	22
2.1	Cultura da Soja (<i>Glycine max</i> L.)	22
2.2	Mofo branco (<i>S. sclerotiorum</i>)	23
2.2.1	Histórico	23
2.2.2	Taxonomia	23
2.2.3	Etiologia.....	24
2.2.4	Sintomas na cultura da soja	24
2.2.5	Disseminação e sobrevivência.....	25
2.2.6	Controle	26
 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE <i>S. sclerotiorum</i>.....		28
RESUMO.....		28
ABSTRACT.....		29
1	INTRODUÇÃO	30
2	OBJETIVO	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Obtenção dos isolados	33
3.2	Caracterização morfológica de isolados de <i>S. sclerotiorum</i>	36
3.2.1	Germinação miceliogênica	36
3.2.2	Germinação carpogênica	36
3.3	Caracterização patogênica de isolados de <i>S. sclerotiorum</i>	37
3.3.1	Inoculação na haste.....	37
3.3.2	Inoculação no trifólio.....	38
3.4	Análise estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Caracterização morfológica	39
4.2	Caracterização patogênica	46
4.2.1	Inoculação na Haste	46
4.2.2	Inoculação no Trifólio	53
5	CONCLUSÃO	65

**CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE DETECÇÃO
MOLECULAR DE *S. sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA..... 66**

RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 OBJETIVO	71
3 MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1 Extração de DNA	72
3.1.1 <i>S. sclerotiorum</i>	73
3.1.2 Outros fungos	73
3.1.3 Soja	74
3.2 PCR da região ITS	74
3.3 PCR com os primers específicos SSFWD/SSREV.....	75
3.4 PCR de micélio e escleródio de <i>S. sclerotiorum</i>	75
3.5 Amostra de sementes de soja sadia.....	76
3.6 Sementes artificialmente infectadas	77
3.7 Sementes inoculadas artificialmente e sementes sadias.....	77
3.8 Análise de resultados	78
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 Eficiência e especificidade do par de primers específicos para a detecção.....	78
4.2 Sementes Sadias	81
4.3 PCR com micélio e escleródio de <i>S. sclerotiorum</i>	82
4.4 Sementes artificialmente inoculadas	83
4.5 Sementes artificialmente inoculadas e sementes sadias	89
5 CONCLUSÃO	96

**CAPÍTULO III – COMPARAÇÃO DO TESTE DE DETECÇÃO
MOLECULAR COM OUTROS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE
S.sclerotiorum EM SEMENTES DE SOJA..... 97**

RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	98
1 INTRODUÇÃO	99
2 OBJETIVO	102
3 MATERIAL E MÉTODOS	102
3.1 Amostras de sementes	102
3.1.1 Sementes aparentemente sadias, mas oriundas de plantas infectadas.....	102
3.1.2 Sementes de soja de áreas comerciais de produção de sementes	102
3.1.3 Sementes de soja de lotes comerciais	103
3.2 Testes de detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja	103
3.2.1 Métodos tradicionais recomendados para a detecção de <i>S. sclerotiorum</i>	103

3.2.2	Método de detecção molecular de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja	103
3.2.2.1	Coleta das amostras	103
3.2.2.2	Reação em cadeia da polimerase - PCR (Polymerase chain reaction).....	104
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	105
4.1	Sementes oriundas de plantas infectadas	105
4.2	Sementes de áreas comerciais de soja	112
4.3	Sementes de lotes comerciais.....	117
5	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem grande importância mundial, apresentando produção de 263,7 milhões de toneladas na última safra (2010/2011), dos quais o Brasil, o atual segundo maior produtor, contribuiu com 75 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2011). O Paraná é o segundo maior produtor nacional, no entanto apresenta a maior produtividade entre os estados brasileiros (média de 3.360 kg.ha⁻¹) (CONAB, 2011).

Há diversos fatores que limitam a obtenção de rendimentos mais altos em lavouras de soja, e entre os principais estão as doenças. Uma das mais antigas e importantes doenças da soja é o Mofo branco, que tem causado perdas de até 60% (FERREIRA et al., 1979; YORINORI, et al., 1993; ALMEIDA et al., 2005). A doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que encontra-se distribuído mundialmente e possui mais de 400 espécies suscetíveis (BOLLAND, HALL, 1994; SAHARAN; MEHTA, 2008).

Segundo Chaves (1961), diversas características morfológicas foram observadas entre isolados deste fungo, como, por exemplo, a coloração micelial, velocidade de crescimento, quantidade, forma e tamanho dos escleródios produzidos, etc. Além das diferenças morfológicas, variações nos níveis de patogenicidade também foram detectadas entre os diferentes isolados de *S. sclerotiorum* (GARCIA, 2008), inclusive com relatos de hipovirulência (WILLIAMS et al., 2010).

Os escleródios produzidos pelo fungo são estruturas de resistências, que podem permanecer viáveis no solo por cerca de dez anos. Devido aos escleródios, o fungo *S. sclerotiorum* é de difícil erradicação, então, o mais importante é evitar a introdução de inóculo na área (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

S. sclerotiorum pode ser disseminado de diversas maneiras, entre elas através de sementes, a principal fonte de inóculo primário da doença (KULIK; SINCLAIR, 1989; YANG et al., 1998; DHINGRA, 2005; ALMEIDA et al., 2005).

Detectar e identificar os patógenos de sementes é essencial (MEIJERINK, 1997; GOULART, 2005; ZAMBOLIM et al., 2005; ALMEIDA, 2005; CARREGAL et al., 2010), pois além da introdução do patógeno em áreas ainda não infestadas, pode introduzir raças mais agressivas em áreas já infestadas e ainda assegura a presença do patógeno em estádios

iniciais do desenvolvimento da cultura (PINTO, 2005), sendo zero o nível de tolerância para este patógeno no Brasil em lotes de sementes (BRASIL, 2009).

Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, reprodutibilidade, economicidade e rapidez de resultados (MENTEN, 1985; SHEPPARD, 1993, PERES, 1996; NASSER, 1999; MACHADO; LANGERAK, 2002; BRASIL, 2009; HENNEBERG, 2011), mas todos baseados na incubação das sementes, o que pode demorar de 8 a 30 dias e apresentar resultados subjetivos (MCGEE, 2002). No entanto, é de extrema importância a sua rápida e correta detecção. Com isso, novas técnicas moleculares, principalmente baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), surgem e tem sido utilizadas como alternativas promissoras para o desenvolvimento de um teste rápido (poucas horas), prático e preciso de detecção de fungos em sementes (JACCOUD-FILHO, 1996; BLAKEMORE; REEVES, 2002; JACCOUD-FILHO et al., 2002a, b; JACCOUD-FILHO; DABUL, 2011).

O presente trabalho objetivou caracterizar morfológica e patogenicamente isolados de *S. sclerotiorum*, de diferentes regiões produtoras de soja e de diferentes hospedeiros, e desenvolver um teste para a sua detecção em sementes de soja.

2 REVISÃO GERAL

2.1 Cultura da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Planta da família das Fabáceas (leguminosas), originária da Ásia, a soja (*Glycine max* L.) tem uma semente que é utilizada para diversas finalidades: dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos, tendo grande importância mundial. Como principal fonte de proteína para a indústria da alimentação animal, a produção de soja tem crescido de forma suficiente para atender à demanda total por este produto, no entanto, nos últimos 5 anos houve, anualmente, um aumento médio de 5% na demanda da soja (AGRIANUAL, 2011).

Na última safra (2010/2011), a produção mundial do grão atingiu 263,7 milhões de toneladas, em uma área plantada de 103,5 milhões de hectares. O Estados Unidos possui a maior produção do grão, e o Brasil encontra-se como o segundo maior produtor de soja, alcançando 75,0 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (28,4% da produção mundial), em um total de área plantada com a cultura de aproximadamente 24 milhões de hectares (AGRIANUAL, 2011). Desse total, o Paraná contribuiu com mais de 20%, sendo o estado com a segunda maior produção, e a maior produtividade nacional de soja (média de 3.360 kg.ha⁻¹) (CONAB, 2011).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos em lavouras de soja, estão as doenças. Mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas, como consequência da monocultura, e pela introdução de novos patógenos. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20%, entretanto, algumas podem causar perdas totais (FERREIRA et al., 1979; YORINORI et al., 1993; ALMEIDA et al., 2005). Entre essas doenças temos a podridão de *Sclerotinia*, ou como é mais comumente conhecida, o Mofo branco, uma das mais antigas da soja (YORINORI et al., 1993).

2.2 Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary)

2.2.1 Histórico

Causada pelo fungo *S. sclerotiorum*, a doença, mais comumente conhecida como Mofo branco (PURDY, 1979), tem sido importante nos últimos anos. O patógeno está distribuído mundialmente e apresenta mais de 400 espécies vegetais suscetíveis (BOLAND, HALL, 1994; BOLTON et al., 2006; SAHARAN; MEHTA, 2008), entre as quais temos culturas de grande importância econômica, destacando-se a soja, o feijão, o girassol, a canola, o fumo, o tomate, a batata (LEITE, 2005), o algodão (CHARCHAR et al., 1999), a ervilha (CAFÉ FILHO, 1985), e outras.

No Brasil, essa doença foi relatada pela primeira vez em 1921, no Estado de São Paulo, na cultura da batata (SACCÁ, 1921 apud CHAVES, 1961) e, desde então, tem sido observada em outras culturas e estados do país (CHAVES, 1961; CAFÉ FILHO, 1985; CHARCHAR et al., 1999). Na cultura da soja, o fungo foi detectado pela primeira vez na Hungria em 1924 e depois nos Estados Unidos em 1946 (GRAU, 1989). Desde então, foi constatada em vários outros países. No Brasil, na cultura da soja, segundo Ferreira et al. (1979), foi detectada pela primeira vez no sul do estado do Paraná, apenas em 1975 por Homechin, com relatos de perdas de até 70% em campos de produção de sementes de soja. Até 2003/2004 o fungo apresentava ocorrência esporádica, mas, desde então, tem sido importante (JULIATTI et al., 2004; CARREGAL et al., 2010).

Atualmente, as epidemias causadas por esse patógeno na cultura da soja tem sido responsáveis pela diminuição da produção agrícola brasileira que, em condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, causa perdas de até 40% (ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; CARREGAL et al., 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2010c).

2.2.2 Taxonomia

O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary (syn. *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf; Dumont) pertence ao reino Fungi, à divisão dos Eumycotas e subdivisão Ascomycotina, ao filo Ascomycota, à classe dos Discomycetes, à ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (GRAU, 1989; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

2.2.3 Etiologia

Por ser da ordem Helotiales, o fungo produz escleródios bem desenvolvidos, que são agregados de hifas somáticas, de formato irregular, com 2 a 20 milímetros de diâmetro e comprimento, que são estruturas de resistência e garantem a sua sobrevivência em condições desfavoráveis. Os escleródios podem germinar de duas maneiras: carpogenicamente e miceliogenicamente (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

Sob condições de alta umidade e temperaturas entre 10 e 21 °C, os escleródios caídos na superfície do solo germinam, dando origem aos apotécios (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1989; ALMEIDA et al., 2005), que produzirão ascos (estrutura que assemelha-se a um saco), e dentro deste ascos, se formarão, após a meiose, esporos sexuais, denominados ascósporos. Já por meio da germinação miceliogênica, há a formação de micélio (filamentos tubulares, conhecidos como hifas) hialino e septado (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

Geralmente, quanto maiores os escleródios, maior a porcentagem de sua germinação e do número de apotécios produzidos. Por exemplo, um escleródio grande (13 x 5 mm) pode dar origem a até 15 apotécios (JULIATTI; GARCIA, 2008), provavelmente devido à maior quantidade de reservas (SAHARAN; MEHTA, 2008). O apotécio libera ascósporos continuamente por 2 a 17 dias, com uma média de nove dias (JULIATTI; GARCIA, 2008), podendo produzir até dois milhões de ascósporos por cada apotécio (STEADMAN, 1983).

2.2.4 Sintomas em plantas de soja

Na soja os primeiros sintomas de *S. sclerotiorum* são manchas encharcadas generalizadas, que evoluem para a coloração castanho-clara e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. Em poucos dias, o micélio transforma-se em massa negra e rígida, o escleródio, formado tanto na superfície como no interior das hastes e vagens infectadas (Figura 1) (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1988; GRAU, 1989; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005).

O fungo pode interferir na germinação das sementes, no desenvolvimento e estabelecimento de plântulas e também atacar toda a parte aérea, em qualquer estágio de desenvolvimento. Os sintomas ocorrem geralmente no terço médio das plantas atingindo a

haste principal, pecíolos, folhas e vagens. (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1988; GRAU, 1989; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004). Dependendo da intensidade poderá ocorrer o secamento total da planta e as perdas de produtividade são variáveis, em média de 25% (ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; BOLTON et al., 2006), mas atingindo 40% de perdas em alguns casos (JACCOUD-FILHO et al., 2010) ou até 50% a 60% (CARREGAL et al., 2010) em outros.



Figura 1 – Sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do Mofo branco, em plantas de soja (JACCOUD FILHO, 2010)

2.2.5 Disseminação e sobrevivência

O fungo *S. sclerotiorum* pode ser disseminado de diversas maneiras, dentre as quais pelas sementes, pelos implementos e maquinários agrícola infestados, solos infestados, plantas invasoras e tigueras suscetíveis ao patógeno, restos culturais e vento (JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; SAHARAN; MEHTA, 2008).

As sementes constituem a principal fonte de inóculo primário da doença, que pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) (KULIK; SINCLAIR, 1989; YANG et al., 1998; DHINGRA, 2005) quanto por escleródios misturados às sementes (KULIK; SINCLAIR, 1989; GOULART, 2005; ALMEIDA et al., 2005; DHINGRA, 2005). Em

sementes armazenadas, o fungo pode alcançar uma longevidade de até sete anos em algumas culturas (MACHADO,1999) e seus escleródios no solo podem permanecer viáveis por cerca de dez anos (FERREIRA et al., 1979; JULIATTI; JULIATTI, 2010).

O apotécio é um corpo de frutificação aberto, onde o himênio (camada de ascos) fica exposto, ocorrendo a liberação forçada e simultânea dos ascósporos, que são projetados e disseminados pelo vento, sendo, também considerados como fonte de inóculo primário da doença (Figura 2) (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

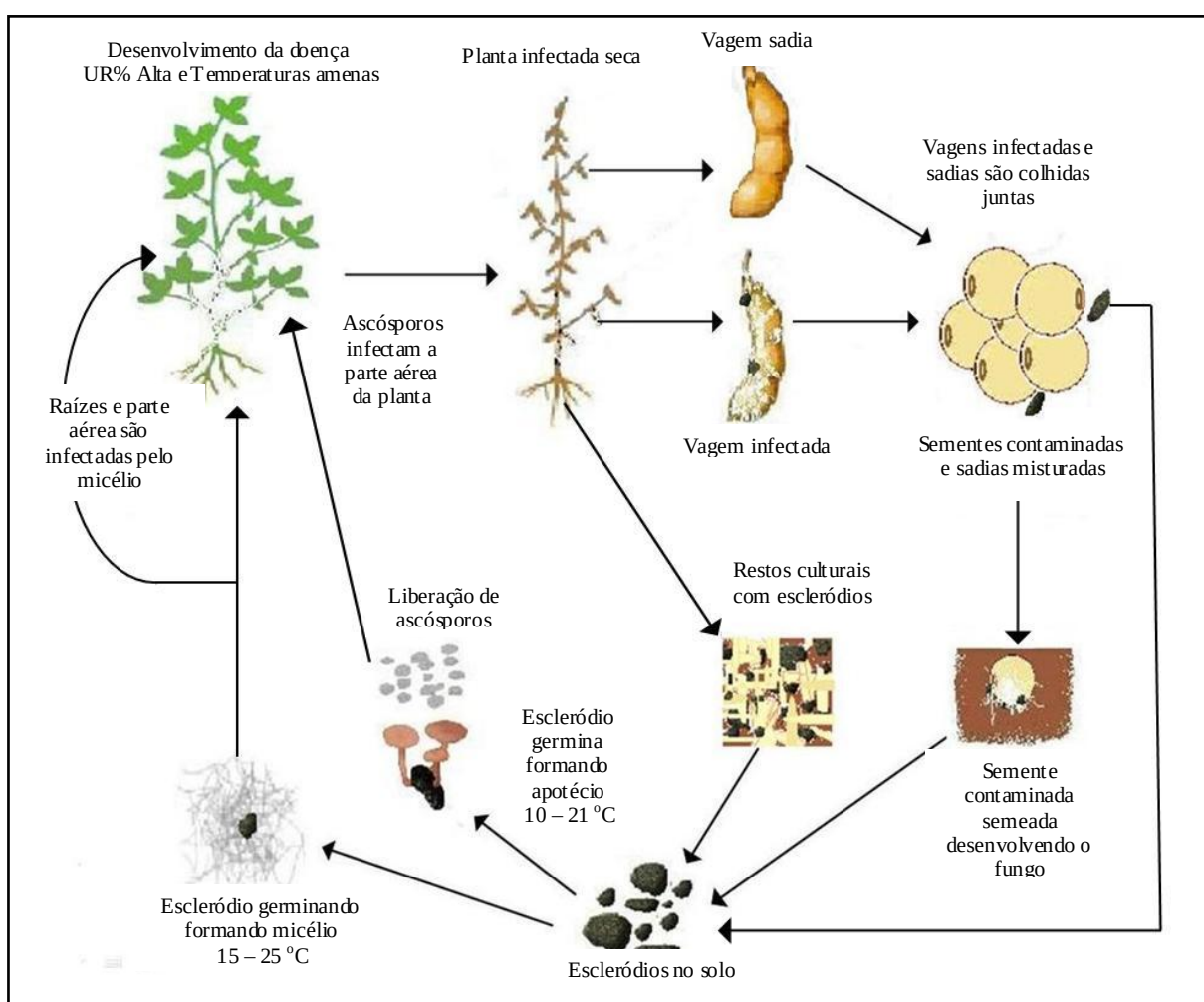


Figura 2 – Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador do Mofo branco na soja.

2.2.6 Controle

O mais indicado é seguir as recomendações de manejo integrado, pois medidas isoladas não proporcionam controle satisfatório para *S. sclerotiorum* (GRAU, 1988; GRAU, 1989; YORINORI et al., 1993; GRAU; HARTMAN, 1999; ALMEIDA et al., 2005; CARREGAL et al., 2010; JULIATTI; JULIATTI, 2010; JACCOUD-FILHO et al.,

2010a,b,c). No manejo integrado incluem-se medidas como o uso de sementes certificadas; rotação de culturas com gramíneas; preferência a cultivares de porte ereto; escolha da época de semeadura das culturas (JACCOUD FILHO et al., 2010b); evitar plantios adensados; utilizar plantio direto na palha; adubação nitrogenada equilibrada; controle de plantas daninhas suscetíveis e de plantas voluntárias; limpar e lavar máquinas e implementos agrícolas; utilizar controle químico, preferencialmente de forma preventiva (GRAU, 1988; GRAU, 1989; YORINORI et al., 1993; GRAU; HARTMAN, 1999; ALMEIDA et al., 2005; CARREGAL et al., 2010; JULIATTI; JULIATTI, 2010; JACCOUD-FILHO, 2010, MEYER et al., 2011; CAMPOS et al., 2011); tratamento de sementes (GOULART, 2005), controle biológico (ZENG; HAO, 2009; HIGHLAND, 2009; REZENDE et al., 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2010a) e controle alternativo, como extratos vegetais (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; GRABICOSKI; JACCOUD FILHO, 2009; GRABICOSKI et al., 2010).

Devido aos escleródios, o fungo *S. sclerotiorum* é de difícil erradicação (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1988; GRAU, 1989; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004; JULIATTI; JULIATTI, 2010), logo, o mais importante é evitar a introdução de inóculo na área. Detectar e identificar os patógenos de sementes é essencial para o controle de doenças transmitidas pelas sementes, como é o caso do Mofo branco (MEIJERINK, 1997; GOULART, 2005; ZAMBOLIM et al., 2005; ALMEIDA, 2005; CARREGAL et al., 2010), pois além da introdução do patógeno em áreas ainda não infestadas, ou de raças mais agressivas em áreas já infestadas, assegura a presença do patógeno em estádios iniciais do desenvolvimento da cultura (PINTO, 2005).

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGENICA DE ISOLADOS DE *S. sclerotiorum*

RESUMO

Em vista à importância do controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do Mofo branco da soja, é necessário utilizar medidas mais precisas e para isso, precisa-se entender a etiologia, morfologia e patogenicidade do patógeno em questão. Avaliou-se a morfologia e a patogenicamente de 57 isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões e de diferentes hospedeiros para verificar se existem variações intraespecíficas. Algumas diferenças morfológicas foram detectadas entre os isolados. Dois níveis de velocidade de crescimento micelial e de formação de escleródios *in vitro*; quatro níveis quanto à quantidade de escleródios formados e 11 níveis quanto ao peso dos escleródios formados foram verificados. A maior quantidade de escleródios formados (57,2), e o maior peso (23,0 mg) foram apresentados pelo isolado I-01 (Palmeira-PR) e I-47 (Maringá-PR), respectivamente. A menor quantidade (16,6) e o menor peso (3,7 mg) foram apresentados pelo isolado I-51 (Ponta Grossa-PR) e pelo isolado I-53 (Ponta Grossa-PR), respectivamente. Patogenicamente, foram observados dois e sete níveis patogênicos através da inoculação, respectivamente, em hastes e em trifólios de plantas de soja. Relacionando os resultados de patogenicidade obtidos pelas duas metodologias, com as características morfológicas e com as características dos locais de origem de cada isolado, não se observou relação entre os mesmos. Os dois métodos de inoculação apresentaram resultados diferentes com relação a alguns isolados. Pela inoculação da haste o isolado I-27 (Carambeí-PR) foi o mais patogênico e o I-01 (Palmeira-PR) e I-51 (Ponta Grossa-PR) os menos patogênicos. Na inoculação nos trifólios, o isolado I-47 (Maringá-PR) foi o mais patogênico e I-44 (Formosa-GO) o menos patogênico. Houve diferenças morfológicas e patogênicas entre os isolados.

Palavras-chave: Variação intraespecífica. Populações. Mofo branco. Soja.

ABSTRACT

Given the great importance of control of *Sclerotinia sclerotiorum*, that causes White mold on soybean, is necessary use more accurate measurements and for that is necessary to understand the pathogen etiology, morphology and pathogenicity. The morphology and pathogenicity of 57 *S. sclerotiorum* isolates from different regions and different hosts was evaluated to check intraspecific variation. Some morphological differences were detected among the isolates. Two levels of speed of mycelial growth and sclerotia formation *in vitro*, four and eleven levels, respectively, on the amount and on the weight of sclerotia formed were checked. The largest amount of sclerotia formed (57.2), and higher weight (23.0 mg) was presented by the isolated I-01 (Palmeira-PR) and I-47 (Maringá-PR), respectively. The lowest amount (16.6) and lower weight (3.7 mg) were presented by the isolated I-51 (Ponta Grossa-PR) and by the isolated I-53 (Ponta Grossa-PR), respectively. Pathogenically, were observed two and seven levels of pathogenicity when isolates were inoculated, respectively, on the soybean stems and on the soybean trifoliolate leaves. Relating the pathogenicity results obtained between the morphological characteristics and between the origin places of each isolate, no association was verified. The two inoculation methods showed different pathogenic results for some isolates. By inoculation on the soybean stem, the isolate I-27 (Carambeí-PR) was the most pathogenic and I-01 (Palmeira-PR) and I-51 (Ponta Grossa-PR) was the less pathogenic. In inoculation in trifoliolate leaves, the isolated I-47 (Maringá-PR) was the most pathogenic and the I-44 (Formosa-GO) was the less pathogenic. There were differences between the morphological and pathogenic isolates, showing intraspecific variation in these isolates.

Keywords: Intraspecific variation. White mold. Population. Soybeans.

1 INTRODUÇÃO

Em vista da importância do Mofo branco da soja, causada pelo fungo *S. sclerotiorum*, é necessário utilizar medidas precisas para se obter um bom controle e, para isso, é fundamental entender a etiologia, morfologia e patogenicidade deste fungo (KOHLI et al. 2003).

Em estudo com 114 isolados de *S. sclerotiorum* de 23 diferentes hospedeiros, Morral et al. (1972) verificaram variações na quantidade, formato e tamanho dos escleródios, entre outras características. Segundo Purdy (1954), variações culturais em *S. sclerotiorum* tem sido registradas e, em termos de raças, são designadas também com base no crescimento micelial, número de escleródios e produção de apotécio. Este autor separou os isolados em seu estudo em grupos segundo características miceliais, como seu crescimento e coloração, e características dos escleródios, como, por exemplo, seu formato (PURDY 1954).

Segundo descrição de Chaves (1961), *S. sclerotiorum* apresenta escleródios negros, com formas variadas, comprimento de 2 a 20 mm, diâmetro de 2 a 10 mm, cada um com produção de 1 a 22, ou mais, apotécios. Apesar da variação dos escleródios produzidos pelos diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, a formação dessas estruturas de resistência segue uma sequência de três fases, geral para todos: I - Iniciação (início da aglomeração micelial); II – Desenvolvimento (crescimento e agregação das hifas) e III – Maturação (delimitação da superfície, deposição da melanina nas células mais externas e consolidação interna) (TOWNSEND; WILLETS, 1954; SAHARAN; MEHTA, 2008). Normalmente, o início da produção de escleródios ocorre quando o crescimento micelial encontra limitação na obtenção de nutrientes.

Vários fatores podem influenciar a formação de escleródio, entre eles a temperatura, a luminosidade, nutrientes, pH. A formação de escleródios ocorre numa faixa de 0 a 30 °C, no entanto a maior produção encontra-se próximo aos 15 °C (SAHARAN; MEHTA, 2008).

Sob condições de alta umidade e temperaturas entre 10 e 21 °C, os escleródios caídos na superfície do solo germinam, dando origem aos apotécios que liberarão os ascósporos (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1989; ALMEIDA et al., 2005), principalmente em ambientes pouco nutritivos (LE TOURNEAU, 1979). Esta germinação pode ser dividida em quatro fases: I – Formação interna de muitos primórdios; II – Algumas estipes emergem da

superfície e continuam seu crescimento; III – Aparecimento de uma depressão na ponta da estipe até a formação completa do apotécio e, por fim, IV – Produção de ascos que após a diferenciação, formam oito ascósporos (LE TOURNEAU, 1979). Os apotécios são estipados, de 3,5 a 7 mm de diâmetro, de coloração parda clara, em forma de taça. Himênio côncavo a plano. Estipe de 0,7 a 1, 2 mm, que expande-se gradualmente, e comprimento de 4 a 8 mm (em boas condições de luminosidade) e pode passar de 20 mm em caso de deficiência de luz. Os ascos são cilíndricos, arredondados na extremidade superior e octospóricos (CHAVES, 1961). Geralmente, quanto maior os escleródios, maior é o seu potencial de produção de apotécios (JULIATTI; GARCIA, 2008).

E, por meio da germinação miceliogênica, há a formação de micélio (filamentos tubulares, conhecidos como hifas) hialino e septado (ALEXOPOULOS et al., 1996; MASSOLA; KRUGNER, 2011), normalmente com aspecto cottonoso e branco.

Há vários estudos sobre a caracterização morfológica de isolados de *S. sclerotiorum*. Willetts e Wong (1971) não observaram variações na cultura dos isolados estudados, visto que todos apresentaram padrões definidos (SERRA; SILVA, 2005; SAHARAN; MEHTA, 2008). Corradini (1989), em estudo com 19 isolados distintos, verificou que por meio de características morfológicas, não foi possível reunir estes isolados em grupos, pois não apresentaram características bem definidas, e quando esses 19 isolados foram inoculados em soja, apresentaram patogenicidade à cultura.

A habilidade da *S. sclerotiorum* para invadir e penetrar nos tecidos do hospedeiro depende de vários fatores, que incluem o tipo do inóculo (ascósporo e, ou, micélio), o nível de nutrição do fungo, as propriedades do hospedeiro e os efeitos do ambiente (LUMSDEN, 1979; SAHARAN; MEHTA, 2008). Segundo Boyle (1971) citado por Lumsden (1979) o fungo adere-se fortemente à superfície do hospedeiro, através de um material mucilaginoso, que permite ao fungo exercer força contra a cutícula hospedeiro, e penetrar mecanicamente no tecido do mesmo. Esta penetração mecânica não amolece os tecidos, não extravasa material celular ou causa qualquer modificação na cutícula do hospedeiro antes da invasão. Para a penetração mecânica através dos ascósporos, necessita-se de nutrientes externos para conseguir formar apressório capaz de invadir o hospedeiro (SAHARAN; MEHTA, 2008).

O fungo pode facilitar sua colonização no hospedeiro através da produção de uma vasta gama de enzimas que degradam a parede celular (LUMSDEN, 1979; ANNIS;

GOODWIN, 1997), fornecendo maior flexibilidade ao patógeno para a sua penetração e uma grande concentração de nutrientes assimiláveis (HANCOCK, 1966; LUMSDEN, 1969).

S. sclerotiorum é um dos diversos fungos que produz ácido oxálico que, segundo diversas teorias, tem a função de auxiliar na patogenicidade, na competição entre espécies de fungos e no controle de toxinas e nutrientes do ambiente (DUTTON, EVANS, 1996).

Especificamente com relação à patogenicidade, o ácido oxálico altera o pH, favorecendo a atividade de muitas enzimas que degradam a parede celular e, indiretamente, essa acidificação pode intoxicar o hospedeiro (NOYES; HANCOCK, 1981). O ácido oxálico também quelatiza o Ca^{2+} da parede celular, permitindo a hidrólise dos pectatos pelas pectinases, destruindo a integridade da parede celular da planta (BATEMAN; BEER, 1965) e, ainda, inibe as defesas das plantas e desregula as células guarda dos estômatos, provocando murcha foliar (CESSNA et al., 2000).

Os níveis de ácido oxálico têm sido relacionados aos níveis de severidade da doença. Há relatos de mutantes de *S. sclerotiorum*, deficientes na produção de ácido oxálico que não são patogênicos, fato que também se atribui à diminuição da atividade das enzimas que degradam a parede celular (GODOY et al., 1990), ou que permitem à planta se defender ao ataque do fungo (WILLIAMS et al., 2010).

Para testar a patogenicidade de *S. sclerotiorum*, vários métodos podem ser empregados, e uma das formas inclui discos de colônias em meio a base de ágar aplicados em folhagem, caules e botões florais que, após a inoculação devem ser mantidos em alta umidade, por pelo menos de 24 a 72 horas, em temperaturas entre 20 a 25 °C (PRATT, 1991).

2 OBJETIVO

Caracterizar morfológica e patogenicamente 57 isolados de *S. sclerotiorum*, de diferentes regiões e hospedeiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes e Defesa Fitossanitária, no Bloco de Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em Ponta Grossa - PR.

3.1 Obtenção dos isolados

Para as caracterizações, utilizaram-se escleródios de *S. sclerotiorum* coletados em regiões do estado do Paraná infestadas pelo patógeno, segundo a Figura 1.1. Escleródios de outras regiões brasileiras infestadas pelo patógeno foram enviados por diversos colaboradores, segundo a Figura 1.2.

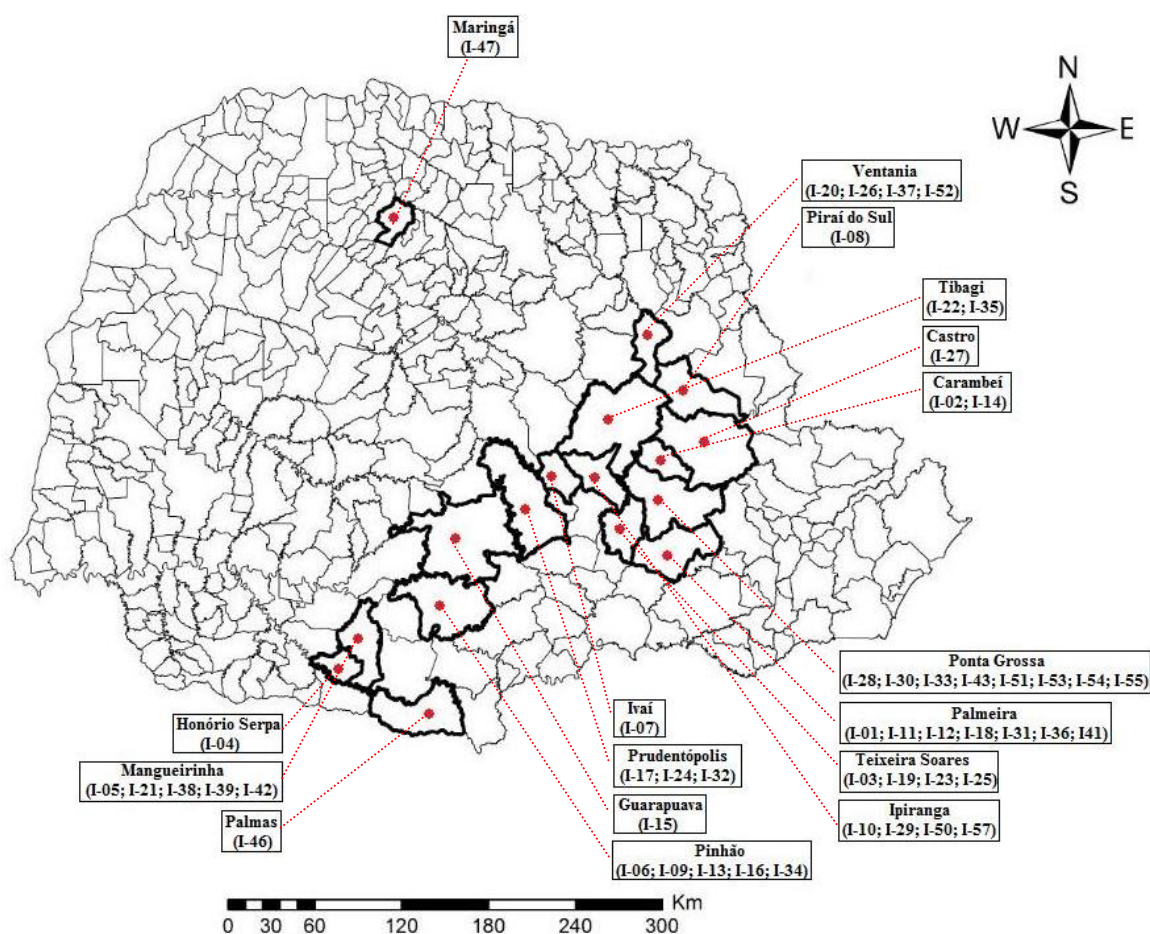


Figura 1.1- Demarcação do local da coleta de cada isolado utilizado, segundo o mapa do Paraná.

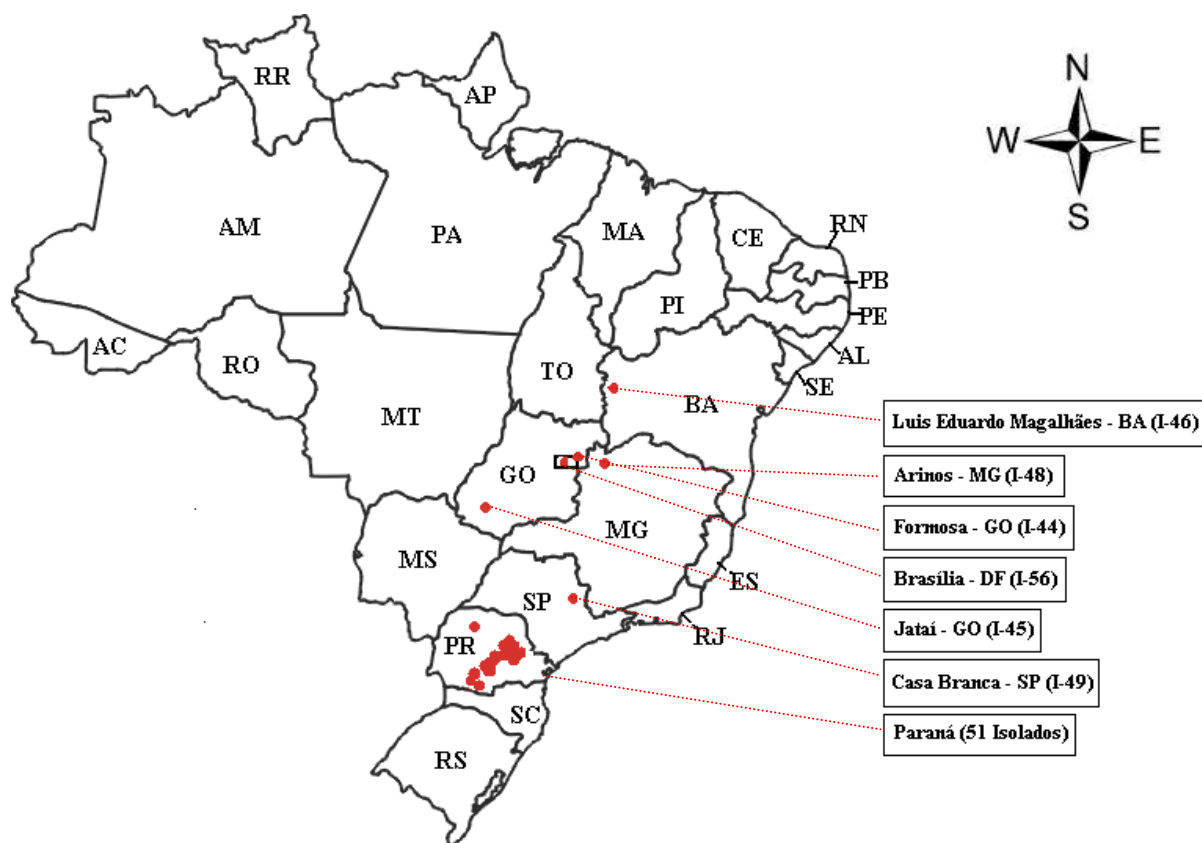


Figura 1.2 – Demarcação da localização da coleta dos isolados, segundo o estado brasileiro de sua origem.

A identificação, a cultura de onde foi coletado, o município de coleta, o coletor e o ano de coleta de cada isolado estão especificados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Caracterização do local e hospedeiro de origem, ano de coleta e coletor de cada isolado de *S. sclerotiorum* utilizado (continua).

Código dos Isolados	Cultura de coleta	Município da coleta	Coletor	Ano
I-01	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-02	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Carambeí – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-03	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Teixeira Soares – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-04	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Honório Serpa – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-05	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mangueirinha – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-06	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Pinhão – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-07	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ivaí – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-08	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Piraí do Sul – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-09	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Pinhão – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-10	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ipiranga – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-11	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-12	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-13	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Pinhão – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-14	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Carambeí – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-15	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Guarapuava – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009

(conclusão)

Código dos Isolados	Cultura de coleta	Município da coleta	Coletor	Ano
I-16	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Pinhão – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-17	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Prudentópolis – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-18	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-19	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Teixeira Soares – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-20	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ventania – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-21	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mangueirinha – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-22	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Tibagi – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-23	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Teixeira Soares – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-24	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Prudentópolis – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-25	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Teixeira Soares – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-26	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ventania – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-27	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Castrolanda – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-28	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-29	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ipiranga – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-30	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Guaragi – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-31	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-32	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Prudentópolis – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-33	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-34	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Pinhão – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-35	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Tibagi – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-36	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-37	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ventania – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-38	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mangueirinha – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-39	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mangueirinha – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-40	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmas – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-41	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Palmeira – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-42	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mangueirinha – PR	Jaccoud-Filho et al. (UEPG)	2009
I-43	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Pierre, MLC (UEPG)	2011
I-44	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Formosa – GO	Rosa, C (PIONEER)	2010
I-45	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Jataí – GO	Garcia, RA (UFU)	2009*
I-46	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	L. E. Magalhães – BA	Mercer, RM (PIONEER)	2010
I-47	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Maringá – PR	Vida, J (UEM)	2010*
I-48	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Arino – MG	de Paula, RF (PIONEER)	2010
I-49	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Casa Branca – SP	de Lima, MM (PIONEER)	2010
I-50	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Ipiranga – PR	Henneberg, L (UEPG)	2010
I-51	Couve (<i>Brassica oleracea</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Vrisman, CM (UEPG)	2010
I-52	Ansarinha (<i>Potentilla anserina</i> L.)	Ventania – PR	Manosso Neto, MO (UEPG)	2010
I-53	Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. Capitata L.)	Ponta Grossa – PR	Vrisman, CM (UEPG)	2010
I-54	Serralha (<i>Sonchus oleraceus</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Grabicoski, EMG (UEPG)	2010
I-55	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Ponta Grossa – PR	Grabicoski, EMG (UEPG)	2011
I-56	Salsa (<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym)	Brasília-DF	Reis, A. (CNPq-EMBRAPA)	2011*
I-57	Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	Ipiranga - PR	Grabicoski, EMG (UEPG)	2010

* Ano em que os isolados foram enviados.

Os escleródios dos isolados foram colocados, em câmara de fluxo laminar, após serem superficialmente desinfestados com álcool 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 5% (1 minuto), no centro de placas de Petri contendo meio de cultura à base de Batata Dextrose Ágar (BDA), e manteve-se em câmara de crescimento de fungo sob condições controladas de 14 °C sob fotoperíodo de 12 horas de luminosidade.

3.2 Caracterização morfológica de isolados de *S. sclerotiorum*

3.2.1 Germinação miceliogênica

Um microscópio estereoscópio (lupa) foi utilizado para as análises das características morfológicas dos isolados. As avaliações foram realizadas diariamente, durante um período de 35 dias, a partir do dia da incubação dos escleródios nas placas de Petri.

As características avaliadas nesta fase foram: tempo necessário (dias) para o fungo ocupar a placa de Petri de 90 mm de diâmetro, densidade do micélio formado (sendo A – abundante, R – ralo ou I - irregular), formação ou não de escleródios, tempo para formação do primeiro escleródio (dias), quantidade total de escleródios formados após 35 dias, tamanho (maior medida do escleródio, em mm), forma (sendo R – arredondado, I- irregular e D - diversos), e peso de escleródios (após serem retirados das placas e secos a temperatura ambiente por 48 horas, em mg) (CHAVES, 1961; CORRADINI, 1989). Foram avaliadas quatro placas por isolado.

3.2.2 Germinação carpogênica

Colocou-se 20 escleródios produzidos em placas de Petri com meio de cultura a base de BDA a partir de escleródios coletados em campo, após mantidos por 15 dias a -20 °C, para estimular a germinação carpogênica, em caixas plástica contendo areia saturada com água destilada, ambas esterilizadas, sob temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Em um microscópio estereoscópio (lupa), foram avaliados o tempo para início da formação das estipes (estrutura que antecede o apotécio), quantidade de estipes total,

quantidade de apotécios total, tamanho de apotécios formados e quantidade de escleródios totais germinados.

3.3 Caracterização patogênica de isolados de *S. sclerotiorum*

Após a caracterização morfológica, os isolados foram caracterizados patogenicamente, por meio de duas metodologias de inoculação (GARCIA, 2008), sendo uma delas na haste e a outra em trifólios destacados de planta de soja, como descrito a seguir:

3.3.1 Inoculação na haste:

Foram utilizadas plantas saudáveis de soja, da cultivar BMX Titan RR, no estágio fenológico V4/V5 (quarto/quinto nó) (FEHR; CAVINESS, 1977), que foram semeadas e cultivadas em vasos com substrato esterilizado, a base de cascas de eucalipto, pinus e cinzas (Lupa Fertilizantes[®]), e mantidas em casa de vegetação.

A inoculação foi através de discos de meio de cultura pura, com 5 dias de idade, colocados na haste da planta entre o segundo e o terceiro trifólio, com o micélio em contato direto com a planta, e presos com uma fita adesiva incolor.

Antes e após a inoculação, as plantas, que se encontravam amarradas a estacas, foram borrifadas com água destilada esterilizada e, então, cada vaso foi coberto e fechado com um saco plástico transparente. Para cada isolado, cinco plantas foram inoculadas.

Os sintomas causados pela inoculação dos isolados foram avaliados, após 72 horas e 96 horas da inoculação, através da medição do comprimento das lesões formadas, com auxílio de uma régua (GARCIA, 2008).

Como testemunha, foram consideradas cinco plantas com o disco de BDA sem a cultura do fungo.

3.3.2 Inoculação no trifólio:

Foram utilizados trifólios de plantas de soja, da cultivar BMX Titan RR, cultivadas em vasos com substrato esterilizado, a base de cascas de eulalipto, pinus e cinzas (Lupa Fertilizantes[®]), em casa de vegetação.

Os trifólios utilizados foram destacados das plantas com auxílio de uma tesoura, quando se encontravam no estágio fenológico V2 (segundo nó) (FEHR; CAVINESS, 1977) e, então, colocados em caixas plásticas esterilizadas contendo duas folhas de papel mata borrão saturadas com água destilada esterilizada, 2 lâminas de vidro previamente esterilizadas e um maço de algodão saturado com água destilada esterilizada sobre a extremidade do trifólio.

Os isolados foram inoculados, colocando-se um disco de BDA, com a cultura do fungo com cinco dias de idade, sobre o centro de cada um dos três folíolos da folha de soja, com o micélio do fungo em contato direto com a superfície superior da folha. Após a inoculação os trifólios foram mantidos a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas de luminosidade. Foram inoculados e avaliados 4 trifólios por isolado, considerando-se como testemunha, trifólios sem discos de BDA.

O diâmetro das lesões formadas foi medido, a partir de 24 horas após a inoculação (AI), em intervalos de 12 horas, até 72 horas AI, pois alguns isolados já haviam lesionado toda a extensão dos trifólios.

3.4 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos, inicialmente, ao Teste de Tukey e Skott-Knott e, posteriormente, apenas ao Skott-Knott, sempre a 1% de probabilidade, pelo programa estatístico SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

O delineamento utilizado para a caracterização morfológica foi inteiramente casualizado (DIA), e para a caracterização patogênica foi de blocos ao acaso (DBC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

Segundo a caracterização morfológica, a coloração do micélio dos isolados não variou, sendo que todos apresentaram coloração branca, coincidindo com dados de Corradini (1989). No entanto, características como a densidade e velocidade de crescimento micelial e as características dos escleródios, apresentaram algumas variações estatisticamente diferentes, segundo o teste de Tukey e de Skott-Knott, dados que estão apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Caracterização morfológica dos isolados de *S. sclerotiorum* e o resultado da comparação das médias entre os isolados (continua).

Cod ¹	MICÉLIO				ESCLERÓDIOS							
	Crescimento (dias) ²		C ³	Formação (dias) ⁴	Quantidade ⁵		T (mm) ⁶	Peso médio (mg) ⁷			F ⁸	
I-01	11,0	a ^{SK} ab ^T	R	15,4	a ^{SK} abc ^T	57,2	a ^{SK} a ^T	1-3	6,4	j ^{SK} stuv ^T	D	
I-02	9,2	b ab	I	14,0	a abcd	22,6	d efgh	1-6	19,1	c b	D	
I-03	9,0	b ab	I	13,8	b abcd	27,8	c cdefgh	2-4	8,4	h klmnopqrs	R	
I-04	10,4	a ab	I	14,4	a abcd	32,0	c abcdefgh	2-3	9,6	g ghijklmn	R	
I-05	8,6	b ab	I	13,0	b abcd	35,2	c abcdefgh	2-3	8,7	h klmnopqr	R	
I-06	9,6	b ab	I	14,6	a abcd	34,0	c abcdefgh	2-3	7,2	i qrstu	D	
I-07	10,2	a ab	I	14,8	a abcd	22,2	d efgh	2-6	7,5	i nopqrstu	R	
I-08	9,0	b ab	R	14,6	a abcd	27,4	c cdefgh	2-7	18,7	c b	I	
I-09	9,0	b ab	R	13,8	b abcd	47,6	a abcdef	2-4	9,2	h hijklmnopq	D	
I-10	11,0	a ab	R	14,2	a abcd	36,0	c abcdefgh	2-3	6,2	j tuvw	D	
I-11	7,6	b b	I	12,0	b d	33,0	c abcdefgh	2-4	8,1	h lmnopqrst	I	
I-12	8,2	b ab	R	13,6	b abcd	41,2	b abcdefgh	2-4	12,9	e cd	I	
I-13	9,8	a ab	I	13,6	b abcd	52,2	a abc	2-5	9,0	h jklmnopqr	D	
I-14	9,8	a ab	R	14,2	a abcd	32,2	c abcdefgh	1-4	9,1	h jklmnopq	D	
I-15	9,6	b ab	I	13,6	b abcd	33,8	c abcdefgh	2-4	4,1	k wx	D	
I-16	9,8	a ab	I	14,0	a abcd	21,6	d efgh	2-4	11,2	f defghi	D	
I-17	9,6	b ab	I	13,6	b abcd	55,8	a ab	2-3	7,6	i mnopqrstu	I	
I-18	10,2	a ab	I	13,4	b abcd	30,6	c bcdefgh	2-3	7,4	i opqrstu	D	
I-19	8,4	b ab	I	12,0	b d	24,8	d defgh	1-4	9,5	g ghijklmno	D	
I-20	7,8	b ab	I	11,8	b d	36,8	b abcdefgh	1-4	8,3	h lmnopqrst	D	
I-21	9,8	a ab	I	14,6	a abcd	46,0	a abcdefg	2-3	20,8	b b	D	
I-22	10,4	a ab	I	15,2	a abc	38,8	b abcdefgh	1-4	8,7	h klmnopqr	D	
I-23	9,2	b ab	R	14,2	a abcd	27,4	c cdefgh	2-3	14,5	d c	I	
I-24	11,2	a a	I	15,6	a ab	49,4	a abcd	2-3	10,2	g fghijkl	I	
I-25	8,8	b ab	I	13,0	b abcd	38,6	b abcdefgh	2-4	10,9	f defghij	D	
I-26	8,8	b ab	R	12,4	b cd	40,6	b abcdefgh	1-4	8,1	h lmnopqrst	D	
I-27	8,8	b ab	I	12,8	b abcd	32,2	c abcdefgh	2-4	4,9	k vwx	D	
I-28	8,8	b ab	I	12,6	b bcd	34,6	c abcdefgh	2-3	12,0	e def	D	

(conclusão)

Cod ¹	MICÉLIO			ESCLERÓDIOS								
	Crescimento (dias) ²	C ³	Formação (dias) ⁴	Quantidade ⁵			T (mm) ⁶	Peso médio (mg) ⁷			F ⁸	
I-29	9,6 b	ab	I	13,6 b	abcd	32,0 c	abcdefgh	1-8	9,4 g	hijklmnop	D	
I-30	11,2 a	a	I	15,8 a	a	35,0 c	abcdefgh	2-4	10,4 g	efghijk	R	
I-31	9,0 b	ab	R	13,0 b	abcd	42,8 b	abcdefgh	1-4	12,6 e	cd	D	
I-32	8,8 b	ab	R	13,0 b	abcd	23,6 d	defgh	2-3	7,7 i	mnopqrstu	D	
I-33	11,0 a	ab	R	15,2 a	abc	20,8 d	gh	2-6	7,8 i	mnopqrstu	R	
I-34	9,8 a	ab	I	13,2 b	abcd	33,0 c	abcdefgh	2-6	7,4 i	nopqrstu	D	
I-35	9,0 b	ab	I	13,4 b	abcd	27,4 c	cdefgh	1-4	7,2 i	qrstu	D	
I-36	9,0 b	ab	R	13,6 b	abcd	40,2 b	abcdefgh	1-3	7,2 i	qrstu	R	
I-37	9,0 b	ab	I	15,4 a	abc	29,2 c	cdefgh	1-4	11,3 f	defgh	D	
I-38	9,2 b	ab	I	13,6 b	abcd	40,4 b	abcdefgh	2-6	8,3 h	lmnopqrst	R	
I-39	10,2 a	ab	I	14,8 a	abcd	25,0 d	defgh	2-3	4,8 k	vwxx	D	
I-40	9,2 b	ab	I	13,2 b	abcd	29,8 c	bcdefgh	2-3	13,1 e	cd	R	
I-41	9,6 b	ab	I	14,0 a	abcd	28,6 c	cdefgh	2-4	5,8 j	uvwxx	R	
I-42	9,4 b	ab	R	13,6 b	abcd	28,0 c	cdefgh	2-3	8,2 h	lmnopqrst	D	
I-43	9,0 b	ab	R	13,8 b	abcd	22,2 d	efgh	2-4	9,1 h	ijklmnopq	D	
I-44	9,0 b	ab	R	13,4 b	abcd	35,4 c	abcdefgh	2-4	11,6 f	defg	D	
I-45	9,2 b	ab	I	13,8 b	abcd	31,8 c	abcdefgh	1-8	7,8 i	mnopqrstu	R	
I-46	11,0 a	ab	R	14,6 a	abcd	19,8 d	gh	2-4	11,3 f	defghi	D	
I-47	9,8 a	ab	A	14,4 a	abcd	37,2 b	abcdefgh	2-7	23,0 a	a	R	
I-48	9,8 a	ab	I	13,8 b	abcd	47,8 a	abcde	2-4	6,8 i	rstuv	D	
I-49	9,6 b	ab	I	13,8 b	abcd	47,6 a	abcdef	2-4	7,9 i	mnopqrstu	D	
I-50	9,4 b	ab	R	13,4 b	abcd	42,8 b	abcdefgh	2-3	12,5 e	cde	R	
I-51	9,0 b	ab	I	13,2 b	abcd	16,6 d	h	3-5	9,7 g	ghijklm	D	
I-52	10,6 a	ab	I	14,0 a	abcd	27,6 c	cdefgh	2-4	5,8 j	uvwxx	D	
I-53	10,2 a	ab	I	14,6 a	abcd	31,0 c	abcdefgh	2-5	3,7 k	x	D	
I-54	10,4 a	ab	A	14,4 a	abcd	33,2 c	abcdefgh	2-4	9,0 h	jklmnopq	D	
I-55	9,2 b	ab	R	13,6 b	abcd	21,4 d	fgh	2-4	8,7 h	klmnopqr	D	
I-56	9,4 b	ab	R	14,2 a	abcd	19,0 d	h	2-4	11,1 f	defghij	D	
I-57	9,2 b	ab	I	13,4 b	abcd	19,2 d	h	2-3	7,3 i	pqrstu	D	
C.V.	14,1 %			8,8 %		30,5%			8,7 %			

1 – Código do Isolado

2 – Tempo necessário para os isolados ocuparem toda a placa de Petri de 90 mm de diâmetro com BDA, em dias;

3 – Características do micélio desenvolvido nas placas de Petri, onde A = abundante; R = Ralo; I = Irregular (diferentes densidades na mesma placa, ou entre as repetições);

4 – Tempo necessário para a formação do primeiro escleródio em placa, em dias;

5 – Quantidade de escleródios formados por placa, após 35 dias de incubação;

6 – Tamanho dos escleródios em placa, avaliando-se a maior medida apresentada pelos mesmos, em mm;

7 – Peso médio dos escleródios, em mg;

8 – Formato dos escleródios, onde: R = Arredondado; I = Irregulares (sem forma definida) e D = Diversos (vários formatos);

SK – Resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott, onde médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram entre si a 1% de probabilidade.

T – Resultado do teste de comparação de médias Tukey, onde médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram entre si a 1% de probabilidade.

O desenvolvimento micelial dos isolados foi classificado em ralo (R), quando apenas uma fina e homogênea camada se desenvolveu sobre o meio de cultura como, por exemplo, os isolados I-01, I-08 e I-10; em abundante (A), quando uma espessa e uniforme camada de micélio se formou sobre o meio de cultura, como é o caso do I-54 e I-47 e em irregular (I), quando não houve um padrão de formação do micélio sobre o meio de cultura na placa ou entre as placas do isolado como, por exemplo, os isolados I-05, I-39 e I-40, como ilustrado na Figura 1.3 e apresentado na Tabela 1.2. Dados similares com os obtidos por Corradini (1989) na caracterização de 19 isolados de *S. sclerotiorum*.

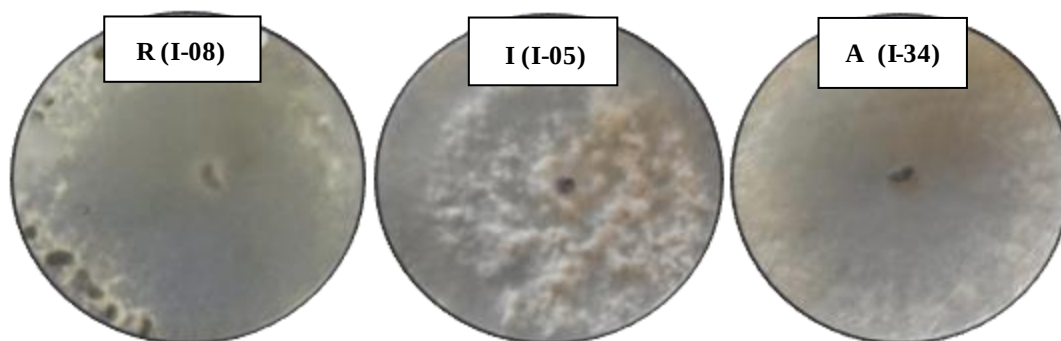


Figura 1.3 – Representação das espessuras (características) do crescimento micelial apresentada pelos isolados. R – Micélio ralo (Isolado I-08); I – Micélio irregular (Isolado I-05) e A – Crescimento micelial abundante (Isolado I-34).

Quanto à velocidade de crescimento, de modo geral, os isolados levaram de 7,6 a 11,2 dias para ocuparem toda a área da placa de Petri, diferindo-se, segundo o teste de Skott-Knott, em dois níveis de velocidade (A e B), e apenas duas diferenças significativas segundo o teste de Tukey (entre o I-11 e os I-24 e o I-30).

Quanto ao tempo necessário para o início da formação dos escleródios, o tempo variou de 11,8 a 15,4 dias, sendo que os isolados, segundo o teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade, diferenciaram-se em apenas dois níveis (A e B), e segundo Tukey, 18 diferenças significativas foram detectadas.

Comparando-se os resultados destas duas velocidades de crescimento, pode-se observar que os isolados I-13, I-18, I-34 e I-48 foram estatisticamente mais “lentos” no crescimento micelial (nível A, segundo Skott-Knott) e mais “rápidos” (nível B, segundo Skott-Knott) segundo a formação dos escleródios. O oposto ocorreu com os isolados I-02, I-05, I-06, I-08, I-23, I-37 e I-56, que foram mais “rápidos” (B) para ocuparem a área da placa de Petri e mais “lentos” na formação de escleródios (A). Essa diferença é ilustrada na Figura 1.4, com dois isolados de mesma idade (12 dias após incubação) sendo que, enquanto um apresentava formação apenas de micélio (I-06), o outro já apresenta formação de vários

escleródios na placa (I-34). Os demais isolados apresentaram a mesma classificação para as duas velocidades de desenvolvimento.

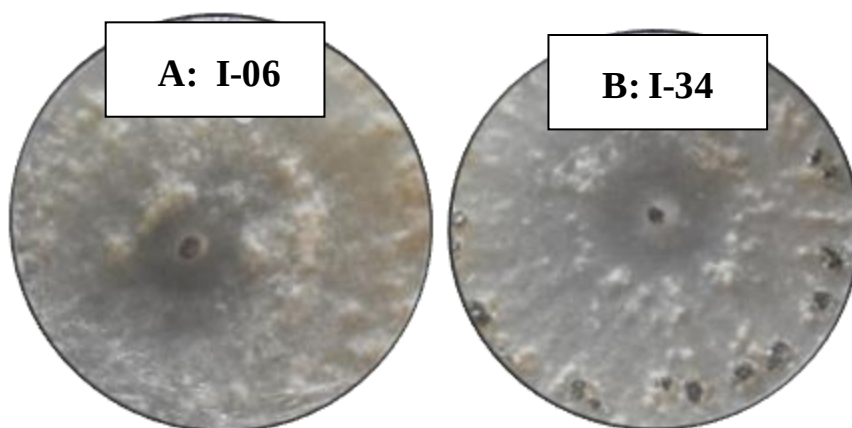


Figura 1.4 – Isolados com mesma idade (12 dias após incubação), demonstrando a diferença entre os isolados quanto ao tempo necessário para a formação de escleródios. A – Isolado I-06; B – Isolado I-34.

Com relação as características dos escleródios, muitas diferenças foram detectadas. A quantidade de escleródios por placa variou de 16,6 (I-51) a 57,2 (I-01) escleródios, apresentando mais de trinta diferenças significativas segundo o teste de Tukey entre os isolados e, segundo Skott-Knott a 1% de probabilidade, os isolados diferiram em quatro níveis distintos (A, B, C e D), sendo o nível A, com a maior quantidade de escleródios produzidos (46,0 a 57,2 escleródios), representado por 8 isolados, o nível B com 36,8 a 42,8 escleródios por 10 isolados, o grupo C foi o que apresentou maior quantidade de isolados (26), os quais apresentaram uma variação de 27,4 a 36,0 escleródios e o grupo D, com a menor quantidade de escleródios, variando de 16,6 a 25,0, apresentados pelos 13 isolados restantes. A diferença entre esses diferentes níveis é ilustrada na Figura 1.5.

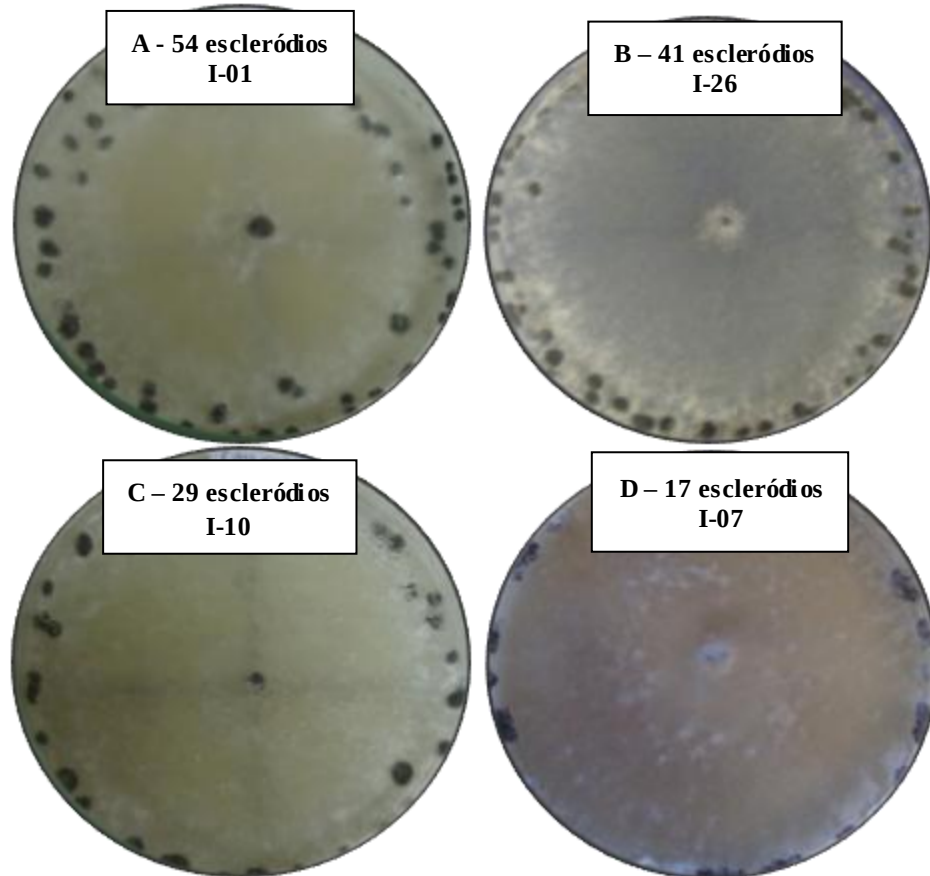


Figura 1.5 – Placas de Petri contendo os isolados com diferentes quantidades de escleródios por placa, separados segundo teste Skott-Knott a 1% de probabilidade. A – 54 escleródios (Isolado I-01); B – 41 escleródios (Isolado I-26); C – 29 escleródios (Isolado I-10) e D - 17 escleródios (Isolado I-07).

Com relação ao tamanho dos escleródios formados pelos isolados, alguns apresentaram variações, como é o caso dos isolados I-29 e I-45, que variaram de 1 a 8 mm. Já alguns isolados apresentaram pouca variação como, por exemplo, o I-04, I-05, I-06, que variaram de 2 a 3 mm apenas.

Quanto ao formato dos escleródios formados, enquanto alguns apresentaram diversos formatos (D), como o isolado I-10 e I-19, alguns apresentaram um formato padrão (R - arredondado) como, por exemplo, os isolados I-03, I-04 e I-05.

Essa variação no tamanho e formato dos escleródios, apresentada por alguns isolados, pode ser visualizada na Figura 1.6 (Isolado I-19), onde o isolado ilustrado apresentou escleródios com tamanho de 2 mm a 7 mm de largura e com diferentes formas (arredondada e irregular) na mesma placa. Enquanto que isolados como, por exemplo o I-05, apresentaram o desenvolvimento dos escleródios de acordo com um padrão, tanto no formato (arredondados), como no tamanho (em torno de 4 mm de largura), apresentado na Figura 1.7 .

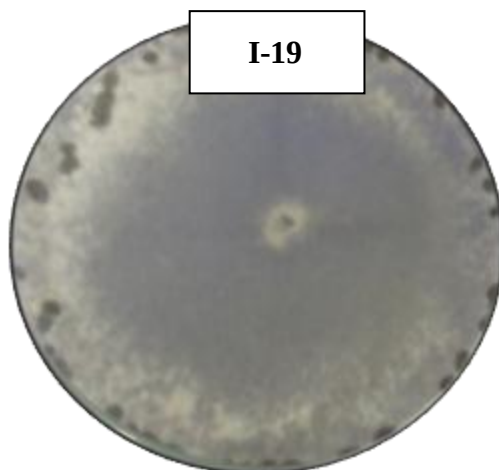


Figura 1.6 – Placa com isolado I-19, que apresenta seus escleródios com diferentes formas e tamanho em uma mesma placa de Petri.

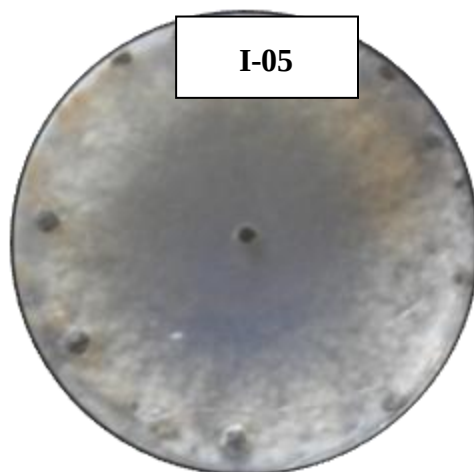


Figura 1.7 – Isolado I-05, demonstrando uma formação de escleródios similares entre si.

A Figura 1.8 ilustra a variabilidade tanto do tamanho como do formato dos escleródios desenvolvidos pelos isolados.

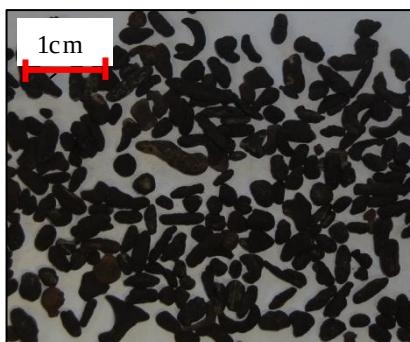


Figura 1.8 – Diferentes tamanhos e formatos apresentados pelos escleródios.

Com relação ao peso seco dos escleródios, foram detectadas várias diferenças significativas. Segundo o Teste de Tukey mais de cem diferenças, e segundo Skott-Knott foram 11 níveis detectados, ambos os testes a 1% de probabilidade.

O isolado I-47 (Maringá-PR) apresentou o maior peso dos escleródios, com média de 23,0 mg, e segundo o teste de Skott-Knott, diferiu estatisticamente dos demais isolados (nível A). O segundo maior peso foi apresentado pelo isolado I-21 (Mangueirinha-PR), com 20,8 mg de média, também diferindo estatisticamente dos demais (nível B). O terceiro maior peso foi apresentado pelos isolados I-02 (Carambeí-PR) (19,1 mg) e I-08 (Piraí do Sul-PR) (18,7 mg) (nível C). O quarto nível (D) de peso dos escleródios foi apresentado pelo isolado I-23 (Teixeira Soares-PR), com 14,5 mg. O quinto nível (E) apresentou 5 isolados, com pesos variando de 12,0 a 13,1 mg. O sexto nível (F) apresentou 6 isolados, com variação de 10,9 a 11,6 mg de peso médio dos escleródios. O sétimo nível (G) apresenta 6 isolados com variação de 9,4 a 10,4 mg no peso médio dos escleródios. O oitavo nível (H) apresentou a maior quantidade de isolados, totalizando 14, com peso de escleródios variando de 8,1 a 9,2 mg. Em seguida a variação do peso de 6,8 a 7,9 mg apresentada por 13 isolados (Nível I). O nível J apresentou 4 isolados, com oscilação de médias entre 5,8 a 6,4 mg. E o último nível (K), com os 4 isolados restantes e média do peso dos escleródios entre 3,7 a 4,9 mg.

Chaves (1961), em estudo similar, que avaliou as características morfológicas de diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, observou que os mesmos diferiram entre si quanto à velocidade do crescimento micelial, à velocidade de formação, quantidade e tamanho dos escleródios, sugerindo a possibilidade de haver diversidade genética entre os isolados.

Por outro lado, as características morfológicas dos diferentes isolados podem estar relacionadas com o estado do escleródio inicial utilizado nas avaliações, de modo que, enquanto eles estavam no campo, estavam sujeitos a diversas interferências, que poderiam ter diminuído a sua viabilidade. Como, por exemplo, a idade (BUENO et al., 2006), a profundidade em que se encontram no solo, onde escleródios na faixa dos 5 a 20 cm da superfície apresentam maior tempo de sobrevivência (AKAI, 1981; SAHARAN; MEHTA, 2008); o grau e a frequência de seca, visto que os mesmos não tem controle sobre a sua perda de água em caso de encharcamento seguido por seca, causando a perda de diversos nutrientes, e, assim, diminuindo suas reservas (WILLETS; WONG, 1980), justificando algumas diferenças entre a velocidade de crescimento e formação de escleródios verificada entre os mesmos quando desenvolvidos em placas de Petri.

Com isso, demonstrando a possibilidade, de que as variações observadas, são apenas variações fisiológicas normais entre isolados da espécie (SERRA; SILVA, 2005; SAHARAN; MEHTA, 2008).

Não foi possível avaliar a germinação carpogênica dos isolados, pois em duas tentativas os escleródios não germinaram formando os apotécios.

4.2 Caracterização patogênica

4.2.1 Inoculação da Haste

Na Tabela 1.3 são apresentados os resultados de patogenicidade obtidos a partir da inoculação de diferentes isolados na haste da soja, onde o comprimento da lesão formada na haste 72 horas e 96 horas após a inoculação (AI) foi medido e o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott e Tukey, ambos a 1% de probabilidade.

Tabela 1.3 - Resultado da avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* em inoculação na haste de plantas de soja, e o resultado do teste de médias segundo os teste estatísticos de Tukey e Skott-Knott, a 1% de probabilidade (continua).

Código dos Isolados	72 horas AI			96 horas AI		
	Comprimento da Lesão (mm)	Skott-Knott	Tukey	Comprimento da Lesão (mm)	Skott-Knott	Tukey
I-01	0	b	h	0	b	h
I-02	3,9	a	abcdefgh	5,9	a	abcdefg
I-03	1,3	b	bcdefgh	3,4	b	abcdefgh
I-04	1,4	b	bcdefgh	2,4	b	bcdefgh
I-05	0,6	b	efgh	1,6	b	cdefgh
I-06	1,0	b	defgh	1,0	b	gh
I-07	1,0	b	defgh	1,4	b	defgh
I-08	4,4	a	abcdefg	6,6	a	abcde
I-09	1,0	b	defgh	1,4	b	defgh
I-10	5,6	a	ab	6,6	a	abcde
I-11	5,1	a	abcd	7,2	a	ab
I-12	3,5	a	abcdefgh	3,8	b	abcdefgh
I-13	3,8	a	abcdefgh	4,4	a	abcdefgh
I-14	1,4	b	bcdefgh	2,0	b	bcdefgh
I-15	0,4	b	fgh	0,6	b	gh
I-16	4,6	a	abcdef	6,9	a	abc
I-17	0,5	b	efgh	0,7	b	gh
I-18	0,6	b	efgh	1,3	b	defgh
I-19	3,0	a	abcdefgh	5,0	a	abcdefgh
I-20	5,4	a	abc	6,5	a	abcdef
I-21	0,4	b	fgh	1,1	b	fgh
I-22	2,2	b	abcdefgh	2,4	b	bcdefgh
I-23	4,1	a	abcdefgh	5,6	a	abcdefg
I-24	2,6	b	abcdefgh	3,6	b	abcdefgh

(Conclusão)

Código dos Isolados	72 horas AI			96 horas AI		
	Comprimento da Lesão (mm)	Skott-Knott	Tukey	Comprimento da Lesão (mm)	Skott-Knott	Tukey
I-25	0,9	b	defgh	0,9	b	gh
I-26	1,6	b	abcdefgh	1,6	b	cdefgh
I-27	5,9	a	a	8,2	a	a
I-28	1,8	b	abcdefgh	2,3	b	bcdefgh
I-29	1,5	b	bcdefgh	2,6	b	bcdefgh
I-30	1,0	b	defgh	1,2	b	efgh
I-31	1,7	b	abcdefgh	2,3	b	bcdefgh
I-32	1,9	b	abcdefgh	2,2	b	bcdefgh
I-33	4,4	a	abcdefg	5,2	a	abcdefgh
I-34	0,8	b	defgh	0,6	b	gh
I-35	1,0	b	defgh	1,1	b	fgh
I-36	1,9	b	abcdefgh	2,1	b	bcdefgh
I-37	1,0	b	defgh	1,8	b	bcdefgh
I-38	3,1	a	abcdefgh	3,3	b	bcdefgh
I-39	1,4	b	bcdefgh	1,8	b	bcdefgh
I-40	0,3	b	fgh	0,9	b	gh
I-41	1,8	b	abcdefgh	2,6	b	bcdefgh
I-42	1,2	b	cdefgh	2,7	b	bcdefgh
I-43	2,4	b	abcdefgh	2,4	b	bcdefgh
I-44	3,5	a	abcdefgh	5,4	a	abcdefgh
I-45	4,2	a	abcdefgh	5,6	a	abcdefg
I-46	4,8	a	abcde	5,0	a	abcdefgh
I-47	5,6	a	ab	7,0	a	abc
I-48	3,2	a	abcdefgh	3,4	b	abcdefgh
I-49	2,7	b	abcdefgh	2,8	b	abcdefgh
I-50	0,2	b	gh	0	b	h
I-51	3,8	a	abcdefgh	4,4	a	abcdefgh
I-52	1,1	b	cdefgh	1,0	b	gh
I-53	4,3	a	abcdefgh	6,7	a	abcd
I-54	0,9	b	defgh	2,0	b	bcdefgh
I-55	1,0	b	defgh	1,0	b	gh
I-56	1,2	b	cdefgh	2,4	b	bcdefgh
C.V.	72,49 %			66,73 %		

* Letras seguidas da mesma letra, não diferiram estatisticamente segundo cada teste específico de comparação de médias, a 1% de probabilidade.

O tamanho das lesões 72 horas AI, variou de 0,0 a 3,8 cm e, após 96 horas da inoculação, variou de 0,0 a 8,2 cm. As médias de cada avaliação foram comparadas entre si pelo teste de Tukey e Skott-Knott a 1% de probabilidade. Segundo o teste de Tukey, houve uma grande quantidade de diferenças significativas, entre os diferentes isolados e não possibilitou a separação dos isolados em grupos segundo estas avaliações. Através do teste de Skott-Knott, foram detectadas diferenças estatísticas que separaram os mesmos em dois grupos de patogenicidade (A e B) segundo a inoculação na haste.

Em vista da dificuldade apresentada pelo teste de Tukey, em não separar os isolados em grupos segundo similaridades entre eles, as médias dos resultados seguintes serão apenas comparadas pelo teste de Skott-Knott, que possibilita essa separação.

Nota-se (Tabela 1.3), que os isolados I-12, I-38 e I-49 apresentaram-se classificados dentro de níveis diferentes segundo suas medições de 72 horas e 96 horas após inoculação, ou seja, na avaliação das 72 horas os três isolados foram classificados no nível mais patogênico (A), e na segunda avaliação (realizada após 96 horas da inoculação) apresentaram-se no nível menos patogênico (B), visto que não houve aumento do tamanho das lesões de uma avaliação para outra. Os demais isolados apresentaram classificação similar nas duas avaliações.

Na Figura 1.9 ilustra-se a diferença de tamanho das lesões formadas por dois isolados contrastantes (I-54 e I-30) segundo a inoculação dos mesmos na haste de plantas de soja, após 96 horas da inoculação.



Figura 1.9 – Isolados de *S. sclerotiorum*, inoculados em haste de plantas de soja onde A: I-54 (Serralha – Ponta Grossa-PR) e B: I-30 (Guaragi-PR), após 96 horas de inoculação.

Segundo o comprimento da lesão formada na haste, após 96 horas da inoculação e a comparação de médias dos mesmos pelo teste de Skot-Knott a 1% de probabilidade, os isolados foram separados em grupos de patogenicidade e comparados com características das suas regiões de origem, para analisar alguma correlação, se alguma característica poderia estar influenciando no nível de patogenicidade apresentado pelos isolados (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Comparação do resultado da avaliação do tamanho da lesão formada, 96 horas após a inoculação dos isolados de *S. sclerotiorum* na haste de plantas de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade, as características de cada região de coleta dos isolados e características morfológicas dos isolados (continua).

Cód.	Comp. Da Lesão na haste (cm) 96 horas	Cultura de Origem	Cidade de origem	Ano da Coleta	Alt. (m)	T.Mín (°C)***	T.Máx (°C)***	T.M. (°C)***
I-27	8,2 a**	Soja	Castro – PR	2009	1.000	14,4	24,8	19,6
I-11	7,2 a	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-48	7,0 a	Soja	Arinos - MG	2010	520	18,8	28,6	23,7
I-16	6,9 a	Soja	Pinhão – PR	2009	1.090	17,1	28,3	22,7
I-54	6,7 a	Serralha	Ponta Grossa - PR	2010	850	15,4	26,1	20,8
I-08	6,6 a	Soja	Piraí do Sul - PR	2009	1.050	14,9	25,6	20,0
I-10	6,6 a	Soja	Ipiranga - PR	2009	790	15,6	26,6	21,1
I-20	6,5 a	Soja	Ventania - PR	2009	940	15,5	26,2	20,9
I-02	5,9 a	Soja	Carambeí - PR	2009	1.040	14,7	25,5	20,1
I-23	5,6 a	Soja	Teixeira Soares - PR	2009	890	15,7	26,7	21,2
I-46	5,6 a	Soja	Luiz E. Magalhães - BA	2010	790	20,1	30,7	25,4
I-45	5,4 a	Soja	Jataí - GO	2009*	740	20,5	30,9	25,7
I-33	5,2 a	Soja	Ponta Grossa - PR	2009	850	15,4	26,1	20,8
I-19	5,0 a	Soja	Teixeira Soares - PR	2009	890	15,7	26,7	21,2
I-47	5,0 a	Soja	Maringá - PR	2010*	545	14,9	29,6	22,2
I-13	4,4 a	Soja	Pinhão - PR	2009	1.090	17,1	28,3	22,7
I-52	4,4 a	Ansarinha	Ventania - PR	2010	940	15,5	26,2	20,9
I-12	3,8 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-24	3,6 b	Soja	Prudentópolis - PR	2009	770	16,3	27,3	21,8
I-03	3,4 b	Soja	Teixeira Soares - PR	2009	890	15,7	26,7	21,2
I-49	3,2 b	Feijão	Casa Branca - SP	2010	710	17,9	27,9	22,9
I-50	2,8 b	Girassol	Ipiranga - PR	2010	790	15,6	26,6	21,1
I-43	2,7 b	Soja	Ponta Grossa - PR	2011	850	15,4	26,1	20,8
I-29	2,6 b	Soja	Ipiranga - PR	2009	790	15,6	26,6	21,1
I-38	2,6 b	Soja	Mangueirinha - PR	2009	870	17,6	29,1	23,3
I-41	2,6 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-04	2,4 b	Soja	Honório Serpa - PR	2009	870	17,9	29,5	23,7
I-22	2,4 b	Soja	Tibagi - PR	2009	810	15,9	26,5	21,2
I-44	2,4 b	Soja	Formosa - GO	2010	945	18,4	27,5	22,9
I-57	2,4 b	Canola	Ipiranga - PR	2010	790	15,6	26,6	21,1
I-28	2,3 b	Soja	Ponta Grossa - PR	2009	850	15,4	26,1	20,8
I-31	2,3 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-32	2,2 b	Soja	Prudentópolis - PR	2009	770	16,3	27,3	21,8
I-36	2,1 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-14	2,0 b	Soja	Carambeí - PR	2009	1.040	14,7	25,5	20,1
I-55	2,0 b	Alface	Ponta Grossa - PR	2011	850	15,4	26,1	20,8
I-37	1,8 b	Soja	Ventania - PR	2009	940	15,5	26,2	20,9
I-39	1,8 b	Soja	Mangueirinha - PR	2009	870	17,6	29,1	23,3
I-05	1,6 b	Soja	Mangueirinha - PR	2009	870	17,6	29,1	23,3
I-26	1,6 b	Soja	Ventania - PR	2009	940	15,5	26,2	20,9
I-07	1,4 b	Soja	Ivaí - PR	2009	730	16,0	26,9	21,5
I-09	1,4 b	Soja	Pinhão - PR	2009	1.090	17,1	28,3	22,7
I-18	1,3 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-30	1,2 b	Soja	Guaragi - PR	2009	850	15,4	26,1	20,8
I-21	1,1 b	Soja	Mangueirinha - PR	2009	870	17,6	29,1	23,3
I-35	1,1 b	Soja	Tibagi - PR	2009	810	15,9	26,5	21,2
I-06	1,0 b	Soja	Pinhão - PR	2009	1.090	17,1	28,3	22,7

(conclusão)

Cód.	Comp. Lesão na haste (cm) 96 horas	Cultura de Origem	Cidade de origem	Ano da Coleta	Alt. (m)	T.Mín (°C)***	T.Máx (°C)***	T.M. (°C)***
I-53	1,0 b	Repolho	Ponta Grossa - PR	2010	850	15,4	26,1	20,8
I-56	1,0 b	Salsa	Brasília-DF	2011*	880	16,0	27,0	21,0
I-25	0,9 b	Soja	Teixeira Soares - PR	2009	890	15,7	26,7	21,2
I-40	0,9 b	Soja	Palmas - PR	2009	1.110	17,5	28,4	23,0
I-17	0,7 b	Soja	Prudentópolis - PR	2009	770	16,3	27,3	21,8
I-15	0,6 b	Soja	Guarapuava - PR	2009	1.010	16,8	27,9	22,4
I-34	0,6 b	Soja	Pinhão - PR	2009	1.090	17,1	28,3	22,7
I-01	0 b	Soja	Palmeira - PR	2009	900	15,1	26,1	20,6
I-51	0 b	Couve	Ponta Grossa - PR	2010	850	15,4	26,1	20,8

* Ano em que os isolados foram encaminhados para a Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR.

**Letras seguidas da mesma letra, não diferiram estatisticamente segundo teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

*** Média dos meses de novembro a março (Dados: Somar).

A altitude das cidades de origens dos isolados que apresentaram maiores lesões na haste da soja após 96 horas de inoculação (4,4 a 8,2 cm) variaram de 520 m (Arinos-MG) a 1.090 m (Pinhão-PR); já com relação as temperaturas apresentadas por essas cidades, as menores temperaturas mínima, máxima e média foram apresentadas pela cidade de Castro-PR, sendo 14,4 °C; 24,8 °C e 19,6 °C respectivamente; e as maiores temperaturas mínima, máxima e média foram apresentadas pela cidade Jataí-GO, sendo 20,5°C; 30,9°C e 25,7°C, respectivamente.

No nível (B) dos isolados que apresentaram menor tamanho de lesão na haste (0 a 3,8 cm) após 96 horas de inoculação, as altitudes das cidades de origem variaram de 710 m (Teixeira Soares-PR) a 1.110 m (Palmas-PR), enquanto que as temperaturas mínima, máxima e média variaram de 15,1 °C (Palmeira-PR) a 18,4 °C (Formosa-GO), de 25,5 °C (Carambeí-PR) a 29,5 °C (Honório Serpa-PR) e de 20,6 °C (Palmeira-PR) a 23,7 °C (Honório Serpa-PR), respectivamente (Tabela 1.4).

Com relação aos hospedeiros de origem de cada isolado, houve variação nos dois níveis de patogenicidade da inoculação na haste da soja. E quanto ao ano de coleta, constatou-se que variou para os dois níveis de patogenicidade os isolados de 2009 e 2010; e os isolados coletados em 2011 apresentaram-se apenas no menor nível de patogenicidade.

Assim, não foi verificado nenhuma característica com relação ao hospedeiro de origem, ano de coleta, e local de coleta que se relacionou com a patogenicidade na haste dos isolados, nos dois níveis detectados.

Tabela 1.5 - Resultados obtidos na avaliação realizada 96 horas após a inoculação de *S. sclerotiorum* na haste de plantas de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott (1% de probabilidade) e as características morfológicas de cada isolado (continua).

Código dos isolados	Cultura de origem	Comp. ² (mm) 96 horas	Cresc. (dias) ³	C ⁴	Escl. (dias) ⁵	Qde ⁶	T ⁷ (mm)	Peso (mg) ⁸	F ⁹
I-27	Soja	8,2 a*	8,8 b	I	12,8 b	32,2 c	2-4	4,9 k	D
I-11	Soja	7,2 a	7,6 b	I	12,0 b	33,0 c	2-4	8,1 h	I
I-48	Soja	7,0 a	9,8 a	I	13,8 b	47,8 a	2-4	6,8 i	D
I-16	Soja	6,9 a	9,8 a	I	14,0 a	21,6 d	2-4	11,2 f	D
I-54	Serralha	6,7 a	10,4 a	A	14,4 a	33,2 c	2-4	9,0 h	D
I-08	Soja	6,6 a	9,0 b	R	14,6 a	27,4 c	2-7	18,7 c	I
I-10	Soja	6,6 a	11,0 a	R	14,2 a	36,0 c	2-3	6,2 j	D
I-20	Soja	6,5 a	7,8 b	I	11,8 b	36,8 b	1-4	8,3 h	D
I-02	Soja	5,9 a	9,2 b	I	14,0 a	22,6 d	1-6	19,1 c	D
I-23	Soja	5,6 a	9,2 b	R	14,2 a	27,4 c	2-3	14,5 d	I
I-46	Soja	5,6 a	11,0 a	R	14,6 a	19,8 d	2-4	11,3 f	D
I-45	Soja	5,4 a	9,2 b	I	13,8 b	31,8 c	1-8	7,8 i	R
I-33	Soja	5,2 a	11,0 a	R	15,2 a	20,8 d	2-6	7,8 i	R
I-19	Soja	5,0 a	8,4 b	I	12,0 b	24,8 d	1-4	9,5 g	D
I-47	Soja	5,0 a	9,8 a	A	14,4 a	37,2 b	2-7	23 a	R
I-13	Soja	4,4 a	9,8 a	I	13,6 b	52,2 a	2-5	9,0 h	D
I-52	Ansarinha	4,4 a	10,6 a	I	14,0 a	27,6 c	2-4	5,8 j	D
I-12	Soja	3,8 b	8,2 b	R	13,6 b	41,2 b	2-4	12,9 e	I
I-24	Soja	3,6 b	11,2 a	I	15,6 a	49,4 a	2-3	10,2 g	I
I-03	Soja	3,4 b	9,0 b	I	13,8 b	27,8 c	2-4	8,4 h	R
I-49	Feijão	3,2 b	9,6 b	I	13,8 b	47,6 a	2-4	7,9 i	D
I-50	Girassol	2,8 b	9,4 b	R	13,4 b	42,8 b	2-3	12,5 e	R
I-43	Soja	2,7 b	9,0 b	R	13,8 b	22,2 d	2-4	9,1 h	D
I-29	Soja	2,6 b	9,6 b	I	13,6 b	32,0 c	1-8	9,4 g	D
I-38	Soja	2,6 b	9,2 b	I	13,6 b	40,4 b	2-6	8,3 h	R
I-41	Soja	2,6 b	9,6 b	I	14,0 a	28,6 c	2-4	5,8 j	R
I-04	Soja	2,4 b	10,4 a	I	14,4 a	32,0 c	2-3	9,6 g	R
I-22	Soja	2,4 b	10,4 a	I	15,2 a	38,8 b	1-4	8,7 h	D
I-44	Soja	2,4 b	9,0 b	R	13,4 b	35,4 c	2-4	11,6 f	D
I-57	Canola	2,4 b	9,2 b	I	13,4 b	19,2 d	2-3	7,3 i	D
I-28	Soja	2,3 b	8,8 b	I	12,6 b	34,6 c	2-3	12,0 e	D
I-31	Soja	2,3 b	9,0 b	R	13,0 b	42,8 b	1-4	12,6 e	D
I-32	Soja	2,2 b	8,8 b	R	13,0 b	23,6 d	2-3	7,7 i	D
I-36	Soja	2,1 b	9,0 b	R	13,6 b	40,2 b	1-3	7,2 i	R
I-14	Soja	2,0 b	9,8 a	R	14,2 a	32,2 c	1-4	9,1 h	D
I-55	Alface	2,0 b	9,2 b	R	13,6 b	21,4 d	2-4	8,7 h	D
I-37	Soja	1,8 b	9,0 b	I	15,4 a	29,2 c	1-4	11,3 f	D
I-39	Soja	1,8 b	10,2 a	I	14,8 a	25,0 d	2-3	4,8 k	D
I-05	Soja	1,6 b	8,6 b	I	13,0 b	35,2 c	2-3	8,7 h	R
I-26	Soja	1,6 b	8,8 b	R	12,4 b	40,6 b	1-4	8,1 h	D
I-07	Soja	1,4 b	10,2 a	I	14,8 a	22,2 d	2-6	7,5 i	R
I-09	Soja	1,4 b	9,0 b	R	13,8 b	47,6 a	2-4	9,2 h	D
I-18	Soja	1,3 b	10,2 a	I	13,4 b	30,6 c	2-3	7,4 i	D
I-30	Soja	1,2 b	11,2 a	I	15,8 a	35,0 c	2-4	10,4 g	R
I-21	Soja	1,1 b	9,8 a	I	14,6 a	46,0 a	2-3	20,8 b	D
I-35	Soja	1,1 b	9,0 b	I	13,4 b	27,4 c	1-4	7,2 i	D
I-06	Soja	1,0 b	9,6 b	I	14,6 a	34,0 c	2-3	7,2 i	D
I-53	Repolho	1,0 b	10,2 a	I	14,6 a	31,0 c	2-5	3,7 k	D

(conclusão)

Código dos isolados	Cultura de origem	Comp.² (mm) 96 horas	Cresc. (dias)³	C⁴	Escl. (dias)⁵	Qde⁶	T⁷ (mm)	Peso (mg)⁸	F⁹
I-56	Salsa	1,0 b	9,4 b	R	14,2 a	19,0 d	2-4	11,1 f	D
I-25	Soja	0,9 b	8,8 b	I	13,0 b	38,6 b	2-4	10,9 f	D
I-40	Soja	0,9 b	9,2 b	I	13,2 b	29,8 c	2-3	13,1 e	R
I-17	Soja	0,7 b	9,6 b	I	13,6 b	55,8 a	2-3	7,6 i	I
I-15	Soja	0,6 b	9,6 b	I	13,6 b	33,8 c	2-4	4,1 k	D
I-34	Soja	0,6 b	9,8 a	I	13,2 b	33,0 c	2-6	7,4 i	D
I-01	Soja	0 b	11,0 a	R	15,4 a	57,2 a	1-3	6,4 j	D
I-51	Couve	0 b	9,0 b	I	13,2 b	16,6 d	3-5	9,7 g	D

*Letras seguidas da mesma letra, não diferiram estatisticamente segundo teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

1 – Código do Isolado

2 – Tamanho da lesão formada após 96 horas da inoculação dos isolados em hastes de soja;

3 – Tempo necessário para os isolados ocuparem toda a placa de Petri de 90 mm de diâmetro, em dias;

4 – Característica do micélio crescido nas placas de Petri, onde A = abundante; R = Ralo; I = Irregular (características variadas nas placas e entre as placas);

5 – Tempo necessário para a formação do primeiro escleródio em placa, em dias;

6 – Quantidade de escleródios formados por placa, após 35 dias de incubação;

7 – Tamanho dos escleródios em placa, avaliando-se a maior medida dos mesmos, em mm;

8 – Peso médio dos escleródios, em mg;

9 – Formato dos escleródios, onde: R = Arredondado; I = Irregulares (sem forma definida) e D = Diversos (vários formatos);

Ao analisar-se os dados da Tabela 1.5, onde os tamanhos de lesões apresentados pelos isolados após 96 horas por meio da inoculação na haste de plantas de soja estão comparados com os dados obtidos através da caracterização morfológica, nota-se que os dois níveis de patogenicidade (A e B) apresentaram diversas características miceliais e formatos de escleródios, exemplares dos dois grupos de velocidade de crescimento micelial (dias), de velocidade de formação de escleródios (dias), de quantidade de escleródios formados por placa de Petri e de tamanho de escleródios (mm).

Para facilitar a comparação dos dados obtidos por meio da inoculação dos isolados na haste de plantas de soja e sua relação com as características do local de origem dos isolados e com as suas características morfológicas, calculou-se a média de cada critério observado e a análise de variância (BANZATO; KRONKA, 2006) dos mesmos, que são apresentados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 – Média dos resultados das características consideradas, segundo cada nível de patogenicidade pela inoculação dos isolados na haste de plantas de soja, e o resultado de comparação de médias.

Comp¹ (mm) 96 horas	Alt. (m)	T. Mín (oC)	T. Máx (oC)	T. M. (oC)	Cresc. (dias)²	Escl. (dias)³	Qde Escl.⁴	T (mm)⁵	Peso (mg)⁶
6,0 A	877,4 ^{NS}	16,3 ^{NS}	27,2 ^{NS}	21,7 ^{NS}	9,6 ^{NS}	13,7 ^{NS}	31,3 ^{NS}	1-8	10,6 ^{NS}
1,8 B	884,8 ^{NS}	16,2 ^{NS}	27,1 ^{NS}	21,6 ^{NS}	9,5 ^{NS}	13,9 ^{NS}	34,4 ^{NS}	1-8	9,1 ^{NS}
C.V. (%)	13,92	8,15	5,02	6,04	8,67	6,43	29,31	-	37,85

NS – Resultados da análise da variância Não-Significativos

- 1 – Média do tamanho da lesão formada após 96 horas da inoculação dos isolados em hastes de soja, por nível de patogenicidade;
- 2 – Tempo médio necessário para os isolados ocuparem toda a placa de Petri de 90 mm de diâmetro com BDA, em dias de cada nível de patogenicidade segundo a inoculação na haste;
- 3 – Tempo necessário para a formação do primeiro escleródio em placa, em dias, para cada nível de patogenicidade segundo a inoculação na haste;
- 4 – Quantidade de escleródios formados por placa, após 35 dias de incubação, para cada nível de patogenicidade segundo a inoculação na haste;
- 5 – Tamanho dos escleródios em placa, avaliando-se a maior medida dos mesmos, em mm, para cada nível de patogenicidade segundo a inoculação na haste;
- 6 – Peso médio dos escleródios, em mg, para cada nível de patogenicidade segundo a inoculação na haste;

Através da análise da variância das médias, não foram detectadas diferenças significativas entre os dois níveis de patogenicidade (A e B) dos isolados, quando estes foram inoculados na haste de plantas de soja, e as demais características consideradas de cada isolado segundo a sua origem e suas características morfológicas (Tabela 1.6).

4.2.2 Inoculação do Trifólio

Na Tabela 1.7, são apresentados os resultados das avaliações a cada 12 horas, a partir de 24 horas após a inoculação (AI) dos trifólios de soja com os isolados de *S. sclerotiorum*.

Tabela 1.7 – Avaliações do diâmetro médio das lesões segundo a inoculação de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* em trifólios de soja, e o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade (continua).

Código Isolado	Diâmetro médio das lesões formadas pela inoculação dos isolados em trifólios de soja (mm)				
	24 horas AI	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
I-01	0 d*	1,9 e	3,8 e	5,5 f	4,7 e
I-02	6,6 b	11,4 b	16,2 b	23,1 c	20,2 b
I-03	6,1 b	13,2 a	17,2 a	18,9 c	21,2 b
I-04	7,8 a	13,3 a	18,8 a	24,9 b	23,0 b
I-05	2,3 c	8,3 b	14,3 b	16,6 d	16,5 c
I-06	2,3 c	6,7 c	10,9 c	16,0 d	16,6 c
I-07	8,3 a	6,3 c	17,7 a	20,9 c	27,7 b
I-08	3,9 c	7,5 c	11,2 c	15,0 d	14,8 c
I-09	0 d	1,1 e	2,2 f	2,7 g	2,5 e
I-10	6,4 b	10,2 b	14,0 b	20,2 c	18,3 c
I-11	2,0 c	5,2 c	8,5 d	12,5 e	10,6 d
I-12	0 d	4,6 d	9,2 d	11,4 e	10,9 d
I-13	3,5 c	7,6 c	11,8 c	18,0 c	18,0 c
I-14	1,0 d	4,7 d	8,3 d	10,1 e	8,6 d
I-15	7,0 b	3,0 d	22,5 a	25,8 b	32,9 a
I-16	7,0 b	13,2 a	19,3 a	28,7 a	26,4 b
I-17	1,5 d	4,3 d	7,7 d	11,2 e	10,0 d
I-18	1,5 d	9,4 b	20,0 a	23,2 c	29,9 a
I-19	2,9 c	6,9 c	10,8 c	15,6 d	15,2 c
I-20	8,1 a	14,6 a	21,1 a	29,6 a	26,8 b
I-21	8,3 a	12,8 a	17,3 a	28,5 a	25,6 b
I-22	6,2 b	2,3 e	17,2 a	20,8 c	29,3 a
I-23	5,3 b	10,7 b	16,2 b	24,0 b	24,8 b

Código Isolado	(conclusão) Diâmetro médio das lesões formadas pela inoculação dos isolados em trifólios de soja (mm)				
	24 horas AI	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
I-24	0,8 d	4,7 d	8,6 d	11,6 e	12,6 c
I-25	7,9 a	6,7 c	18,0 a	25,6 b	34,9 a
I-26	1,0 d	3,6 d	6,1 e	6,5 f	7,3 d
I-27	8,7 a	13,5 a	18,2 a	28,5 a	26,9 b
I-28	0 d	1,1 e	2,3 f	2,5 g	1,6 e
I-29	0,3 d	12,2 a	14,3 b	18,9 c	35,3 a
I-30	8,8 a	10,6 b	18,4 a	25,7 b	31,6 a
I-31	8,8 a	15,4 a	22,1 a	24,7 b	24,2 b
I-32	4,9 b	8,6 b	12,3 c	18,8 c	17,7 c
I-33	0,1 d	3,0 d	6,0 e	7,7 f	6,9 d
I-34	4,3 c	11,1 b	17,9 a	23,9 b	27,0 b
I-35	1,3 d	4,1 d	8,2 d	13,4 d	11,7 c
I-36	2,0 c	6,5 c	11,0 c	13,8 d	14,7 c
I-37	9,3 a	14,7 a	20,1 a	29,5 a	27,2 b
I-38	1,5 d	6,8 c	12,0 c	14,9 d	16,4 c
I-39	4,5 b	8,5 b	12,5 c	18,7 c	18,9 c
I-40	9,4 a	13,7 a	17,9 a	26,5 b	26,7 b
I-41	5,6 b	11,5 b	17,3 a	24,8 b	7,2 d
I-42	2,8 c	7,7 c	13,2 b	20,3 c	27,4 b
I-43	4,9 b	10,2 b	15,0 b	20,9 c	25,3 b
I-44	0 d	0,4 e	0,9 f	2,2 g	0,7 e
I-45	8,0 a	9,8 b	11,6 c	18,2 c	17,7 c
I-46	6,7 b	10,6 b	14,5 b	21,1 c	18,7 c
I-47	8,6 a	14,2 a	19,7 a	30,8 a	28,5 b
I-48	9,3 a	14,5 a	19,7 a	28,8 a	27,6 b
I-49	0,8 d	4,2 d	13,0 b	23,1 c	33,1 a
I-50	4,2 c	8,2 b	12,2 c	19,2 c	17,6 c
I-51	0 d	2,3 e	4,6 e	8,2 f	5,1 e
I-52	0,9 d	5,0 c	13,2 b	28,6 a	29,4 a
I-53	0,5 d	3,2 d	5,9 e	6,6 f	7,1 d
I-54	7,3 b	13,2 a	19,1 a	25,8 b	23,2 b
I-55	6,4 b	11,3 b	16,1 b	21,9 c	23,6 b
I-56	1,3 d	3,6 d	6,1 e	6,5 f	7,3 d
I-57	1,5 d	4,5 d	7,5 d	10,1 e	9,0 d
CV (%)	36,92	26,58	22,50	18,91	21,12

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferiram estatisticamente entre si segundo o teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

Pode-se observar que os isolados apresentaram várias diferenças quanto ao potencial patogênico, variando de 0 a 9 mm já na primeira avaliação (após 24 horas da inoculação). Na última avaliação (72 horas após a inoculação), enquanto os trifólios de alguns isolados estavam praticamente todo lesionado como, por exemplo, o I-04 (Honório Serpa-PR) e I-20 (Ventania-PR), outros praticamente encontravam-se sem lesões, como no caso dos trifólios inoculados pelo isolado I-09 (Pinhão-PR), sendo possível se detectar várias diferenças significativas entre o diâmetro médio das lesões formadas pelos isolados inoculados em trifólios de soja, segundo o teste Skott-Knott (1% de probabilidade).

Na primeira avaliação (24 horas após inoculação) quatro níveis de patogenicidade (A, B, C e D) foram observados, de forma que a cada 12 horas um novo nível de patogenicidade foi surgindo, até a quarta avaliação (60 horas após inoculação), que apresentou o maior número de diferenças significativas detectadas, totalizando sete níveis (A, B, C, D, E, F e G). Na quinta e última avaliação (após 72 horas de inoculação), as diferenças significativas observadas diminuíram para quatro apenas, provavelmente devido ao fato de alguns isolados alcançarem o limite dos folíolos, igualando os mesmos entre si, em alguns casos nessa última avaliação.

Como a avaliação que apresentou maior número de diferenças significativas foi a realizada após 60 horas de inoculação, as próximas análises, relacionando patogenicidade com as características de cada isolado (origem e morfologia), serão em torno desta avaliação.

Na Tabela 1.8, os isolados foram organizados decrescentemente, segundo o diâmetro médio das lesões formadas através de suas inoculações em trifólios de soja, delimitando-se cada nível de patogenicidade segundo o teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade e os dados de cada cidade de origem e cultura e ano de coleta dos isolados.

Tabela 1.8 – Resultados obtidos na avaliação 60 horas AI dos isolados de *S. sclerotiorum*, quando estes foram inoculados em trifólios de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade e as características de cada região dos isolados (continua).

Cod.	Cultura	Ano	Diâmetro da Lesão 60h AI (mm)	Alt (m)	T Min (°C)***	T Max (°C)***	T.M. (°C)***
I-47	Soja	2010**	30,8 a*	545	14,9	29,6	22,2
I-20	Soja	2009	29,6 a	940	15,5	26,2	20,9
I-37	Soja	2009	29,5 a	940	15,5	26,2	20,9
I-48	Soja	2010	28,8 a	520	18,8	28,6	23,7
I-16	Soja	2009	28,7 a	1.090	17,1	28,3	22,7
I-52	Ansarinha	2010	28,6 a	940	15,5	26,2	20,9
I-21	Soja	2009	28,5 a	870	17,6	29,1	23,3
I-27	Soja	2009	28,5 a	1.000	14,4	24,8	19,6
I-40	Soja	2009	26,5 b	1.110	17,5	28,4	23,0
I-15	Soja	2009	25,8 b	1.010	16,8	27,9	22,4
I-54	Serralha	2010	25,8 b	850	15,4	26,1	20,8
I-30	Soja	2009	25,7 b	850	15,4	26,1	20,8
I-25	Soja	2009	25,6 b	890	15,7	26,7	21,2
I-04	Soja	2009	24,9 b	870	17,9	29,5	23,7
I-41	Soja	2009	24,8 b	900	15,1	26,1	20,6
I-31	Soja	2009	24,7 b	900	15,1	26,1	20,6
I-23	Soja	2009	24,0 b	890	15,7	26,7	21,2
I-34	Soja	2009	23,9 b	1.090	17,1	28,3	22,7
I-18	Soja	2009	23,2 c	900	15,1	26,1	20,6
I-02	Soja	2009	23,1 c	1.040	14,7	25,5	20,1
I-49	Feijão	2010	23,1 c	710	17,9	27,9	22,9
I-55	Alface	2011	21,9 c	850	15,4	26,1	20,8
I-46	Soja	2010	21,1 c	790	20,1	30,7	25,4

(conclusão)							
Cod.	Cultura	Ano	Diâmetro da Lesão 60h AI (mm)	Alt (m)	T Min (°C)***	T Max (°C)***	T.M. (°C)***
I-43	Soja	2011	20,9 c	850	15,4	26,1	20,8
I-07	Soja	2009	20,8 c	730	16,0	26,9	21,5
I-22	Soja	2009	20,8 c	810	15,9	26,5	21,2
I-42	Soja	2009	20,3 c	870	17,6	29,1	23,3
I-10	Soja	2009	20,2 c	790	15,6	26,6	21,1
I-50	Girassol	2010	19,2 c	790	15,6	26,6	21,1
I-29	Soja	2009	18,9 c	790	15,6	26,6	21,1
I-03	Soja	2009	18,9 c	890	15,7	26,7	21,2
I-32	Soja	2009	18,8 c	770	16,3	27,3	21,8
I-39	Soja	2009	18,7 c	870	17,6	29,1	23,3
I-45	Soja	2009**	18,2 c	740	20,5	30,9	25,7
I-13	Soja	2009	18,0 c	1.090	17,1	28,3	22,7
I-05	Soja	2009	16,6 d	870	17,6	29,1	23,3
I-06	Soja	2009	16,0 d	1.090	17,1	28,3	22,7
I-19	Soja	2009	15,6 d	890	15,7	26,7	21,2
I-08	Soja	2009	15,0 d	1.050	14,9	25,6	20,0
I-38	Soja	2009	14,9 d	870	17,6	29,1	23,3
I-36	Soja	2009	13,8 d	900	15,1	26,1	20,6
I-35	Soja	2009	13,4 d	810	15,9	26,5	21,2
I-11	Soja	2009	12,5 e	900	15,1	26,1	20,6
I-24	Soja	2009	11,6 e	770	16,3	27,3	21,8
I-12	Soja	2009	11,4 e	900	15,1	26,1	20,6
I-17	Soja	2009	11,2 e	770	16,3	27,3	21,8
I-57	Canola	2010	10,1 e	790	15,6	26,6	21,1
I-14	Soja	2009	10,1 e	1.040	14,7	25,5	20,1
I-51	Couve	2010	8,2 f	850	15,4	26,1	20,8
I-33	Soja	2009	7,7 f	850	15,4	26,1	20,8
I-53	Repolho	2010	6,6 f	850	15,4	26,1	20,8
I-26	Soja	2009	6,5 f	940	15,5	26,2	20,9
I-56	Salsa	2011**	6,5 f	880	16,0	27,0	21,0
I-01	Soja	2009	5,5 f	900	15,1	26,1	20,6
I-09	Soja	2009	2,7 g	1.090	17,1	28,3	22,7
I-28	Soja	2009	2,5 g	850	15,4	26,1	20,8
I-44	Soja	2010	2,2 g	945	18,4	27,5	22,9

* Letras seguidas da mesma letra, não diferiram estatisticamente segundo teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

** Ano em que os isolados foram doados para a presente pesquisa.

*** Média das temperaturas entre novembro e março (Dados: Somar).

Ao analisar os resultados da Tabela 1.8, o nível A, considerado mais patogênico apresentou 8 isolados e lesões variando de 28,5 a 30,8 mm. Já o nível B, apresentou 10 isolados, com lesões variando de 23,9 a 26,5 mm de diâmetro médio. No nível C foi verificado maior número de isolados (17), os quais formaram lesões entre 18,0 e 23,2 mm de diâmetro médio. No nível D, 7 isolados foram classificados, com lesões variando de 13,4 a 16,6 mm de diâmetro. Os níveis E e F apresentaram apenas 6 isolados cada um, variando de 10,1 a 12,5 mm e 5,6 a 8,2 mm o diâmetro das lesões formadas, respectivamente. E o nível G,

com menor média de diâmetro de lesão formada pelos isolados, variando de 2,2 a 2,7 mm e apresentada por 3 isolados.

Para ressaltar a variabilidade patogênica dos isolados, comparou-se a menor lesão com a maior lesão, sendo o maior diâmetro médio formado 30,8 mm (I-47 – Maringá-PR) 14 vezes superior ao menor diâmetro de lesão formado 2,2 mm (I-44 – Formosa-GO) (Tabela 1.8).

O quarto nível de patogenicidade (D) apresentou apenas isolados coletados em 2009 e provenientes de área de soja, no entanto, ao se observar que nos demais níveis não ocorreu nenhuma relação assim (Tabela 1.8).

Com relação às altitudes das regiões de coleta dos isolados, o nível A apresentou os dois menores valores, sendo eles 520 m (I-48 – Arinos-MG) e 545 m (I-47 – Maringá-PR), no entanto, demais altitudes apresentadas neste nível não foram tão baixas assim, chegando até a 1.090 m (I-16 – Pinhão-PR) e valores intermediários como 870 m (I-21 – Mangueirinha-PR) e 940 m (I-24, I-37 e I-52 – Ventania-PR). Os demais níveis variaram suas altitudes de 850 a 1.110 m (nível B), 710 a 1.090 m (nível C), 870 m a 1.090 m (nível D), 770 m a 1.040 m (nível E), 850 m a 940 m (nível F), sendo este o nível com menor variação entre as altitudes apresentadas e finalmente o nível G, de 850 m a 1.090 m (Tabela 1.8).

A variação observada entre os níveis de patogenicidade foi alta, tanto para as temperaturas mínimas, como para as máximas e as médias. No nível C (terceiro mais patogênico) foram observadas diferença de mais de cinco graus entre as temperaturas das regiões de origem dos isolados, sendo que a temperatura mínima variou de 14,7 °C (I-02 – Carambeí-PR) a 20,5 °C (I-45 – Jataí-GO), a temperatura máxima variou de 25,5 °C (I-02 – Carambeí-PR) a 30,9 °C (I-45 – Jataí-GO) e a temperatura média de 20,1 °C (I-02 – Carambeí-PR) a 25,7 °C (I-45 – Jataí-GO). Novamente, o nível F (segunda menor patogenicidade) apresentou os valores da região de origem dos isolados com a menor variação, não ultrapassando 0,4 °C entre eles (Tabela 1.8).

Os mesmos dados da patogenicidade dos isolados, obtidos por meio da inoculação dos trifólios de soja (60 horas AI), foram comparados com as características morfológicas de cada isolado (Tabela 1.9).

Tabela 1.9 – Resultados obtidos na avaliação 60 horas após inoculação (AI) dos isolados de *S. sclerotiorum*, quando estes inoculados em trifolhos de soja, o resultado do teste de comparação de médias Skott-Knott a 1% de probabilidade e as características morfológicas de cada isolado (continua).

Cód ¹	Diam ² Lesão (cm) 60 horas AI	Crescimento micelial (dias) ³	C ⁴	Crescimento Escleródios ⁵	Quantidade Escleródios ⁶	Tam. ⁷	Peso escleródios (mg) ⁸	F ⁹
I-47	30,8 a	9,8 a	A	14,4 a	37,2 b	2-7	23,0 a	R
I-20	29,6 a	7,8 b	I	11,8 b	36,8 b	1-4	8,3 h	D
I-37	29,5 a	9,0 b	I	15,4 a	29,2 c	1-4	11,3 f	D
I-48	28,8 a	9,8 a	I	13,8 b	47,8 a	2-4	6,8 i	D
I-16	28,7 a	9,8 a	I	14,0 a	21,6 d	2-4	11,2 f	D
I-52	28,6 a	10,6 a	I	14,0 a	27,6 c	2-4	5,8 j	D
I-21	28,5 a	9,8 a	I	14,6 a	46,0 a	2-3	20,8 b	D
I-27	28,5 a	8,8 b	I	12,8 b	32,2 c	2-4	4,9 k	D
I-40	26,5 b	9,2 b	I	13,2 b	29,8 c	2-3	13,1 e	R
I-15	25,8 b	9,6 b	I	13,6 b	33,8 c	2-4	4,1 k	D
I-54	25,8 b	10,4 a	A	14,4 a	33,2 c	2-4	9,0 h	D
I-30	25,7 b	11,2 a	I	15,8 a	35,0 c	2-4	10,4 g	R
I-25	25,6 b	8,8 b	I	13,0 b	38,6 b	2-4	10,9 f	D
I-04	24,9 b	10,4 a	I	14,4 a	32,0 c	2-3	9,6 g	R
I-41	24,8 b	9,6 b	I	14,0 a	28,6 c	2-4	5,8 j	R
I-31	24,7 b	9,0 b	R	13,0 b	42,8 b	1-4	12,6 e	D
I-23	24,0 b	9,2 b	R	14,2 a	27,4 c	2-3	14,5 d	I
I-34	23,9 b	9,8 a	I	13,2 b	33,0 c	2-6	7,4 i	D
I-18	23,2 c	10,2 a	I	13,4 b	30,6 c	2-3	7,4 i	D
I-02	23,1 c	9,2 b	I	14,0 a	22,6 d	1-6	19,1 c	D
I-49	23,1 c	9,6 b	I	13,8 b	47,6 a	2-4	7,9 i	D
I-55	21,9 c	9,2 b	R	13,6 b	21,4 d	2-4	8,7 h	D
I-46	21,1 c	11,0 a	R	14,6 a	19,8 d	2-4	11,3 f	D
I-43	20,9 c	9,0 b	R	13,8 b	22,2 d	2-4	9,1 h	D
I-07	20,8 c	10,2 a	I	14,8 a	22,2 d	2-6	7,5 i	R
I-22	20,8 c	10,4 a	I	15,2 a	38,8 b	1-4	8,7 h	D
I-42	20,3 c	9,4 b	R	13,6 b	28,0 c	2-3	8,2 h	D
I-10	20,2 c	11,0 a	R	14,2 a	36,0 c	2-3	6,2 j	D
I-50	19,2 c	9,4 b	R	13,4 b	42,8 b	2-3	12,5 e	R
I-29	18,9 c	9,6 b	I	13,6 b	32,0 c	1-8	9,4 g	D
I-03	18,9 c	9,0 b	I	13,8 b	27,8 c	2-4	8,4 h	R
I-32	18,8 c	8,8 b	R	13,0 b	23,6 d	2-3	7,7 i	D
I-39	18,7 c	10,2 a	I	14,8 a	25,0 d	2-3	4,8 k	D
I-45	18,2 c	9,2 b	I	13,8 b	31,8 c	1-8	7,8 i	R
I-13	18,0 c	9,8 a	I	13,6 b	52,2 a	2-5	9,0 h	D
I-05	16,6 d	8,6 b	I	13,0 b	35,2 c	2-3	8,7 h	R
I-06	16,0 d	9,6 b	I	14,6 a	34,0 c	2-3	7,2 i	D
I-19	15,6 d	8,4 b	I	12,0 b	24,8 d	1-4	9,5 g	D
I-08	15,0 d	9,0 b	R	14,6 a	27,4 c	2-7	18,7 c	I
I-38	14,9 d	9,2 b	I	13,6 b	40,4 b	2-6	8,3 h	R
I-36	13,8 d	9,0 b	R	13,6 b	40,2 b	1-3	7,2 i	R

(conclusão)								
Cód ¹	Diam ² Lesão (cm) 60 horas AI	Crescimento micelial (dias) ³	C ⁴	Crescimento Escleródios ⁵	Quantidade Escleródios ⁶	Tam. ⁷	Peso escleródios (mg) ⁸	F ⁹
I-35	13,4 d	9,0 b	I	13,4 b	27,4 c	1-4	7,2 i	D
I-11	12,5 e	7,6 b	I	12,0 b	33,0 c	2-4	8,1 h	I
I-24	11,6 e	11,2 a	I	15,6 a	49,4 a	2-3	10,2 g	I
I-12	11,4 e	8,2 b	R	13,6 b	41,2 b	2-4	12,9 e	I
I-17	11,2 e	9,6 b	I	13,6 b	55,8 a	2-3	7,6 i	I
I-57	10,1 e	9,2 b	I	13,4 b	19,2 d	2-3	7,3 i	D
I-14	10,1 e	9,8 a	R	14,2 a	32,2 c	1-4	9,1 h	D
I-51	8,2 f	9,0 b	I	13,2 b	16,6 d	3-5	9,7 g	D
I-33	7,7 f	11,0 a	R	15,2 a	20,8 d	2-6	7,8 i	R
I-53	6,6 f	10,2 a	I	14,6 a	31,0 c	2-5	3,7 k	D
I-26	6,5 f	8,8 b	R	12,4 b	40,6 b	1-4	8,1 h	D
I-56	6,5 f	9,4 b	R	14,2 a	19,0 d	2-4	11,1 f	D
I-01	5,5 f	11,0 a	R	15,4 a	57,2 a	1-3	6,4 j	D
I-09	2,7 g	9,0 b	R	13,8 b	47,6 a	2-4	9,2 h	D
I-28	2,5 g	8,8 b	I	12,6 b	34,6 c	2-3	12,0 e	D
I-44	2,2 g	9,0 b	R	13,4 b	35,4 c	2-4	11,6 f	D

* Letras seguidas da mesma letra, não diferiram estatisticamente segundo teste de Skott-Knott a 1% de probabilidade.

1 – Código dos Isolados;

2 – Diâmetro médio da lesão formada nos trifólios de soja, após 60 horas a inoculação dos isolados;

3 – Tempo necessário para os isolados ocuparem toda a placa de Petri de 90 mm de diâmetro com BDA, em dias;

4 – Características miceliais dos isolados em placas de Petri, onde A = abundante; R = Ralo; I = Irregular (diferentes características);

5 – Tempo necessário para a formação do primeiro escleródio em placa, em dias;

6 – Quantidade de escleródios formados por placa, após 35 dias de incubação;

7 – Tamanho dos escleródios em placa, avaliando-se a maior medida dos mesmos, em mm;

8 – Peso médio dos escleródios, em mg;

9 – Formato dos escleródios, onde: R = Arredondado; I = Irregulares (sem forma definida) e D = Diversos (vários formatos);

Quanto às características morfológicas apresentadas por cada um dos sete níveis de patogenicidade, pode-se observar que nenhum deles apresentou uma característica singular quanto aos critérios analisados de densidade e cor do micélio, quantidade e formato dos escleródios (Tabela 1.9).

Com relação ao tempo necessário para ocupar toda a placa de Petri (dias), o nível E apresentou a maior variação entre os isolados, chegando quase a 4 dias de diferença entre os isolados I-11 (Palmeira-PR) e I-24 (Prudentópolis-PR) para tal crescimento (Tabela 1.9).

O menor tempo necessário para a formação de escleródios em placa de Petri foi apresentado pelo isolado I-20 (Ventania-PR), que precisou em média de 11,8 dias, e este isolado foi classificado no nível A, ou seja, no mais patogênico, sendo a segunda maior lesão

formada, inferior apenas do isolado I-47 (Maringá-PR), no entanto, o mesmo não ocorreu para outros isolados.

As médias dos dados da avaliação da patogenicidade após 60 horas de inoculação dos isolados nos trifólios de soja, das informações da origem dos isolados e das suas características morfológicas, separados conforme suas diferenças estatísticas nos níveis de patogenicidade (Skott-Knott) e a análise da variância das médias de cada nível encontram-se na Tabela 1.10.

Tabela 1.10 – Níveis de patogenicidade segundo a inoculação em trifólios de soja dos isolados de *S. sclerotiorum* 60 horas AI, e a média dos critérios avaliados, segundo cada nível.

Dímetro Lesão ¹ (60 horas AI) (mm)		Altitude (m)	T Min (°C)	T Max (°C)	T.M. (°C)	Cresc ² (Dias)	Escl. ³ (Dias)	Qde ⁴	T ⁵ . (mm)	Peso ⁶ (mg)
29,10	A	855,6 ^{NS}	16,2 ^{NS}	27,4 ^{NS}	21,8 ^{NS}	9,4 ^{NS}	13,9 ^{NS}	34,8 ^{NS}	1-7	11,5 ^{NS}
25,16	B	936,0 ^{NS}	16,2 ^{NS}	27,2 ^{NS}	21,7 ^{NS}	9,7 ^{NS}	13,9 ^{NS}	33,4 ^{NS}	1-6	9,7 ^{NS}
20,36	C	840,0 ^{NS}	16,6 ^{NS}	27,5 ^{NS}	22,0 ^{NS}	9,7 ^{NS}	13,9 ^{NS}	30,9 ^{NS}	1-8	9,0 ^{NS}
15,03	D	925,7 ^{NS}	16,3 ^{NS}	27,3 ^{NS}	21,8 ^{NS}	9,0 ^{NS}	13,5 ^{NS}	32,8 ^{NS}	1-6	9,5 ^{NS}
11,13	E	861,7 ^{NS}	15,5 ^{NS}	26,5 ^{NS}	21,0 ^{NS}	9,3 ^{NS}	13,7 ^{NS}	38,5 ^{NS}	1-4	9,2 ^{NS}
6,84	F	878,0 ^{NS}	15,4 ^{NS}	26,1 ^{NS}	20,8 ^{NS}	9,9 ^{NS}	14,2 ^{NS}	30,9 ^{NS}	1-6	7,8 ^{NS}
2,46	G	961,7 ^{NS}	17,0 ^{NS}	27,3 ^{NS}	22,1 ^{NS}	8,9 ^{NS}	13,3 ^{NS}	39,2 ^{NS}	2-4	10,9 ^{NS}
CV (%)		13,36	8,10	5,07	6,05	8,41	6,53	28,28	-	39,81

NS – Não significativo segundo a análise de variância.

1 – Código do Isolado

2 – Tempo para os isolados ocuparem toda a placa de Petri de 90 mm de diâmetro com BDA, em dias;

3 – Tempo necessário para a formação do primeiro escleródio em placa, em dias;

4 – Quantidade de escleródios formados por placa, após 35 dias de incubação;

5 – Tamanho dos escleródios em placa, avaliando-se a maior medida dos mesmos, em mm;

6 – Peso médio dos escleródios, em mg;

Analisando-se a Tabela 1.10, observa-se que, as médias das altitudes, das temperaturas e dos valores da caracterização morfológica, não apresentaram distribuição ou variação crescente como os níveis de patogenicidade obtida das inoculações dos isolados nos trifólios de soja, e que nenhuma diferença significativa foi detectada entre os mesmos.

Na Figura 1.10 são mostradas as diferenças do tamanho das lesões formadas nos trifólios de soja, segundo os 7 níveis de patogenicidade apresentados pelos isolados avaliados.

Williams et al. (2010), trabalhando com um isolado de *S. sclerotiorum* mutante avirulento, deficiente na produção de ácido oxálico, quando inoculado em folhas de tomate, registraram a produção de lesões menores que o isolado virulento e com característica de uma resposta de hipersensibilidade da planta (AGRIOS, 2009), fato que se assemelha às pequenas lesões formadas pelos isolados I-09, I-28 e I-44 (classificados no nível de menor patogenicidade de trifólios) e que não evoluíram até o final do ensaio.

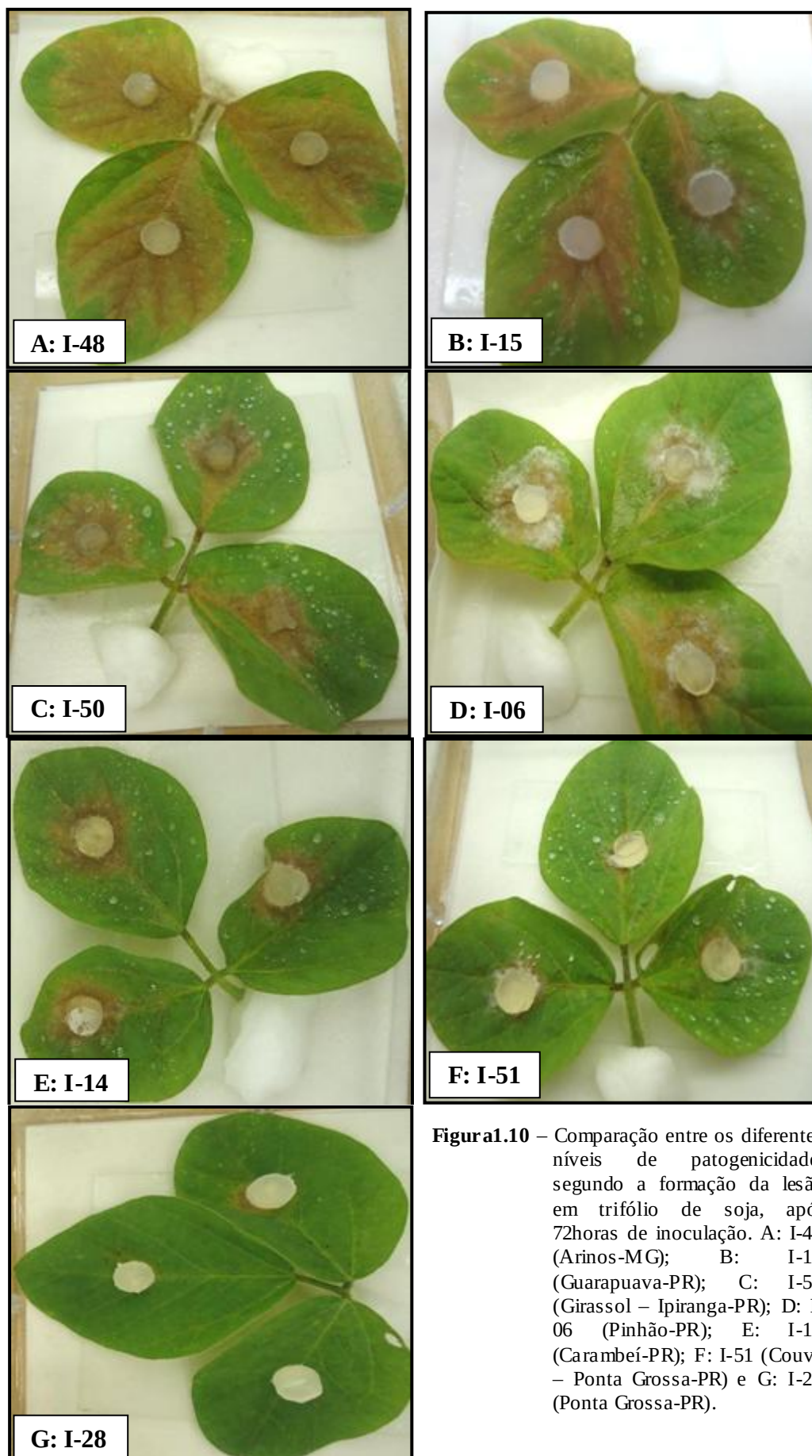


Figura 1.10 – Comparação entre os diferentes níveis de patogenicidade, segundo a formação da lesão em trifólio de soja, após 72 horas de inoculação. A: I-48 (Arinos-MG); B: I-15 (Guarapuava-PR); C: I-50 (Girassol – Ipiranga-PR); D: I-06 (Pinhão-PR); E: I-14 (Carambeí-PR); F: I-51 (Couve – Ponta Grossa-PR) e G: I-28 (Ponta Grossa-PR).

Possivelmente essas diferenças patogênicas identificadas entre os isolados avaliados, estejam relacionadas com a capacidade de produção de ácido oxálico e, ou, na quantidade atividade das enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro (LUMSDEN, 1979; BOLTON, 2006; WILLIAMS et al., 2010,) influenciadas por esse nível de ácido oxálico produzido pelos isolados, que poderia explicar os diferentes níveis de patogenicidade apresentados pelos mesmos.

A hipovirulência em fungos fitopatogênicos, refere-se a redução na habilidade de determinados isolados dentro de uma população de patógenos em infectar, colonizar, matar e se reproduzir em tecidos de hospedeiros. No gênero *Sclerotinia*, a hipovirulência tem sido associada com a presença de várias viroses fúngicas, incluindo uma espécie do gênero *Mitovirus* e outra espécie provavelmente pertencente ao gênero *Hypovirus* e um RNA satélite (SAHARAN; MEHTA, 2008). Grupos de crescimento vegetativo compatível podem aumentar a frequência de transmissão de viroses fúngicas entre isolados de uma população, podendo ser visto como um tipo de controle biológico (SAHARAN; MEHTA, 2008).

Há vários estudos visando o controle biológico por meio da aplicação de isolados hipovirulentos, em plantas com tecidos doentes em condições controladas e de campo. Com *S. minor*, a severidade da doença foi reduzida mais de 50% e o número de escleródios produzidos nos tecidos doentes tratados diminuiu em até 90%, além de que, estes escleródios produzidos foram hipovirulentos. Com *S. homeocarpa*, a eficácia do controle biológico chegou a 90% e 80% em condições controladas e de campo, respectivamente, e comparáveis a tratamentos com fungicidas (SAHARAN; MEHTA, 2008).

Estudos de viroses fúngicas, junto com estudos de hipovirulência em *Sclerotinia spp.*, devem ser realizados para aumentar a compreensão da influência de mecanismos moleculares sobre a expressão de hipovirulência nesses fitopatógenos e expandir o potencial dessas viroses fúngicas como mecanismo de controle biológico (MELZER et al., 2002; BOLAND, 2004).

Para correlacionar os isolados com os métodos de inoculação utilizados, os dados das lesões após 96 horas de inoculação na haste e após 60 horas de inoculação nos trifólios são apresentados na Tabela 1.11.

Tabela 1.11 - Comparação do resultado da inoculação dos isolados na haste e em trifólios de soja, nas avaliações de 96 horas e 60 horas AI, respectivamente (continua).

Código dos Isolados	Resultado de cada método de inoculação	
	Comprimento da Lesão (cm)	Diâmetro da Lesão (mm)
	Haste - 96 horas AI	Trifólio - 60 horas AI
I-01	0,0 b	5,5 f
I-02	5,9 a	23,1 c
I-03	3,4 b	18,9 c
I-04	2,4 b	24,9 b
I-05	1,6 b	16,6 d
I-06	1,0 b	16,0 d
I-07	1,4 b	20,8 c
I-08	6,6 a	15,0 d
I-09	1,4 b	2,7 g
I-10	6,6 a	20,2 c
I-11	7,2 a	12,5 e
I-12	3,8 b	11,4 e
I-13	4,4 a	18,0 c
I-14	2,0 b	10,1 e
I-15	0,6 b	25,8 b
I-16	6,9 a	28,7 a
I-17	0,7 b	11,2 e
I-18	1,3 b	23,2 c
I-19	5,0 a	15,6 d
I-20	6,5 a	29,6 a
I-21	1,1 b	28,5 a
I-22	2,4 b	20,8 c
I-23	5,6 a	24,0 b
I-24	3,6 b	11,6 e
I-25	0,9 b	25,6 b
I-26	1,6 b	6,5 f
I-27	8,2 a	28,5 a
I-28	2,3 b	2,5 g
I-29	2,6 b	18,9 c
I-30	1,2 b	25,7 b
I-31	2,3 b	24,7 b
I-32	2,2 b	18,8 c
I-33	5,2 a	7,7 f
I-34	0,6 b	23,9 b
I-35	1,1 b	13,4 d
I-36	2,1 b	13,8 d
I-37	1,8 b	29,5 a
I-38	2,6 b	14,9 d
I-39	1,8 b	18,7 c
I-40	0,9 b	26,5 b
I-41	2,6 b	24,8 b
I-42	-	20,3 c

(conclusão)

Código dos Isolados	Resultado de cada método de inoculação	
	Comprimento da Lesão (cm)	Diâmetro da Lesão (mm)
	Haste - 96 horas AI	Trifólio - 60 horas AI
I-43	2,7 b	20,9 c
I-44	2,4 b	2,2 g
I-45	5,4 a	18,2 c
I-46	5,6 a	21,1 c
I-47	5,0 a	30,8 a
I-48	7,0 a	28,8 a
I-49	3,2 b	23,1 c
I-50	2,8 b	19,2 c
I-51	0,0 b	8,2 f
I-52	4,4 a	28,6 a
I-53	1,0 b	6,6 f
I-54	6,7 a	25,8 b
I-55	2,0 b	21,9 c
I-56	1,0 b	6,5 f
I-57	2,4 b	10,1 e
C.V. (%)	66,73	18,91

Os dados da Tabela 1.11, indicaram que os isolados I-16, I-20, I-27, I-47, I-48 e I-52 apresentaram os maiores tamanhos de lesões pelos dois métodos de inoculação, sendo em ambos os casos do nível A, reafirmando seus níveis de patogenicidade em relação aos demais isolados. Os isolados I-54 e I-23 apresentaram o maior nível de patogenicidade quanto a sua inoculação na haste, no entanto quando inoculados nos trifólios de soja, foram considerados como o segundo grupo de maior patogenicidade. Os isolados I-02, I-10, I-13, I-45 e I-46 foram classificados no nível A (mais patogênico) quando inoculados na haste, mas foram classificados no nível C (terceiro mais patogênico) quando inoculados em trifólios de soja. Os isolados I-19 e I-08 também foram classificados no nível A quanto à lesão formada na haste, porém no nível D quanto às lesões formadas nos trifólios de soja. O isolado I-11 foi o único do nível E e o I-33 o único do nível F da patogenicidade nos trifólios, que, quando inoculados em hastes de plantas de soja foram classificados no nível A (maior patogenicidade). Nenhum isolado do nível G de patogenicidade no trifólio foi classificado no nível A de patogenicidade na haste (Tabela 1.11).

Os isolados I-21 e I-37 apresentaram maior nível de patogenicidade quando inoculados nos trifólios de soja e menor quando inoculados na haste de soja. Já os isolados I-04, I-15, I-25, I-30, I-31, I-34, I-40 e I-41 foram classificados no nível B nos dois métodos de inoculação, mas isso significa que pela inoculação na haste eles foram pouco patogênicos e

pela inoculação nos trifólios apresentaram o segundo maior nível de patogenicidade entre os isolados. Os isolados I-09, I-28 e I-44 tiveram o menor nível de patogenicidade para as duas formas de inoculação. Os isolados I-01, I-26, I-51, I-53 e I-56 foram classificados no nível F (segunda menor patogenicidade) quando inoculados nos trifólios e no menor nível de patogenicidade quando inoculados na haste de plantas de soja. Demais isolados classificados como menos patogênicos quando inoculados na haste da soja (B), se distribuíram nos níveis intermediários de patogenicidade (C, D e E) quando inoculados nos trifólios de soja (Tabela 1.11).

Esses dados demonstram haver diferenças entre os métodos de inoculação. Pelo método de inoculação na haste, observou-se maior variabilidade dos dados (C.V. de 66,73% contra apenas 18,91% da inoculação no trifólio), fato que diversos autores relatam também quanto aos resultados obtidos por este método (AUNG et al., 1994; PRATT; ROWE, 1991; GARCIA, 2008; SAGATA, 2010).

Já, pelo método de inoculação nos trifólios, foi possível detectar mais diferenças significativas entre os isolados, o que é essencial para identificar níveis satisfatórios de patogenicidade. Metodologia de inoculação em folhas destacadas tem sido utilizada por diversos autores, com resultados consistentes (GARCIA, 2008; SAGATA, 2010).

5 CONCLUSÃO

Os isolados apresentaram algumas diferenças morfológicas.

Diferentes níveis patogênicos foram detectados pelos dois métodos de inoculação.

O método de inoculação dos isolados em trifólios apresentou maior diferença significativa entre os isolados, e menor variabilidade entre as repetições.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um importante patógeno da cultura da soja que tem nas sementes seu principal meio de disseminação. A análise da qualidade sanitária das sementes é de extrema importância para a certificação dos lotes para comercialização e para a tomada de decisão visando o controle de doenças identificadas e assim, impedindo a disseminação das mesmas para novas áreas. Os métodos atualmente recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja são lentos e pouco precisos. Deste modo, o desenvolvimento de um método rápido e preciso torna-se importante, onde técnicas moleculares podem ser importantes ferramentas. O objetivo do trabalho, nesse capítulo, foi desenvolver um método molecular de detecção para *S. sclerotiorum*, em sementes de soja. Um par de primers específicos para *S. sclerotiorum* e o líquido de embebição de sementes foram utilizados nas reações de PCR. O par de primers foi capaz de detectar diferentes isolados do fungo, de diversas regiões e hospedeiros. Por meio de sementes artificialmente inoculadas com o fungo, em diferentes níveis, embebidas em água, alíquotas foram coletadas em diferentes horários de embebição e em amostras com diferentes níveis de contaminação. O teste foi capaz de detectar até 0,25% de contaminação das sementes (1 semente contaminada em 400 sementes). O menor tempo para a coleta de alíquota foi após 3 horas de embebição, onde o fragmento específico de 278 bp foi detectado em todas as amostras de sementes testadas. Mesmo com resultados promissores, o teste necessita ser aprimorado, principalmente devido aos compostos originados das sementes que, em diversas amostras, inibiram a reação de PCR, acusando resultados falsos negativos.

Palavras-chave: Patologia. Mofo branco. *Glycine max*. PCR. Inibição.

ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is an important pathogen of soybean that have on seeds their mainly dissemination means. The analysis of the sanitary quality of seeds is important to the lots certification and for making decision to the disease control and thus, preventing the spread of disease to new areas. The currently methods recommended to the *S. sclerotiorum* detection in soybean seeds are slow and imprecise. Thus, the development of a rapid and accurate method becomes necessary, where molecular techniques might be important tools. The objective, in this chapter, was to develop a molecular detection method for *S. sclerotiorum* in soybean seeds. A specific primer pair for *S. sclerotiorum* and the seed-soaked liquid were used in PCR reactions. The primer pair was able to detect different isolates of the fungus from various regions and hosts. Through artificially inoculated seeds, with the fungus, at different contamination levels, soaked in water, aliquots were collected at different times of soaking. The test was capable to detect the fungus in seeds samples with 0,25% of contamination (1 contaminated seed in 400 seeds). The best time to collect the aliquot was 3 hours after soaking, because the specific fragment of 278 bp was detected in all seed samples tested. Even with promising results, the method needs to be improved, mainly due to the compounds that originated from the seeds and inhibited the PCR reaction, accusing false negative results.

Keywords: Pathology. White mold. *Glycine max*. PCR. Inhibition.

1 INTRODUÇÃO

A análise da qualidade sanitária das sementes é importante para a certificação dos lotes para a comercialização e para a tomada de decisão visando o controle de doenças identificadas (MCGEE, 2002). O crescente aumento nos custos dos produtos químicos, da mão-de-obra e da energia, e a preocupação cada vez maior em relação à poluição ambiental, tem realçado a necessidade de uma tecnologia mais acurada, para otimizar o uso de produtos químicos (AZEVEDO, FREIRE, 2006), diminuindo assim seu impacto ambiental (ANDEF, 2010). Além de que a utilização de lotes sadios impediria a disseminação de doenças para novas áreas (NAPOLEÃO et al., 2001; MACHADO, LANGERAK, 2002; KIMATI et al., 2011).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente do Mofo branco na cultura da soja, tem causado perdas crescente em diversas regiões produtoras do Brasil (regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e em especial nos campos de cultivo no estado do Paraná, um dos maiores produtores de grãos do país. As perdas tem sido não somente no potencial de rendimento das diversas lavouras, mas também, ao longo das safras, na limitação de algumas áreas de plantio de soja e de outras culturas econômicas hospedeiras do fungo, tais como o feijão, girassol, canola, diversas hortaliças e outras culturas utilizadas nos planos de rotação (JACCOUD-FILHO et al., 2011).

Segundo Yang et al. (1998), em estudo que comprovou a transmissão do fungo *S. sclerotiorum* pela semente de soja internamente infectada, a mesma pode ser um agente de disseminação do patógeno para novas áreas. Segundo Steadman (1983), considerando a formação de um escleródio por uma semente infectada, esta corresponde a 2.000.000 de focos de infecção.

A detecção desse fungo na semente é fundamental para o controle da doença em novas áreas. Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente de soja, podendo ser citados a incubação em: Substrato de Papel ou método do Papel de Filtro (“Blotter test”); Rolo de Papel; Meio Agar-Bromofenol Neon, dentre outros (PERES, 1996; NASSER et al., 1996; MACHADO, LANGERAK, 2002; TAYLOR et al., 2006; NAPOLEÃO et al., 2006; BRASIL, 2009).

Os métodos de detecção normalmente utilizados para o fungo *S. sclerotiorum* em sementes, apesar dos avanços obtidos, exemplo do método de Neon-S (NAPOLEÃO et al., 2006) são baseados em incubação (BRASIL, 2009), consequentemente são lentos (JACCOUD-FILHO et al., 2002a; JACCOUD-FILHO et al., 2002b; BLAKEMORE, REEVES, 2002; CARVALHO VIEIRA; MACHADO, 2002) (resultados entre 8 e 30 dias) (BRASIL, 2009; GOULART, 2009) e as vezes, pouco precisos (JACCOUD-FILHO et al., 2002b; BLAKEMORE; REEVES, 2002; CARVALHO VIEIRA; MACHADO, 2002), o que pode em muitos casos permitir a disseminação de sementes contaminadas para novas áreas isentas da doença (JACCOUD-FILHO, 2005; CARVALHO VIEIRA; MACHADO, 2002).

Devido à crescente demanda por sementes de alta qualidade, programas de certificação tem apresentado a análise sanitária das sementes em larga escala. Isto significa que os laboratórios precisam estar preparados para analisar um grande número de amostras em um curto espaço de tempo (CARVALHO VIEIRA, MACHADO, 2002).

A avaliação de novos métodos, tais como a detecção desse patógeno por técnicas moleculares, certamente permitirá uma maior rapidez e precisão dos resultados, especialmente para um laboratório de rotina (JACCOUD-FILHO, 1996; JACCOUD-FILHO et al., 2002; BLAKEMORE; REEVES, 2002; TAYLOR et al., 2006; JACCOUD-FILHO; DABUL, 2011; GRABICOSKI et al., 2011). A Reação em Cadeia da Polimerase PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction” (SAIKI et al., 1985; MULLIS; FALOONA, 1987) é importante para o desenvolvimento de um teste, devido à sua facilidade, rapidez, versatilidade, especificidade e sensibilidade (JACCOUD-FILHO; 1996; JACCOUD-FILHO et al., 2002; BLAKEMOORE; REEVES, 2002).

Por meio da PCR, pequenas quantidades de DNA podem ser rapidamente amplificadas, isto é, através da síntese enzimática *in vitro* milhões de cópias de um segmento específico de DNA, são reproduzidos na presença da enzima DNA polimerase, até quantidades suficientes para que a análise seja feita. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (primers) que delimitam a sequência de DNA da fita dupla alvo da amplificação. Os primers são artificialmente sintetizados, de modo que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas, que irão parear a região alvo (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Visando a detecção do inóculo de *S. sclerotiorum*, no ar e em plantas de canola (*Brassica napus* L. var oleifera), Freeman et al. (2002), a partir da região ribossômica intergênica ITS (WHITE et al., 1990), desenvolveram um par de primers específicos para esse fungo, denominados SSFWD e SSREV.

Vários autores relatam a utilização da reação de PCR para detectar patógenos em sementes (BALL; REEVES, 1991; BLAKEMORE; REEVES, 1993; JACCOUD-FILHO; REEVES, 1993; AUDY et al., 1995; JACCOUD-FILHO et al., 1997; BERENDSEN et al., 1996; BONDE et al., 1996; SHAAD; HATZILOUKAS, 1996; CRUZ et al., 1996; SOUZA SANTOS et al., 1996; KONSTANTINOVA et al., 2002; JACCOUD-FILHO et al., 2002a, b; McEWAN; MULHOLLAND, 2002; GUILLEMETTE et al., 2002; VAN DER ZOUWEN et al., 2002; BERG et al., 2005; RICCIONI et al., 2005; McNEIL et al., 2005; THOMAS et al., 2005; JUSTENSEN et al., 2005; ABDELMONEM; RASMY, 2005; ROBÉNE-SOUSTRADE et al., 2005; VECHIATO et al., 2006, LANDA et al., 2007, CHILVERS et al., 2007; KULIK, 2008). Há estudos, que utilizaram PCR com o extrato das sementes embebidas, e reportaram problemas com inibição da reação da PCR, devido a substâncias liberadas pelas sementes (RASMUSSEN; WULFF, 1991; JACCOUD-FILHO, 1996; JACCOUD-FILHO et al., 2002a,b), no entanto sem sucesso, devido a essas substâncias (VAN DER ZOUWEN et al., 2002) ou obtiveram algum sucesso caso houvesse a realização de mais alguma etapa, como a extração do DNA do patógeno alvo (AUDY et al., 1995), e areamplificação da região alvo (Nested PCR) (JACCOUD FILHO, 1996).

Há vários compostos, orgânicos e inorgânicos, que podem interferir negativamente na amplificação de ácidos nucleicos pela reação de PCR, em diferentes níveis, podendo chegar a inibi-la completamente (MOREIRA, 1998). Os inibidores interferem em um ou mais dos três pontos essenciais da reação, sendo eles: a ruptura da célula, essencial para a extração do DNA; a captação ou degradação do DNA alvo e inibição da atividade da enzima de amplificação (DNA Polimerase) (WILSON, 1997; AL-SOUD; PETER RÅDSTROM, 1998; AL-SOUD; PETER RÅDSTROM, 2000). Entre os inibidores encontram-se componentes de alimentos (ex.: compostos orgânicos e fenólicos, glicogênio, gorduras e Ca^{2+}), compostos do ambiente (ex.: compostos fenólicos, ácidos húmicos e metais pesados), constituintes de células bacterianas, DNA não-alvo, contaminantes e itens laboratoriais (ex.: pólen, talco da luva, recipientes plásticos e celulose).

A semente de soja apresenta em sua composição química cerca de 40% de proteínas, 21% de lipídios (destes, 15% são de ácidos graxos saturados e 85% de ácidos graxos insaturados), 1 a 3% de substâncias não saponificáveis (esteróides, tocoferóis e a vitamina A), 34% de carboidratos (celulose, hemicelulose, outros) e 5% de cinzas (KAWAGA, 1995; MORAIS; SILVA, 1996); além de possuir produtos do metabolismo secundário (CARRÃO-PANIZZI, 1996). Com relação a metabólitos secundários, as plantas apresentam três principais grupos: os terpenos (isoprenóides, cardenolídeos) e seus derivados (esteróis); os compostos fenólicos, que constituem um grupo químico heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos (fenilpropanóides,, cumarinas, derivados de ácido benzóico, flavonóides, isoflavonóides, taninos) e os compostos nitrogenados (alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A embebição das sementes, principalmente durante a primeira fase (em média, as duas horas iniciais), é acompanhada pela liberação de açúcares, aminoácidos e eletrólitos em quantidades variáveis (DIAS; MARCOS FILHO, 1996). Entre esses exsudatos, liberados pelas sementes, podem estar presentes muitas substâncias com potencial de inibição de reações de PCR (VAN DER ZOUWEN et al., 2002).

Há vários fatores que influenciarão o nível da detecção, como, por exemplo, a amostra colocada na reação de PCR com um número mínimo de células, que contenham uma única cópia da sequência alvo, ou seja, poucas células alvo com várias substâncias inibitórias podem resultar em um falso-negativo, devido a diminuição da sensibilidade da reação. Outro ponto a ser considerado são as condições da reação, como por exemplo, a utilização de primers inapropriados, temperaturas ou tempos das fases da PCR impróprios, qualidade variável da DNA polimerase e concentração incorreta de Mg^{2+} e outros componentes. Já a contaminação e os outros fatores, possuem seus mecanismos de ação não muito bem compreendidos, mas sabe-se que, há uma interferência, química e ou física, com a viabilidade e ou atividade de algum componente essencial da reação (CHOU, 1991; WILSON, 1997; AL-SOUD; RÅDSTROM, 1998).

2 OBJETIVO

Desenvolver um método molecular para a detecção *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA

Para testar a eficiência e a especificidade do par de primers SSFWD/SSREV (FREEMAN et al., 2002), foi utilizado o DNA de 57 isolados de *S. sclerotiorum*, de outros fungos transmitidos ou relacionados com sementes de soja e o DNA da própria soja.

Os fungos foram crescidos em meio líquido à base de Caldo de Batata Dextrose (Potato Dextrose Broth - PDB), por período de 7-15 dias, em temperatura ambiente e sob agitação contínua de 50 rpm, em uma mesa agitadora pendular Modelo TE240/1 (TECNAL[®]). Depois de crescidos, os fungos foram filtrados em papel Germitest e colocados em placas de Petri, ambos esterilizados. Os fungos foram liofilizados pelo Liofilizador Modelo LD1500 (TERRONE[®]), e armazenados a -80 °C até serem utilizados para a extração do DNA micelial.

O micélio liofilizado de cada fungo foi macerado em nitrogênio líquido em um cadinho e com um pistilo de porcelana. Após cada utilização, os cadinhos e pistilos foram deixados em repouso durante a noite, cobertos por ácido clorídrico absoluto (HCl - 37%) para a destruição de qualquer resíduo fúngico (principalmente DNA), lavados com detergente e água ultra-pura, autoclavados a 1 atm e 121 °C por 20 minutos e secados em estufa a 60 °C por uma hora.

A extração de DNA foi efetuada segundo protocolo de Murray; Thompson (1980), modificado. Cerca de 50 a 120 mg de material fúngico macerado foi colocado em um microtubo de 2,0 mL e 600 µl de tampão de extração de CTAB (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; 1% e água ultra-pura) pré-aquecido a 65 °C foi adicionado. O microtubo foi incubado a 65 °C, agitando-se a cada 10 minutos, por 30 minutos a uma hora. Após, 600 µL de Clorofórmio:Alcool-isoamílico (proporção 24:1) foi adicionado e agitou-se manualmente por cinco minutos. Centrifugou-se por 15 minutos a 7.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e 600 µL de isopropanol a -20 °C foi adicionado, realizando uma leve agitação por inversão. Centrifugou-se a 7.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e 300 µL de Etanol 70% foram adicionados, e centrifugou-se por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µL de Etanol 95%. O sobrenadante foi descartado, e o microtubo foi deixado sobre a

bancada até o pellet de DNA secar (aproximadamente 12 horas em temperatura ambiente). Após secar, o DNA foi ressuspensionado em TE (10mM Tris-Cl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0).

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de micro volumes NanoVue[®] da GE, segundo recomendações do fabricante, foi utilizada a relação entre a absorbância de 260 nm e 280 nm para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total, coradas com GelRed (Biotium[®]) e separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. As amostras foram tratadas com RNase A (Sigma[®]) na proporção de 10 µg/mL (SAMBROOK et al., 2001). Após esses processos, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/µL e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas, nas reações de PCR.

3.1.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Para o crescimento de *S. sclerotiorum* em meio líquido, utilizou-se um escleródio, retirado de placa de Petri de cultura pura. Os isolados utilizados foram os mesmos apresentados na Tabela 1.1 (Capítulo I), e como padrão utilizou-se o isolado I-45 (Jatá-GO) (GARCIA, 2008).

3.1.2 Outros fungos

O DNA de alguns fungos, já estava disponível no Laboratório de Fitopatologia Aplicada e Patologia de Sementes da UEPG, utilizados em estudos anteriores, sendo eles: *Cercospora sojina*; *Phomopsis sojae*; *Aspergillus* spp.; *Cercospora kikuchii*; *Fusarium* spp. e *Colletotrichum truncatum*..

Para a extração do DNA de *Peronospora manshurica*, utilizou-se o tegumento de sementes de soja contaminadas pelo patógeno.

Para o crescimento, em meio líquido, de *Sclerotium rolfsii*, os escleródios foram retirados de placas de Petri de cultura pura do fungo, como descrito para os isolados de *S. sclerotiorum*. Os demais fungos: *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., foram crescidos em meio líquido, a partir de disco de BDA, proveniente de cultura pura.

3.1.3 Soja

Para a extração do DNA de soja, foram utilizados trifólios de plântulas de soja, cultivadas em vasos com substrato esterilizado, a base de cascas de eucalipto, pinus e cinzas (Lupa Fertilizantes[®]), em casa de vegetação, aparentemente saudáveis, em estágio fenológico V2 (segundo nó) (FEHR; CAVINESS, 1977).

Os trifólios foram limpos com hipoclorito 5%, posteriormente etanol 70% e finalmente com água ultra-pura. Após a secagem em temperatura ambiente, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, foi realizada a extração, a avaliação da qualidade e a armazenagem a -20 °C do DNA.

3.2 PCR da região ITS

Para avaliar a qualidade do DNA dos demais fungos utilizados e da soja, foi utilizada a reação de PCR com esses DNAs e um par de primers da região ITS, ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') e ITS5 (5' – GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G – 3') (WHITE et al., 1990), principalmente devido ao fato de que o par de primers específicos para a detecção de *S. sclerotiorum* SSFWD/SSREV foi construído a partir desta região (FREEMAN et al., 2002).

Cada reação de PCR continha 25 µL de 2X Master Mix PCR (1.5 U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0,2 mM dNTP, estabilizadores) (Sigma[®]), 20 µL de água ultra-pura (Sigma[®]), 0,2 µM de cada primer e 10 ng de DNA (tanto dos fungos como da soja). Como controle negativo foi utilizado uma reação idêntica à citada, no entanto sem nenhuma amostra (sem DNA), ou seja, apenas o Mix de PCR, água ultra-pura e os primers, e como controle positivo foram utilizados 5, 10 ou 50 ng de DNA do isolado padrão I-45 Jataí-GO.

As condições dos ciclos da PCR foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos (desnaturação); 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 42 °C por 2 minutos (anelamento dos primers) e 72 °C por 2 minutos (extensão de DNA); seguido por um ciclo final de extensão de DNA a 72 °C por 10 minutos (FREEMAN et al., 2002). Finalizados os ciclos da reação de PCR, as amostras foram mantidas a 4 °C até a utilização. Os produtos das reações de PCR

foram corados utilizando GelRed (Biotium[®]) e analisados em gel de agarose a 1% (SAMBROOK et al., 2001).

3.3 PCR com os primers específicos SSFWD/SSREV

Um par de primers específicos foi utilizado nas reações de amplificação de PCR, sendo eles: SSFWD (5' - GCT GCT CTT CGG GGC CTT GTA TCG - 3') e SSREV (5' - TGA CAT GGA CTC AAT ACC AAG CTG - 3') (FREEMAN et al., 2002).

Cada reação de PCR continha 25 µL de 2X Master Mix PCR (Sigma[®]), 20 µL de água ultra-pura (Sigma[®]), 0,2 µM de cada primer e 3 µL de amostra do líquido de embebição das sementes e, ou, 10 ng de DNA. Como controle negativo utilizou-se uma reação sem nenhuma amostra de DNA e, ou, do líquido de embebição das sementes, e como controle positivo foram utilizados 5, 10 ou 50 ng de DNA do isolado padrão.

As condições dos ciclos da PCR foram similares ao do Item 3.2, deste capítulo, variando apenas na temperatura de anelamento dos primers (52 °C) e no tempo de anelamento e extensão durante os mesmos 30 ciclos (1 minuto apenas). Finalizados os ciclos, as amostras foram mantidas em repouso a 4 °C até serem utilizadas. Os produtos das reações de PCR foram coradas utilizando GelRed (Biotium[®]) e analisadas em gel de agarose a 1% (SAMBROOK et al., 2001).

3.4 PCR de micélio e escleródio de *S. sclerotiorum*

Porções de micélio e de escleródio do fungo *S. sclerotiorum* foram utilizadas na reação de PCR, sem realizar a sua extração de DNA, para avaliar a viabilidade de um teste de detecção molecular sem esta etapa (JACCOUD-FILHO, 1996).

Coletou-se em torno de 0,2 mg de escleródio, e aproximadamente 0,1 mg de micélio do fungo. Cada uma dessas partes foi colocada em um microtubo de 200 µL com 100 µL de água ultra-pura esterilizada e, então, os microtubos foram incubados por 10 minutos a 95 °C. Para as reações de PCR (descrita Item 3.7 deste Capítulo), foram retiradas 3 µL de cada microtubo.

3.5 Amostra de semente de soja sadia

As sementes de soja, utilizadas nas avaliações, foram da cultivar CD 206 RR, Lote 408, fornecidas pelo Eng. Agr. Carlos Klenki (Cooperativa Bom Jesus – Lapa – PR – Brasil), que segundo o mesmo seriam oriundas de área isenta do patógeno. Essa amostra de sementes foi avaliada, utilizando os métodos recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja pelo Regras de Análise de Sementes, sendo eles: “Blotter-Test”, “Rolo de Papel” e “Neon-S” (BRASIL, 2009; LANGERAK; MACHADO, 2002) confirmando, assim, a ausência de *S. sclerotiorum* nas sementes de soja

Utilizou-se 400 sementes dessa amostra, que foram colocadas em um saco plástico hermeticamente fechado com água ultra-pura esterilizada, na proporção de 100 sementes/100 mL de água e mantidas a $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 2.1). Desse líquido foram retiradas alíquotas de 0 até 8 horas, em intervalos de 1 hora entre cada alíquota, e após essas 8 horas foram retiradas alíquotas às 12, 24, 48 e 72 horas. Os sacos foram agitados por 10 segundos antes da coleta das amostras. As alíquotas foram armazenadas a -20°C .

Nas reações de PCR, essas alíquotas de sementes sadias sem inoculação, foram consideradas como controle negativo do método e, separadamente, ao se adicionar 10 ng de DNA do isolado padrão a essas amostras na reação de PCR, foram consideradas como controle positivo, para avaliar a viabilidade do método.



Figura 2.1 – Sementes embebidas em água ultra-pura, na proporção de 100 sementes/100 mL de água, em um total de 400 sementes, prontas para a retiradas das alíquotas com o auxílio de uma micropipeta.

3.6 Sementes artificialmente infectadas

Seguindo a metodologia descrita por Jaccoud-Filho (1996), as sementes da mesma amostra da cultivar CD 206 RR (Lote 408) foram inoculadas artificialmente em placas de Petri com BDA, contendo a cultura do fungo *S. sclerotiorum* do isolado padrão, com 5 dias de idade, cultivadas em câmara de germinação a 14 °C e 12 horas de fotoperíodo. Para avaliar as sementes com diferentes potenciais de inóculo, diferentes tempos de inoculação nas placas de Petri foram utilizados, onde as sementes foram mantidas em contato com a cultura do fungo por: 0, 4, 8, 12, 24, 48, e 72 horas, utilizando-se 400 sementes para cada período. Após colocar-se as sementes nas placas, estas foram mantidas em câmara de germinação, sob mesmas condições anterior. Ao finalizar cada período de inoculação, as sementes de cada período foram colocadas em sacos hermeticamente fechados e embebidos com água ultra-pura esterilizada na proporção de 100 sementes/100 mL de água e mantidas a 4 °C $\pm$ 0,5 °C.

Para avaliar a viabilidade de detecção do patógeno nas sementes através dessa técnica e a interferência de inibidores da reação de PCR, foram coletadas, desse líquido das sementes, alíquotas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, e, 72 horas após o início da embebição, com auxílio de uma micropipeta de 1,0 mL. Os pacotes foram agitados por 10 segundos antes da coleta das alíquotas,. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C, até serem utilizadas (JACCOUD-FILHO, 1996).

3.7 Sementes inoculadas artificialmente e sementes sadias

Para avaliar o potencial de detecção dessa técnica, foram utilizadas sementes artificialmente inoculadas, misturadas com sementes sadias, em diferentes proporções (JACCOUD-FILHO, 1996). A inoculação artificial das sementes procedeu-se da mesma maneira descrita no item anterior, por um período de 72 horas. Em amostras de 400 sementes totais, as proporções de sementes infectadas utilizadas foram: 75% (300 sementes infectadas), 50% (200 sementes infectadas), 25% (100 sementes infectadas), 5% (20 sementes infectadas), 2,5% (10 sementes infectadas), 1% (4 sementes infectadas) e 0,25% (1 semente infectada). Todas essas amostras, contendo 400 sementes cada, foram colocadas, cada uma, em um saco plástico hermeticamente fechado e embebidas com água ultra-pura esterilizada na proporção de 100 sementes/100 mL de água e mantidas a 4 °C $\pm$ 0,5 °C.

Alíquotas de 1,0 mL, foram retiradas de cada uma das amostras do líquido de embebição das sementes, com diferentes porcentagens de sementes artificialmente infectadas, após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação a 4 °C, agitando-se os pacotes por 10 segundos antes da retirada, com o auxílio de uma micropipeta de 1.000 µL. Após a coleta, as alíquotas foram mantidas a -20 °C, até serem analisadas (JACCOUD-FILHO, 1996).

3.8 Análise dos resultados

Os fragmentos obtidos foram comparados com um marcador de peso molecular de 100 bp e os géis de agarose, após a corrida eletroforética, foram fotografados em um fotodocumentador, com auxílio de luz Ultra-Violeta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eficiência e especificidade do par de primers específicos para a detecção de *S. sclerotiorum* SSFWD/SSREV

Na avaliação da eficiência do par de primers SSFWD/SSREV (FREEMAN et al., 2002), foi positiva a amplificação da banda de 278 bp, específica para o fungo *S. sclerotiorum*, como previsto por Freeman, et al. (2002), para todos os 57 isolados testados desse fungo, mesmo os de diferentes regiões (Paraná, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia) e oriundos de várias plantas hospedeiras (Soja, Alface, Girassol, Canola, Couve, Ansarinha, Serrelha, Repolho e Feijão), como apresentado na Figura 2.2.

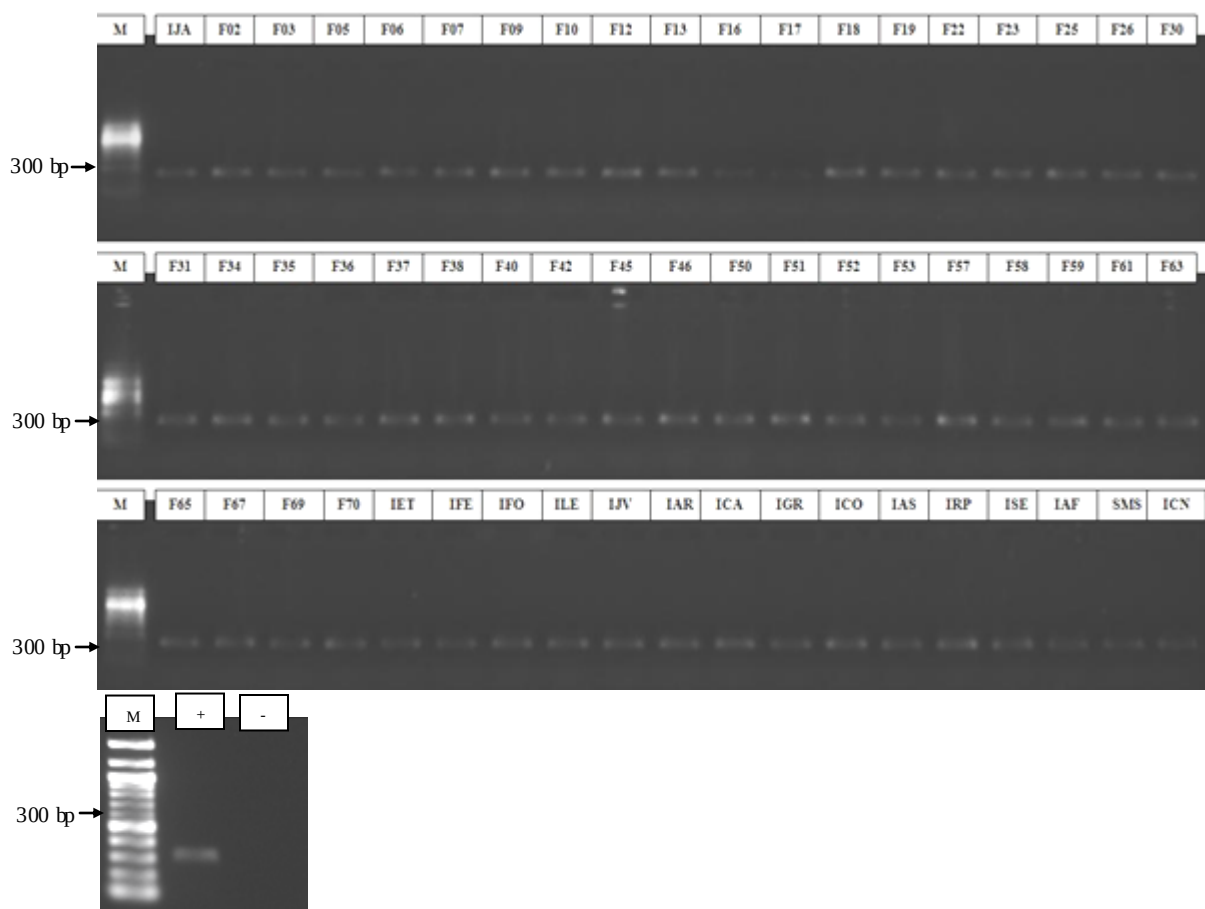


Figura 2.2 – Amplificação de um fragmento específico de 278 bp, através de reação de PCR com o par de primers específicos de *S. sclerotiorum* SSFWD/SSREV e o DNA dos isolados de *S. Sclerotiorum*. Controle Positivo: 10 ng do DNA do isoaldo padrão. Controle Negativo: Amostras sem DNA (Imagem: 11% de brilho).

Na Figura 2.3, é possível observar a especificidade do par de primers SSFWD/SSREV, pois não amplificou fragmento algum para as outras espécies de fungos testados e tão pouco de DNA da soja.

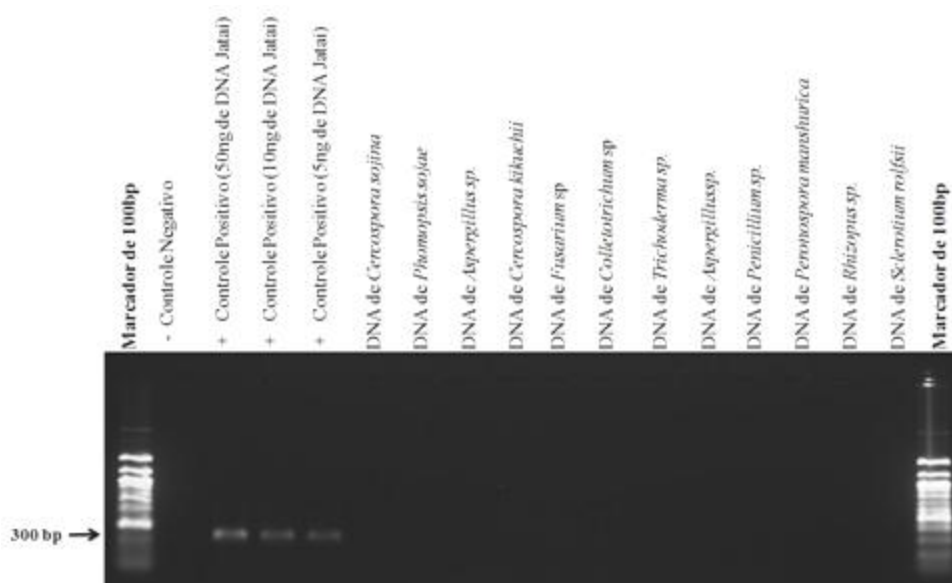


Figura 2.3 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR utilizando um par de primers específicos para *S. sclerotiorum* (SSFWD/SSREV) e 10 ng de DNA de diversos fungos transmitidos pela semente de soja. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controles positivos: 5, 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

Na Figura 2.4, pode-se visualizar a presença de uma banda para cada espécie testada, com peso molecular distintos devido a singularidade da região ITS de cada espécie. Pelo fato da região ITS ser a região da qual o par de primers específicos SSFWD/SSREV foi construído (FREEMAN et al., 2002), comprova a viabilidade do DNA desses outros fungos e a especificidade do par de primers específicos.

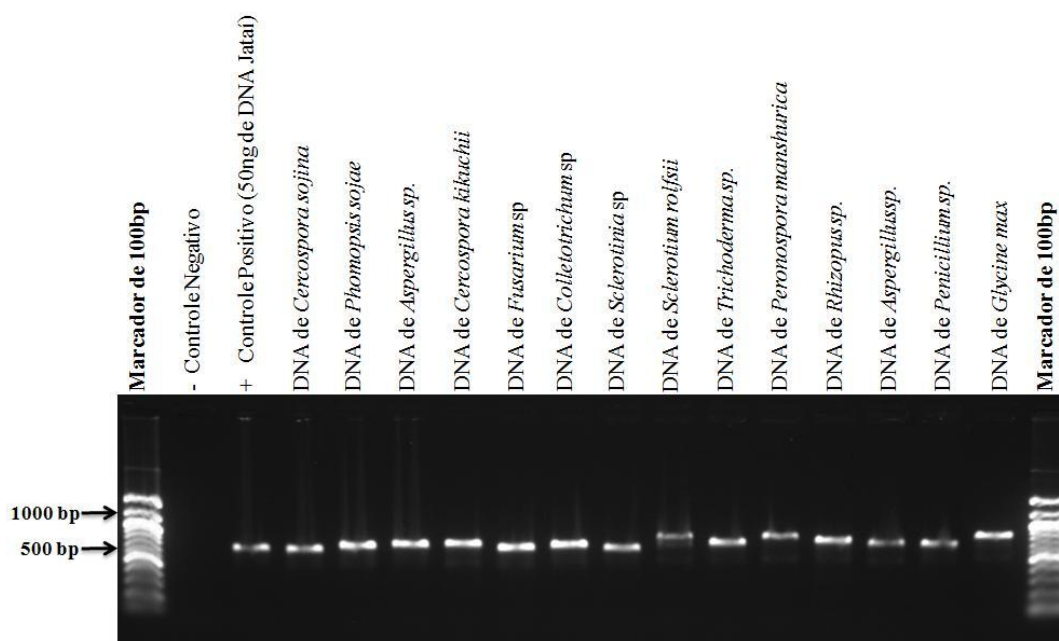


Figura 2.4 – Amplificação por meio de PCR, utilizando o par de primers da região ITS (ITS4/ITS5) e 10 ng de DNA de diversos fungos transmitidos pela semente de soja e o DNA de soja. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controle positivo: 10 ng de DNA do isolado padrão.

4.2 Sementes Sadias

O resultado da reação de PCR com as alíquotas do líquido de embebição das sementes de soja sadias pode ser observado na Figura 2.5, onde nenhum fragmento foi amplificado, principalmente o de 278 bp (específico para *S. sclerotiorum*). Esse resultado pode ser considerado como testemunha, de que essa amostra de sementes não era portadora de *S. sclerotiorum*, e dos próximos resultados.



Figura 2.5 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e a não amplificação de bandas de alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, e, 72 horas, retiradas do líquido de embebição das sementes sadias. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

Para avaliar se, por meio das alíquotas do líquido de embebição das sementes, seria possível detectar a presença de *S. sclerotiorum*, devido a possível presença de substâncias inibitórias da PCR (WILSON, 1997), foram adicionados às alíquotas, 10 ng de DNA do isolado padrão. Como apresentado na Figura 2.6, todas as alíquotas amplificaram, juntamente com o controle positivo (apenas DNA do isolado padrão), o fragmento específico de 278 bp, ou seja, essas alíquotas, em caso de existência de 10 ng de DNA puro de *S. sclerotiorum* não foram capazes de causar inibição da reação de PCR, em nenhum dos horários testados de coleta de amostra, após a embebição das sementes.



Figura 2.6 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas do líquido de embebição das sementes sadias com 10 ng de DNA de *S. sclerotiorum*. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

4.3 PCR com micélio e escleródio de *S. sclerotiorum*

Ao testar a PCR diretamente com as soluções incubadas de micélio e de escleródio de *S. sclerotiorum*, a reação foi capaz de detectar a presença do fungo, mesmo sem realizar a extração de DNA do mesmo, ou seja, foi amplificado o fragmento específico de 278 bp para o fungo nas alíquotas testadas na PCR, inclusive em suas duplicatas, como apresentado na Figura 2.7. Esses resultados corroboram a eficiência do método sem a necessidade de extração de DNA conforme sugerido anteriormente para *Phomopsis meridionali*, por Jaccoud Filho (1996).

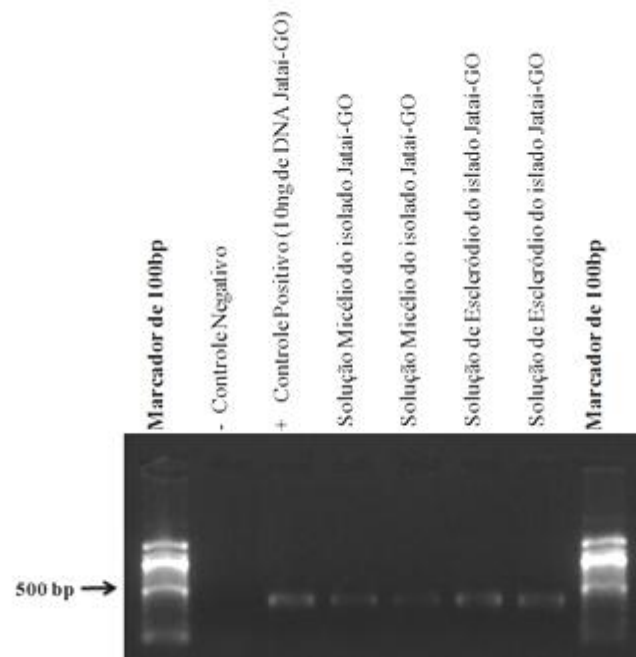


Figura 2.7 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas de soluções incubadas de micélio ou de escleródio de *S. sclerotiorum*. Controle negativo: Amostras sem DNA. Controle positivo: 10 ng de DNA do isolado padrão.

4.4 Sementes artificialmente inoculadas

Para se avaliar a viabilidade de detecção de *S. sclerotiorum* presentes em sementes de soja, realizou-se a inoculação artificial de sementes sadias, com vários tempos de inoculação, com o objetivo também de se testar a diferença de potencial de inóculo do fungo e sua relação com os possíveis inibidores de PCR, foram utilizados.

Em sementes inoculadas por 0 hora, em que as sementes foram colocadas na placa de Petri, contendo a cultura do fungo, e retiradas imediatamente. E mesmo com o contato rápido das sementes com o fungo, foi possível detectar a presença do fungo na amostra, desde a alíquota de 0 hora até a alíquota das 48 horas. Nota-se a gradual diminuição na intensidade de bandas a partir da alíquota das 6 horas, chegando a não aparecer na alíquota das 72 horas. Provavelmente esse resultado negativo é devido à presença de maior quantidade de exsudatos liberados pelas sementes de soja por causa do maior período de embebição, que inibiriam a reação de PCR.

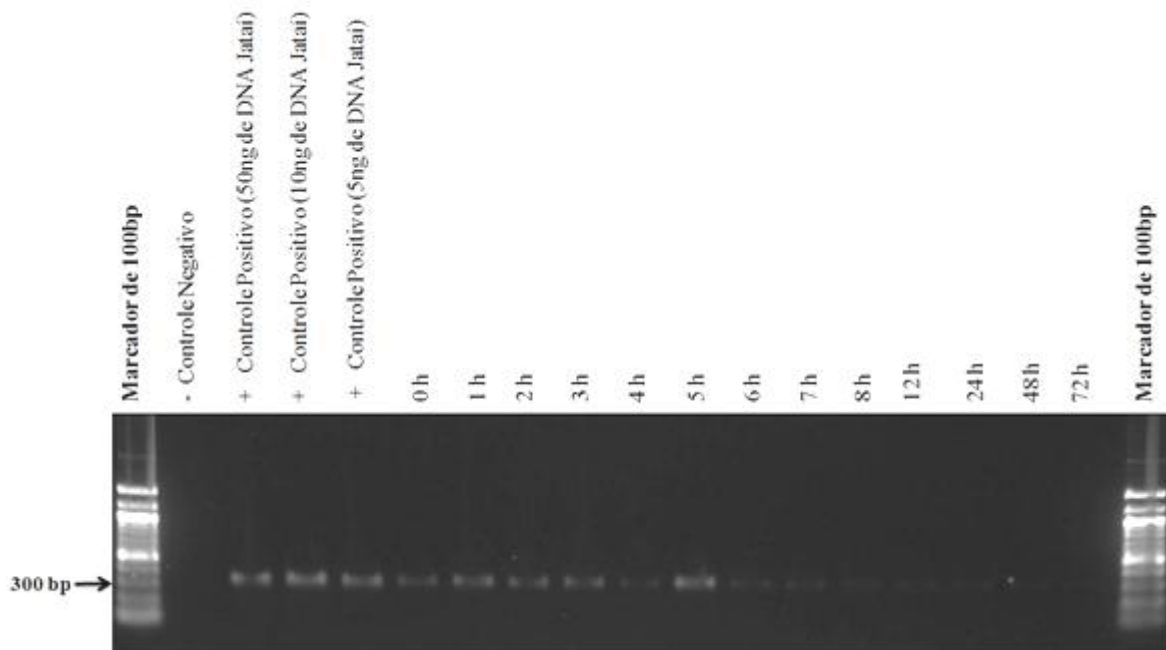


Figura 2.8 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 0 hora. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 6% de contraste)

O resultado das alíquotas retiradas das sementes inoculadas por 4 horas em placas de Petri pode ser visualizada na Figura 2.9. É possível visualizar a amplificação da banda do fragmento de 278 bp apresentada por todas as alíquotas, inclusive pela alíquota retirada as 72 horas de embebição, que não foi visualizada na inoculação por 0 hora. A visualização dessa banda provavelmente tem relação com o maior potencial de inóculo apresentado pelas sementes, devido ao maior período de inoculação das sementes, pois, segundo Wilson (1997), a presença de poucas células alvo, juntamente com a presença de várias substâncias inibitórias, podem diminuir o nível de sensibilidade da reação, acusando um resultado falso-negativo. Nota-se que também houve uma gradual diminuição na intensidade das bandas, a partir da alíquota das 12 horas, devido as substâncias inibidoras liberadas pelas sementes, que foram se acumulando, conforme aumentou-se o período de embebição.

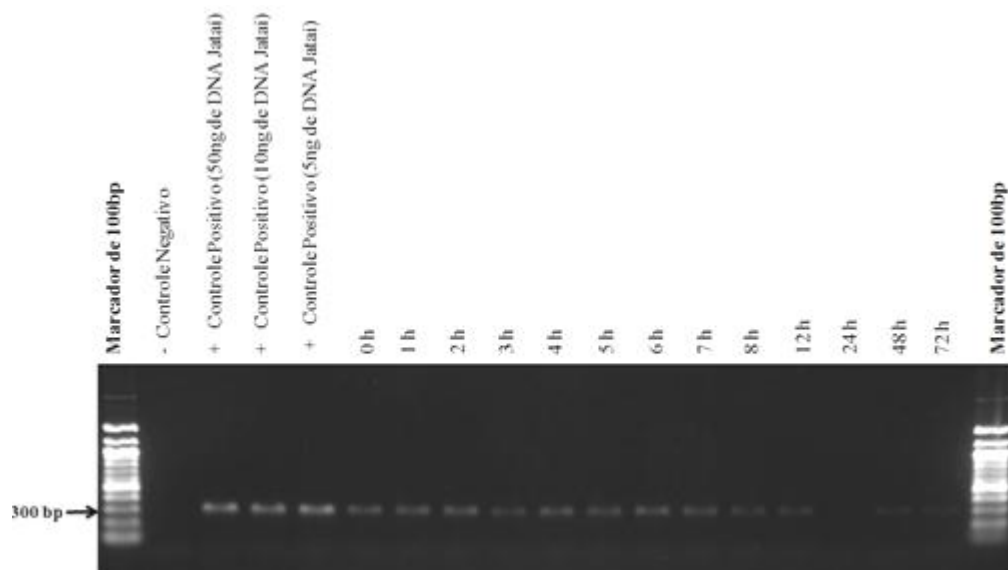


Figura 2.9 – Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 4 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

O resultado da PCR, com as alíquotas coletadas de sementes inoculadas por 4 horas, pode ser visualizada na Figura 2.10. As bandas das alíquotas as 48 e 72 horas de embebição, foram, gradativamente, menos intensas que as demais, demonstrando, novamente, presença de substâncias inibitórias. Ao comparar a Figura 2.10 com a Figura 2.9, nota-se que a intensidade das bandas na 2.10 apresentou gradual diminuição da intensidade das bandas, a partir somente da alíquota das 24 horas de embebição, provavelmente devido ao maior potencial de inóculo, por ser inoculada por um período maior.

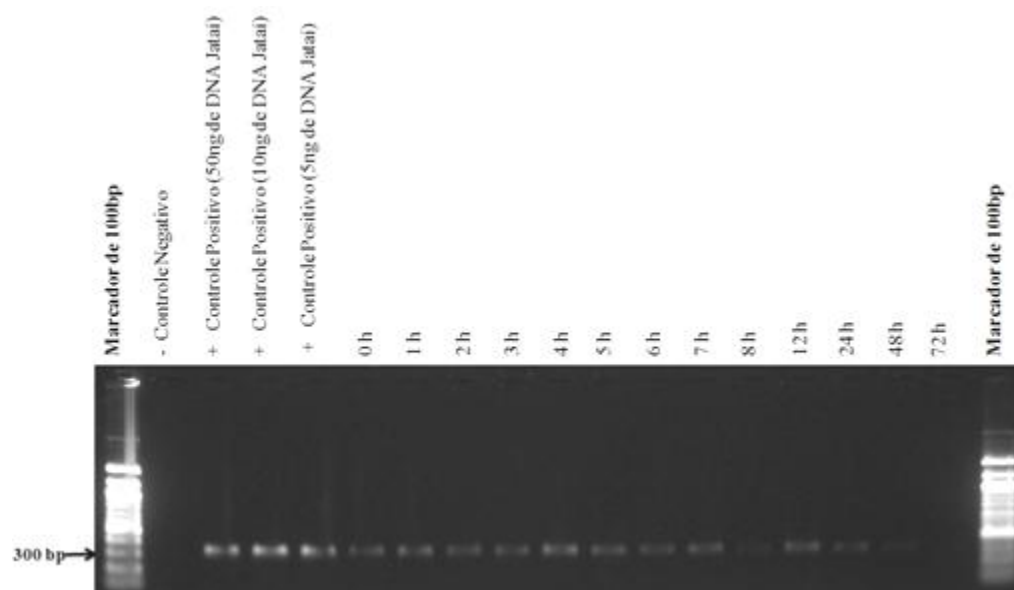


Figura 2.10 – Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes após 8 horas de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 4% de brilho e 10% de contraste)

Nas sementes inoculadas por 12 horas, foi possível observar a presença da banda de 278 bp na alíquota de todos os períodos de coletas. Da alíquota das 5 até a das 72 horas nota-se que a intensidade das bandas diminui, por causa dos inibidores que aumentam conforme aumenta o período de embebição (Figura 2.11).

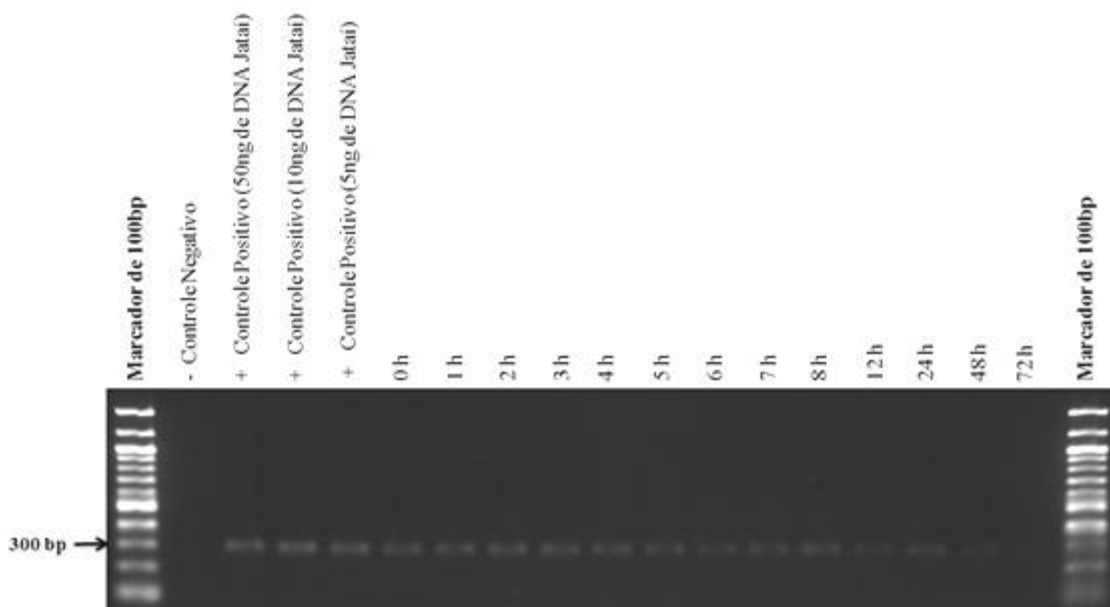


Figura 2.11 – Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR, com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes após 12 horas de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 7% de brilho e 4% de contraste)

Na amostra de sementes inoculadas por 24 horas, foi possível a detecção de *S. sclerotiorum* em todas as alíquotas coletadas, com gradual diminuição da intensidade das bandas a partir apenas da alíquota das 48 horas de embebição devido, novamente, ao maior potencial de inóculo dessa amostra em comparação com as anteriores (Figura 2.12).

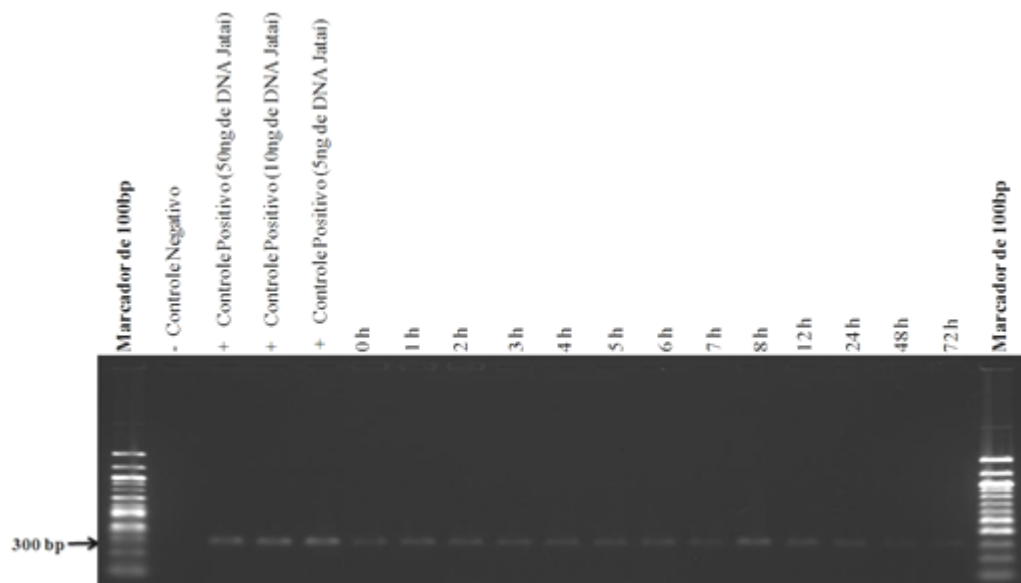


Figura 2.12 – Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR, com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 24 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 17% de brilho e 17% de contraste)

Como na amostra de sementes inoculadas por 24 horas, todas as alíquotas coletadas da amostra de sementes inoculadas por 48 horas, também amplificaram o fragmento de 278 bp., apresentando o mesmo efeito na intensidade das bandas, que foi menor apenas na alíquota das 72 horas (Figura 2.13).



Figura 2.13 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 48 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 10% de brilho e 6% de contraste)

Na amostra de sementes inoculadas por 72 horas, houve inibição na reação de PCR, nas alíquotas coletadas a partir de 48 horas, pois não se detectou a amplificação da banda do fragmento de 278 bp. A amplificação da banda da alíquota de embebição das 24 horas já se apresenta menos intensa que as anteriores a ela, indicando que um possível processo de inibição já teria se iniciado (Figura 2.14).

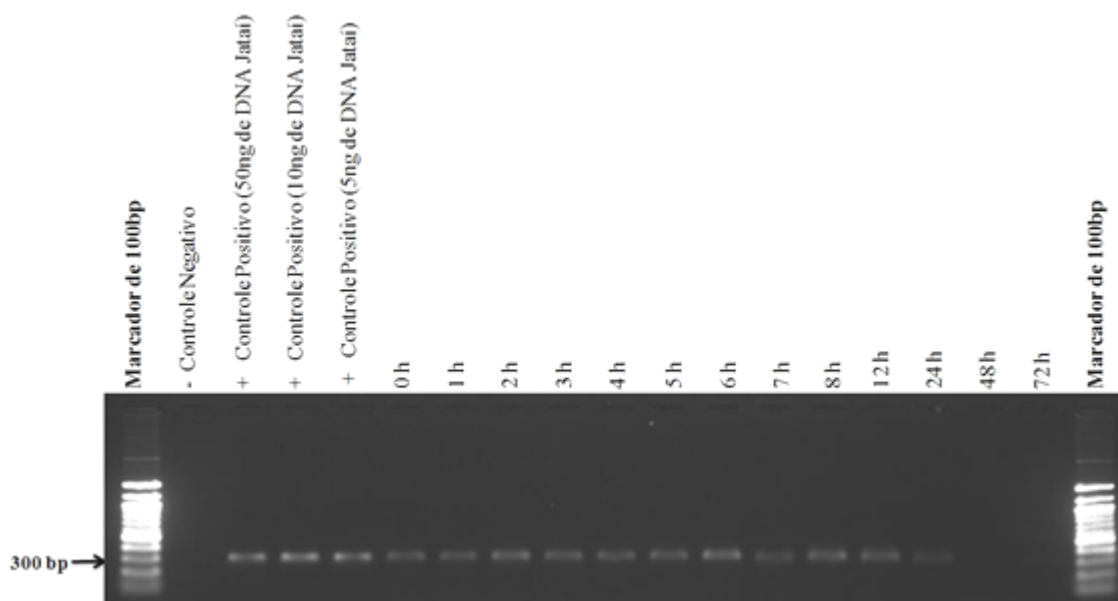


Figura 2.14 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio da PCR com o par de primers SSFWD/SSREV, e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 72 horas. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão Jataí-GO.

Rasmussen; Wulff (1991) observaram que o tempo de embebição é crucial no processo de inibição da reação de PCR, não detectando inibição da reação de PCR em alíquotas coletadas até 6 horas, e inibição completa após 16 horas de embebição. Reeves et al. (1994) e Jaccoud-Filho (1996) também reportaram os mesmos problemas de inibição da reação de PCR, causada devido a longos períodos de embebição das sementes.

Machado et al. (2001) relataram que, a inoculação de sementes por contato direto com os fungos em meio agarizado (BDA), pode permitir que essas iniciem seu processo de germinação em curto período de tempo, ou seja, quando essas sementes são colocadas em solução com a água, a liberação de exsudatos é maior, consequentemente há maior potencial inibitório nas alíquotas do líquido de embebição das sementes inoculadas por 72 horas (Figura 2.14).

O líquido de embebição das sementes de soja foi colocado em uma placa de Petri e fotografado a cada 12 horas, a partir do início da embebição, até às 72 horas, para ilustrar o aumento gradativo dos exsudatos liberados pelas sementes sadias, juntamente com uma semente como exemplar de qual era o estado das mesmas em cada um desses períodos de embebição (Figura 2.15). Pode-se notar que quanto maior o período de embebição, mais escura é a coloração do líquido devido a presença de maiores quantidades de exsudatos. A partir de 12 horas de embebição, o tegumento das sementes já encontra-se rompido, colaborando com o aumento da liberação dos exsudatos.

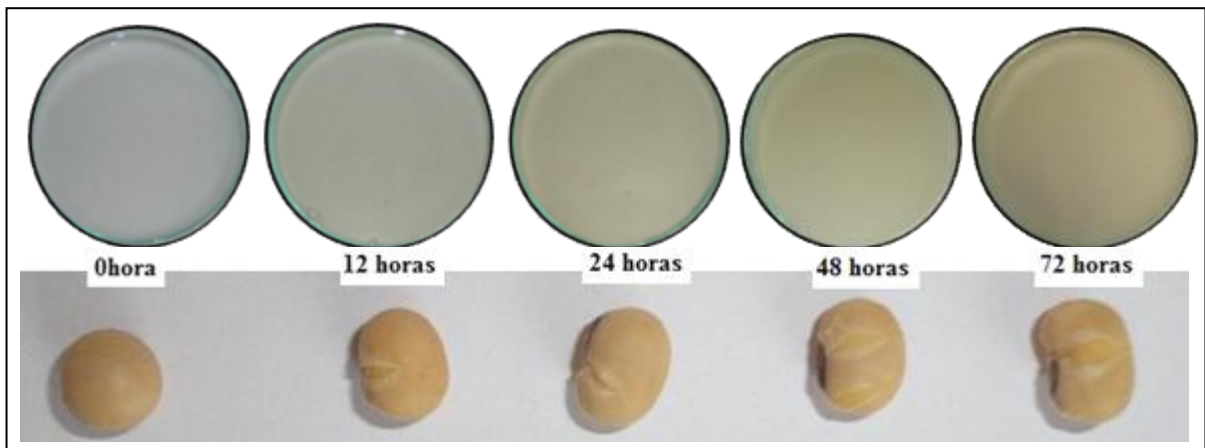


Figura 2.15 – Líquido de embebição de sementes sadias após 0, 12, 24, 48 e 72 horas de embebição e a condição da semente após esses períodos.

4.5 Sementes artificialmente inoculadas e sementes sadias

Segundo os resultados apresentados, o método de PCR com primers específicos para *S. sclerotiorum* foi capaz de detectar a presença de *S. sclerotiorum* quando 100% das sementes foram inoculadas. Para avaliar o potencial de detecção deste método, foram testadas amostras de sementes, com diferentes proporções de sementes inoculadas artificialmente, misturadas com sementes sadias.

Nas Figuras 2.16, 2.17 e 2.18, pode-se observar que foi possível a detecção do fungo em amostras com 75%, 50% e 25% das sementes inoculadas, respectivamente, desde a primeira alíquota coletada (0 hora), como observado nas amostras com 100% das sementes inoculadas.

Na amostra de sementes com 75% de contaminação há indícios da presença de inibidores da reação da PCR desde a alíquota coletada após 6 horas de embebição das sementes, e quanto mais tarde a retirada das amostras, menor é a intensidade da banda

apresentada e, depois das 24 horas, praticamente não se observou nenhuma amplificação (Figura 2.16).

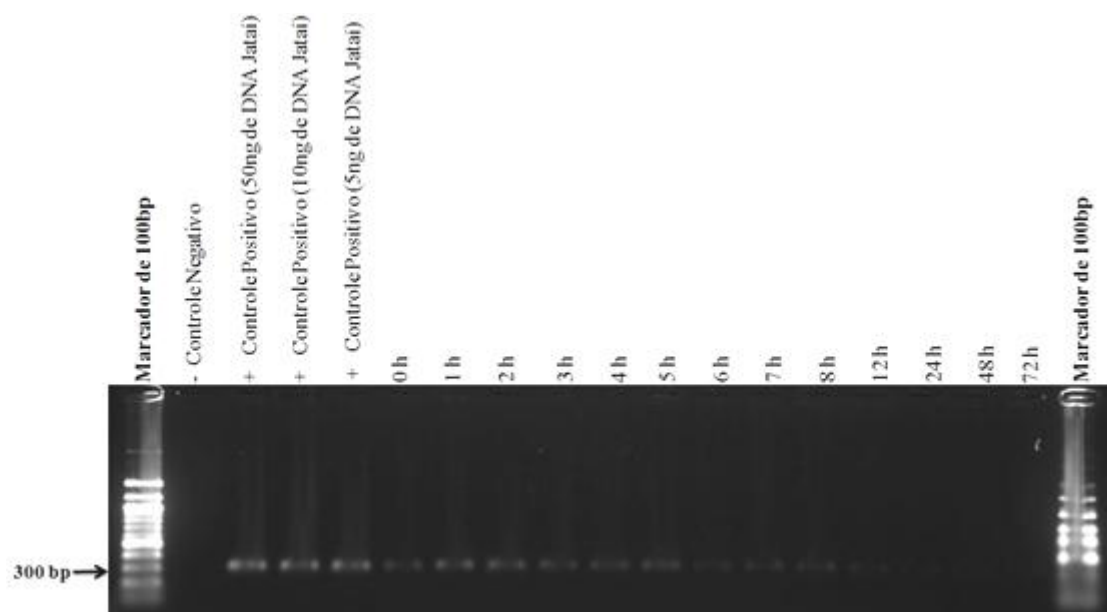


Figura 2.16 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de amostra de sementes com 75% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

A medida que a quantidade de inóculo de *S. sclerotiorum* diminui, a sua detecção torna-se mais difícil, sendo que na amostra com 50% de contaminação, nas alíquotas de 24, 48 e 72 horas de embebição, nenhuma amplificação foi observada (Figura 2.17).



Figura 2.17 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de amostra de sementes com 50% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão.

O resultado da reação de PCR das alíquotas coletadas de amostras com 25% de sementes inoculadas pode ser observado na Figura 2.18. A banda do fragmento específico das alíquotas coletadas de 0 a 24 horas de embebição são observadas. No entanto, a alíquota de 0 hora apresentou uma banda menos intensa, provavelmente pelo fato de não ter havido tempo suficiente para a liberação de material fúngico, capaz de ser detectado na reação de PCR. Por outro lado, o fato da amplificação da banda da alíquota de 24 horas ter sido menos intensa possa ser atribuído a uma maior liberação de exsudatos pelas sementes (MCDONALD et al., 1988 apud BECKERT et al., 2000), inibindo a PCR (JACCOUD-FILHO, 1996; WILSON, 1997).



Figura 2.18 – Amplificação do fragmento de 278 bp, por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes com 25% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 20% de brilho e 11% de contraste)

Ao se utilizar uma amostra de 400 sementes com apenas 5% de inoculação, observa-se (Figura 2.19) que as bandas obtidas da amplificação do fragmento específico de 278 bp são menos intensas, para alguns horário de alíquotas. Provavelmente, isso possa ser atribuído ao potencial de inóculo nas sementes ser menor que os anteriores testados (menor porcentagem de sementes inoculadas), podendo diminuir a sensibilidade da reação devido a sua proporção, em relação aos produtos lixiviados pelas sementes ser pequena (WILSON, 1997), mas foram detectadas nas alíquotas de 0 a 12 horas de embebição, sendo mais intensas das 2 as 7 horas.

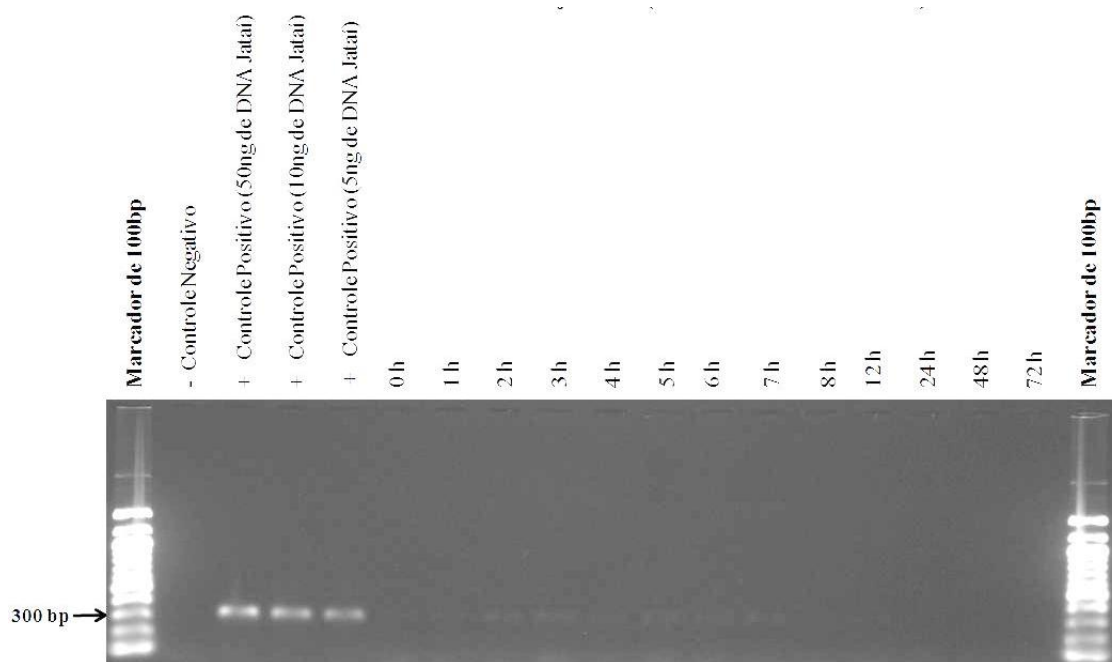


Figura 2.19 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 5% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 20% de brilho e 28% de contraste)

Com relação às alíquotas apresentadas anteriormente, nota-se que as amplificações dessas bandas são pouco intensas, podendo estar relacionadas com o período de armazenagem das alíquotas a -20°C , que foi de sete dias após a coleta, pois uma das maneiras de inibição da PCR é a captação ou degradação do DNA da amostra (WILSON, 1997; AL-SOUD; PETER RADSTROM, 2000).

Na primeira tentativa de se alíquotar as amostras do líquido de embebição das sementes que ficaram armazenadas a -20°C por período de 8 dias, não se detectou nenhuma amplificação de banda específica na reação de PCR. Já na segunda tentativa, depois de se repetir todas as etapas, desde a inoculação das sementes, para a coleta de novas amostras do líquido de embebição das sementes nos horários pré-estabelecidos, pode-se observar na Figura 2.20, que foram detectadas nas amostras com 2,5% de sementes inoculadas, as bandas do fragmento específico desde a coleta das 3 até as 12 horas mais intensas. Esses resultados comprovam a suspeita de que houve algum processo de inibição durante o período de armazenagem das amostras (8 dias), que resultou na primeira tentativa de coletas, em um falso-negativo.

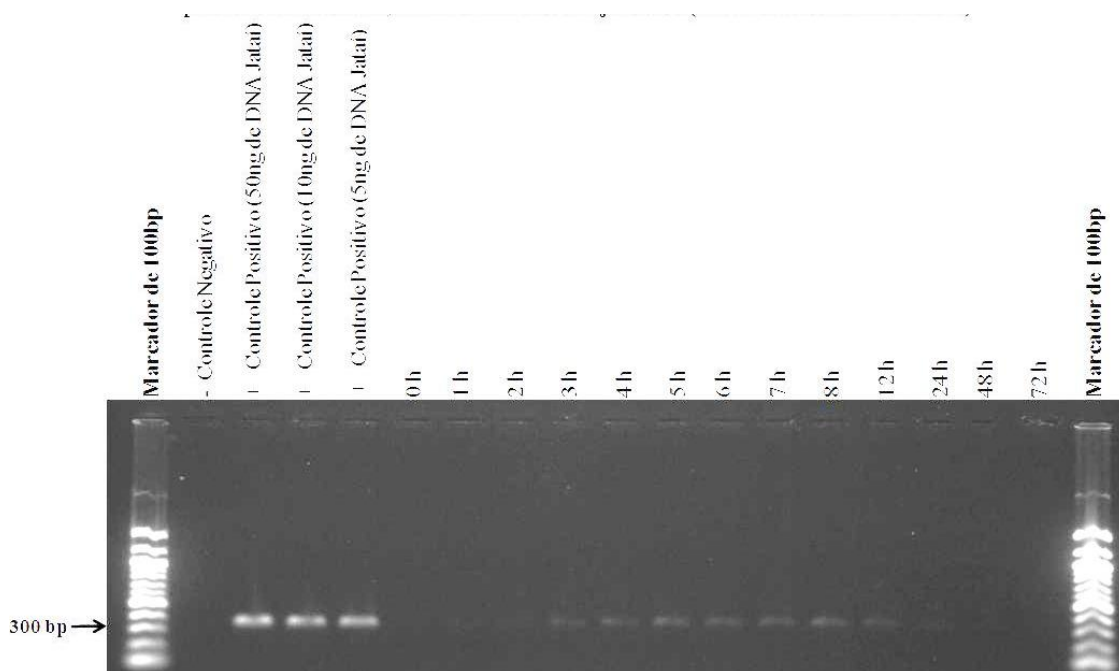


Figura 2.20 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 2,5% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: -6% de contraste)

Na Figura 2.21 é apresentado o resultado da PCR realizada com as alíquotas do líquido de embebição das sementes com 1% de sementes inoculadas. Apesar das amplificações das bandas não serem boas quanto às observadas nos controles positivos (PCR realizada com 10 ng de DNA do isolado padrão Jataí-GO), essas foram totalmente detectáveis desde a colate de 1 até a das 8 horas.

Jaccoud-Filho (1996), em estudo para o desenvolvimento de um teste de detecção de *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* em sementes de soja, encontrou efeito inibitório nas amplificação da PCR em alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes artificialmente inoculadas, sendo possível detectar 1% de sementes inoculadas artificialmente.

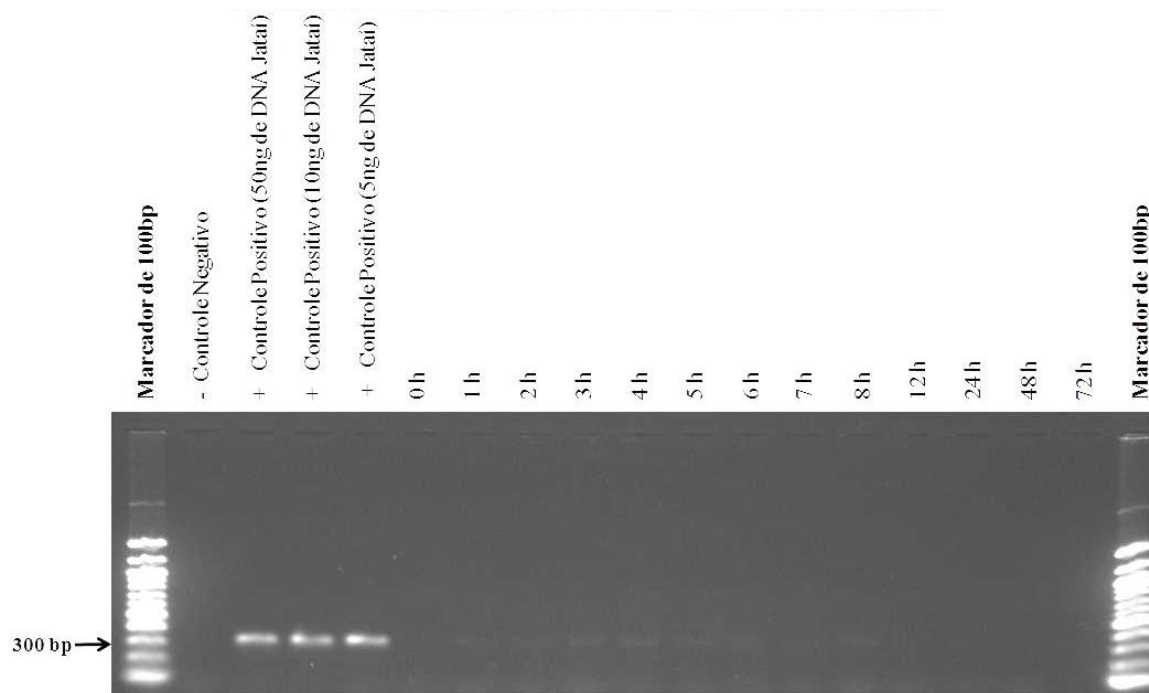


Figura 2.21 – Amplificação do fragmento específico de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes da com 1% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 25% de brilho e 24% de contraste)

Nas amostras retiradas do líquido de embebição de 400 sementes, com apenas 1 semente inoculada, ou seja 0,25%, observa-se a presença da banda do fragmento específico de 278 bp nas alíquotas das 2, 3, 4, 6 e 7 horas, mesmo que com pouca intensidade (Figura 2.22).

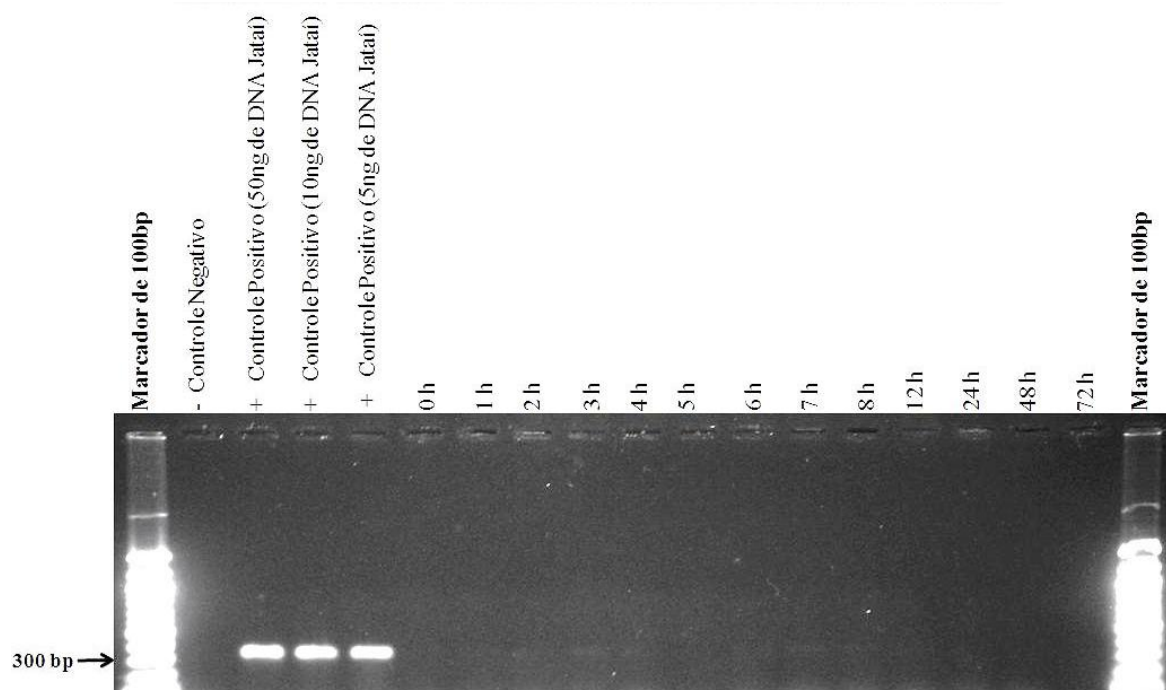


Figura 2.22 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição das sementes com 0,25% de inoculação. Controle Negativo: PCR sem DNA. Controles Positivos: PCR com 10 e 50 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: -17% de brilho e -50% de contraste)

Esse resultado demonstra a sensibilidade de detecção de *S. sclerotiorum* pelo método, em sementes de soja artificialmente infectadas, com nível de inoculação de até 0,25%. Apesar dos problemas decorrentes da presença de compostos inibidores de PCR, também relatados por diversos autores (CHOU, 1991; JACCOUD-FILHO, 1996; WILSON, 1997; AL-SOUD; RADSTROM, 1998; VAN DER SOUWEN et al., 2002).

De acordo com os resultados obtidos, o menor tempo da coleta da alíquota do líquido de embebição das sementes de soja, em que para todas as amostras testadas ocorreu a amplificação da banda do fragmento específicos de 278 bp, foi após 3 horas de embebição. No entanto, este período mínimo poderia ser menor ainda, levando-se em consideração a interferência de fatores inibitórios nas reações de PCR, que antes das 3 horas acusaram resultados falso-negativos.

Ao ser capaz de detectar 0,25% de sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*, em apenas poucas horas, com alta especificidade e repetibilidade, ou seja, todos os requerimentos para o desenvolvimento de um teste de análise sanitária (BLAKEMORE; REEVES, 2002), o presente método apresenta-se como uma ferramenta promissora para ser aprimorada e aplicada em laboratórios de rotina de análise da qualidade sanitária de sementes. Como a detecção de sementes artificialmente contaminadas não representa a realidade, o passo inicial para a otimização do método é avaliar a detecção de sementes naturalmente infectadas.

Outro problema enfrentado com as técnicas moleculares é a limitação de resultados qualitativos, isto é, indicam a presença do patógeno nos lotes de sementes, mas não indicam o nível de infecção dos lotes (JACCOUD-FILHO et al., 2002). O constante aprimoramento de técnicas moleculares tem-se mostrado promissor, com relação à quantificação de sementes infectadas por patógenos dentro de um determinado lote de sementes, técnicas como a PCR quantitativa (BATES et al., 2001), PCR em tempo real (BATES et al., 2001; KONSTANTINIVA et al., 2002; MCEWAN; MULHOLLAND, 2002) e *Scorpions Primers* (BATES; TAYLOR, 2001; JACCOUD-FILHO et al., 2002a) podem ser utilizadas.

5 CONCLUSÃO

O par de primers utilizados SSFWD e SSREV foi capaz de detectar todos os isolados de *S. sclerotiorum*, apresentando-se específico para tal fungo.

Pelo método proposto que, por meio da PCR a partir do líquido de embebição das sementes, foi possível detectar a presença do fungo, em amostras de sementes de soja artificialmente infectadas, com a presença de até uma semente contaminada em 400 sementes totais (contaminação de 0,25%).

O método é promissor, no entanto precisa ser otimizado para aplicação em laboratórios de análise de rotina.

CAPÍTULO III

COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE DETECÇÃO MOLECULAR COM OUTROS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *S.sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

Existem diversos testes recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum* nas sementes, diferindo em sensibilidade, repetibilidade, rapidez e economicidade. Os métodos tradicionalmente recomendados ("Blotter test", Rolo de Papel e Neon-S) são baseados em incubação e, conseqüentemente, são testes lentos e pouco precisos. Um método de detecção molecular pode ser uma importante ferramenta, rápida e precisa na detecção deste fungo nas sementes de soja. O objetivo do presente capítulo foi comparar o método molecular com outros métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja. Foram utilizadas amostras de sementes oriundas de plantas infectadas com nível de 5, 50 e 80% de severidade da doença, 7 amostras de sementes de área comercial e 31 amostras de lotes comerciais. Nas amostras de plantas naturalmente infectadas, pelos testes tradicionais, o fungo foi detectado nos três níveis de severidade, mas com níveis diferentes de contaminação entre os mesmos; já pelo teste molecular, apenas nas duas amostras com maior severidade o fungo foi detectado. Em amostras de áreas comerciais, as amostras apresentaram baixa ou nenhuma contaminação pelo fungo, segundo os métodos tradicionais, e através do método molecular, o fungo foi detectado em apenas uma das amostras, após a utilização de um filtro de substâncias inibidoras da reação de PCR. Nas amostras de lotes comerciais, apenas foi detectado o fungo em uma das amostras pelo teste molecular, que não foi detectado pela metodologia tradicional de incubação em Rolo de Papel, no entanto, este método tradicional detectou o fungo em 15 das 31 amostras. O teste molecular mostrou-se mais rápido que os demais, detectando o fungo em diversas amostras naturalmente contaminadas, no entanto, não apresentou um resultado quantitativo e muitos resultados falso-negativos foram observados, principalmente devido a grande dificuldade enfrentada pela presença de substâncias liberadas pelas próprias sementes que inibiram a reação de PCR, demonstrando ser um teste promissor mas que necessita de otimização. Talvez aumentar a quantidade de sementes amostradas, a utilização de filtros e/ou a utilização de outras técnicas moleculares (Nested-PCR e Real-Time-PCR) possam ajudar a superar essas dificuldades.

Palavras-chave: Mofo branco. *Glycine max*. Metodologia. Líquido de embebição. PCR. Inibição.

ABSTRACT

There are several recommended methods for the detection of *S. sclerotiorum* on seeds, differing in sensitivity, repeatability, speed and economy. The traditionally recommended methods (Blotter test, Paper Roll and Neon-S) are based on incubation, are slow and imprecise. The molecular detection method can be an important tool, fast and accurate to detection of this fungus on soybean seeds. In this chapter, the study aimed to compare the molecular method to other recommended methods to detection of *S. sclerotiorum* in soybean seeds. Seeds samples from naturally infected plants with severity disease level of 5%, 50% and 80%; seven samples from infested commercial seed field and 31 samples from commercial lots were evaluated. In samples from naturally infected plants by the traditional tests, the fungus was detected in the three levels of severity, but with different levels of contamination, whereas the molecular test only detected the fungus in the samples from plants with severity of 50% and 80%. In samples of commercial areas, low or no contamination by the fungus was verified, according to traditional methods, and through the molecular method, the fungus was detected in only one of the samples after the use of a filter for substances that inhibit PCR. In the samples of commercial lots, the fungus was detected only in one sample by molecular method, which was not detected by the traditional method of incubation in Paper Roll, however, this traditional method detected the fungus in 15 of 31 samples. The molecular test was found to be faster than the others, detecting the fungus in various naturally contaminated samples, however, did not provide a quantitative result and many false-negative results were observed, mainly due to the great difficulty faced by the presence of substances released by seeds that inhibited the PCR reaction, proving to be a promising test but needs optimization. Perhaps increasing the amount of sampled seeds, the use of filters or use of other molecular techniques (nested PCR, DNA probes and Real-Time PCR) may help overcome these difficulties.

Keywords: White mold. *Glycine max*. Methodology. Soaked. PCR. Inhibition.

1 INTRODUÇÃO

Devido à importância econômica de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, em lavouras de soja tanto no Brasil como no mundo (FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1988; GRAU, 1989; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; BOLTON et al., 2006; CARREGAL et al., 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2010), e visto que esse patógeno tem nas sementes o seu principal meio de disseminação, que pode ser tanto por micélio aderido interna e, ou, externamente quanto por escleródios misturados às sementes (NEERGAARD, 1979; SINCLAIR, 1979; KULIK; SINCLAIR, 1989; RICHARDSON, 1990; YANG et al., 1998; MACHADO et al., 1997; MACHADO, 1999; DHINGRA, 2005; GOULART, 2005; ALMEIDA et al., 2005) foi estabelecido o nível zero de tolerância para este patógeno em sementes de soja (MACHADO, et al., 1997; BRASIL, 2004).

A adoção de padrões de tolerância, além da finalidade de aprovação ou rejeição de lotes produzidos, é uma forma eficaz de impedir a introdução ou circulação de inúmeros patógenos em locais ainda isentos desses agentes (MACHADO, 1999; MACHADO; POZZA, 2005).

Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, reprodutibilidade, economicidade e rapidez para obtenção de resultados (MENTEN, 1985; SHEPPARD, 1993; PERES, 1996; NASSER, 1999; MACHADO; LANGERAK, 2002; BRASIL, 2009; HENNEBERG, 2011).

Os métodos recomendados pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, são a incubação em Papel Filtro (“Blotter Test”), em Rolo de Papel e em Meio Agar-Bromofenol (Neon).

O método “Blotter Test” consiste na incubação das sementes por 14 dias, sobre duas folhas de substrato de papel mata borrão, com água destilada em quantidade 2,5X o peso do substrato, em caixas de plástico incolor de 11x11 cm, em temperaturas entre 10 a 15 °C, sob escuro, com umedecimento adicional do substrato. Segundo este método, a detecção de *S. sclerotiorum* é baseada apenas na presença ou ausência de escleródios próximos às sementes (MACHADO; LANGERAK, 2002; BRASIL, 2009). Goulart (2005) sugere utilizar 30 dias de incubação, para a avaliação deste patógeno.

O método em Rolo de Papel consiste na distribuição de 50 sementes uniformemente alocadas sobre duas folhas de papel de germinação (44,0 x 34,0 cm) umedecidas com água destilada que, em seguida, são cobertas com uma terceira folha também umedecida com água, e, então, é feito um rolo. Os rolos são acondicionados em sacos de polietileno com pequenas perfurações no topo e são colocados em câmara de incubação com atmosfera próxima a saturação, no escuro, de 15-20 °C, pelo período de 14 dias. A avaliação verifica a formação ou não do micélio tipicamente branco do fungo com formação de escleródios negros (KOCH; MENTEN, 2000; MACHADO; LANGERAK, 2002; BRASIL, 2009; PARISI et al., 2006).

Por fim, o método de incubação em meio Neon, onde as sementes são colocadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura a base de BDA com 150 mg/L de Azul de Bromofenol, 150 mg/L de sulfato de estreptomicina e 150 mg/L de penicilina G, que são incorporados quando o BDA encontra-se a 50 °C (fundido) após autoclavagem. O pH final deve ser ajustado para 4,7 com HCl ou NaOH. As placas devem ser expostas à luz por 12 horas, a 20 °C por 5-8 dias. O exame das sementes é feito a partir do terceiro dia de incubação, onde se observa a formação de halos amarelados ao redor das sementes e a visualização de micélio superficial sobre o meio na zona do halo, partindo das sementes, confirma a presença do fungo (NASSER et al., 1999; BRASIL, 2009).

Nesse último método, a formação do halo amarelado ocorre devido ao ácido oxálico liberado pelo fungo *S. sclerotiorum* durante seu crescimento (ALEXOPOULOS et al., 1996; NASSER, 1999; AGRIOS, 2009), que diminui o pH do meio que contém Azul de Bromofenol, que indica esta acidificação do meio.

Napoleão et al. (2006) propuseram uma modificação no meio Neon, onde, em um litro de BDA, adiciona-se, antes da autoclavagem, 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol e 50 mg de ácido livre 2,4-D, de modo que o antibiótico utilizado é de amplo espectro, a forma do ácido 2,4D suporta autolavagem e não precisa de ajuste de pH, novo meio então denominado de Neon-S.

Pode-se observar que os métodos descritos acima, são todos baseados na incubação das sementes em condições controladas, para estimular o desenvolvimento do patógeno nas sementes, processo que leva no mínimo 5 dias (MCGEE, 2002; BLAKEMORE & REEVES, 2002; JACCOUD-FILHO, et al., 2002; NAPOLEÃO et al., 2006; BRASIL, 2009) podendo chegar até 30 dias (GOULART, 2005). Além disto, podem gerar resultados subjetivos, por

avaliarem características morfológicas do patógeno (BLEKEMORE; REEVES, 2002; CARVALHO VIEIRA; MACHADO).

Outra desvantagem que pode-se citar destes três métodos é o desenvolvimento de alguns fungos fitopatogênicos e saprófitas que tem crescimento mais rápido que o fungo *S. sclerotiorum*, dificultando a análise (MCGEE, 2002; BRASIL, 2009), podendo gerar um resultado falso negativo, ou seja, não se detectando a presença de *S. sclerotiorum* numa análise de rotina em lotes que estariam contaminados, resultando na aprovação do mesmo que poderá ser fonte de inóculo primário do fungo (NEERGAARD, 1979; SINCLAIR, 1979; FERREIRA et al., 1979; GRAU, 1988; GRAU, 1989; KULIK; SINCLAIR, 1989; RICHARDSON, 1990; YANG et al., 1998; MACHADO et al., 1997; MACHADO, 1999; GRAU; HARTMAN, 1999; JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; DHINGRA, 2005; GOULART, 2005; ALMEIDA et al., 2005; BOLTON et al., 2006; CARREGAL et al., 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2010).

Por outro lado, no método Neon, há outros microrganismos que liberam substâncias ácidas, que também podem originar halos amarelados, produzindo um resultado de falso positivo (BRASIL, 2009).

Técnicas moleculares podem ajudar a superar os problemas apresentados pelos métodos tradicionais de detecção de patógenos em sementes, apresentando vantagens como a economicidade (elimina etapas de incubação), a rapidez, especificidade (primers e sondas específicas podem ser desenvolvidas), sensibilidade (pequenas quantidades de inóculo podem ser detectadas) e a versatilidade (BLAKEMORE; REEVES, 2002; JACCOUD-FILHO et al., 2002; TAYLOR et al., 2006; JACCOUD-FILHO; DABUL, 2011).

Há diversos exemplos de estudos com resultados promissores para o desenvolvimento de testes de detecção de patógenos em sementes, baseados em técnicas moleculares, principalmente através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (BLAKEMORE et al., 1994; JACCOUD-FILHO, 1996; THOMAS; TAYLOR, 1999; JACCOUD-FILHO et al., 2002; TAYLOR et al., 2006; LANDA et al., 2007; CHILVERS et al., 2007; KULIK, 2008; GRABICOSKI et al., 2011). Alguns desses métodos são até recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como por exemplo, os para a detecção de *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em sementes de cenoura; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (BRASIL, 2009).

2 OBJETIVO

Comparar o método de detecção molecular, proposto no capítulo anterior, com as demais metodologias recomendadas para a detecção de *S. sclerotiorum*, em sementes de soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de sementes

3.1.1 Sementes aparentemente sadias, mas oriundas de plantas infectadas:

Uma área de produção de soja, infestada com *S. sclerotiorum*, foi monitorada durante a safra 2010/2011, no município de Pinhão-PR (PI). Cerca de mil plantas de soja foram marcadas, segundo seus níveis de severidade de Mofo branco, sendo eles: menor que 10% de severidade (10%); 50% de severidade (50%) e maior que 80% de severidade (80%) (JULIATTI; JULIATTI, 2010), no estágio fenológico R5.5/R6 (final da granação/granação plena) (FEHR; CAVINESS, 1977). Estes níveis de severidade foram escolhidos por serem contrastantes entre si. Posteriormente, quando em ponto de colheita, as plantas marcadas foram colhidas e trilhadas manualmente e individualmente, com luvas. Para cada nível de severidade, amostras de aproximadamente 500 g foram guardadas em sacos de papel Kraft a 20 °C, até serem analisadas.

3.1.2 Sementes de soja de áreas comerciais de produção de sementes

Foram utilizadas sete amostras de sementes de soja, provenientes de áreas com histórico da incidência de *S. sclerotiorum*, segundo informações dos responsáveis técnicos das áreas, coletadas no momento da colheita, sendo elas:

a) safra 2008/2009: A - CD 231 RR, proveniente da Região de Ponta Grossa; B - CD 219, da Região de Teixeira Soares; C - BRS 255 RR, proveniente da Região de Ponta Grossa; e D – CD 206, da região de Carambeí;

b) safra 2009/2010: E – Don Mario 5.8i, da Região de Ventania; F – BRS 255 da Região de Ipiranga; G – Spring, da Região de Ventania.

3.1.3 Sementes de soja de lotes comerciais

Foram utilizadas 31 amostras de sementes de soja de lotes comerciais, que foram doadas por cooperativas e empresas de sementes do Paraná, produzidas durante as safras 2009/10 e 2010/11. Os lotes são de diversas cidades produtoras do Paraná, de diferentes cultivares, sendo que quatro deles, não passaram pelo processo de beneficiamento.

Os lotes foram armazenados a 20 °C até serem utilizados.

3.2 Testes de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja

3.2.1 Métodos tradicionais recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum*

As amostras de sementes coletadas direto de plantas naturalmente infectadas por *S. sclerotiorum* com diferentes níveis de severidade (Item 3.1.1) foram submetidas às três metodologias recomendadas para o patógeno (“Blotter Test”; Rolo do Papel e Neon-S) (MACHADO; LANGERAK 2002; BRASIL, 2009).

As amostras de áreas comerciais (Item 3.1.2) foram testadas pelas três metodologias recomendadas pela RAS e duas variações do “Blotter Test” tradicional (20 °C), com alteração na temperatura de incubação (7 °C e 14 °C), com quatro repetições para cada teste.

As amostras de Lotes comerciais (Item 3.1.3) foram submetidas apenas ao método do Rolo de Papel (MACHADO; LANGERAK 2002; BRASIL, 2009), pois, segundo os resultados que serão apresentados, foi, entre os três métodos recomendados, o que detectou maiores níveis de contaminação nas amostras..

3.2.2 Método de detecção molecular de *S. sclerotiorum* em sementes de soja

3.2.2.1 Coleta das amostras

Para o teste de detecção molecular de *S. sclerotiorum*, 400 sementes de cada uma das amostras descritas anteriormente foram utilizadas, sendo colocadas em sacos plásticos hermeticamente fechados e embebidas em água ultra-pura esterilizada na proporção de 100 sementes/100 mL de água, e incubadas a 4 °C $\pm$ 0,5 °C.

Do líquido de embebição das sementes, após agitar levemente os pacotes por 10 segundos, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas com o auxílio de uma micropipeta, após os seguintes períodos de incubação:

a) Amostras de sementes oriundas de plantas infectadas (Item 3.1.1): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72 horas respectivamente;

b) Amostras de área comercial (Item 3.1.2) e de lotes comerciais (Item 3.1.3): 3 e 6 horas (períodos determinados segundo resultados obtidos pela metodologia com sementes artificialmente e naturalmente infectadas, respectivamente);

As alíquotas foram armazenadas a -20 °C até serem utilizadas, nas reações de PCR, logo após a coleta da última amostra (72 horas após o início da embebição para as amostras de plantas infectadas e 6 horas para as demais amostras).

Algumas amostras, que apresentaram resultados negativos, foram passadas em filtros (OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit – ZYMO RESEARCH®) que continham componentes necessários para a remoção de inibidores enzimáticos da PCR, como, por exemplo, compostos polifenólicos, taninos e melanina, segundo as recomendações do fabricante (ZYMO RESEARCH®), para testar a viabilidade de tal ferramenta, para superar problemas de inibições da PCR.

3.2.2.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR (Polymerase chain reaction)

Um par de primers específico foi utilizado nas reações de amplificação de PCR, sendo ele: SSFWD (5' - GCT GCT CTT CGG GGC CTT GTA TCG - 3') e SSREV (5' - TGA CAT GGA CTC AAT ACC AAG CTG - 3') (FREEMAN et al., 2002).

Cada reação de PCR continha 25 µL de 2X Master Mix PCR (1.5U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0,2 mM dNTP, estabilizadores) (SIGMA®), 20 µL de água ultra-pura (SIGMA®), 0,2 µM de cada primer e 3 µL de amostra do líquido de embebição das sementes. Como controle negativo utilizou-se uma reação idêntica à citada, no entanto sem amostra, ou seja, apenas o Mix de PCR, água ultra-pura e os primers; e como controle positivo utilizou-se o 10 ng de DNA do isolado padrão I-45 Jataí-GO (GARCIA, 2008)

As condições dos ciclos da PCR foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos; seguindo-se de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por um minuto; seguido por um ciclo final de extensão de DNA a 72 °C por 10 minutos, finalizando com a manutenção das amostras a 4 °C. Os produtos das reações de PCR foram corados utilizando GelRed (BIOTIUM[®]) e analisados em gel de agarose a 1%.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Sementes oriundas de plantas infectadas

Na Tabela 3.1 são apresentados os resultados obtidos através dos métodos tradicionais recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum* nas sementes “Blotter Test”, incubação em Rolo de Papel e incubação em meio Neon (NAPOLEÃO, et al., 2006; BRASIL, 2009), com as amostras de sementes soja coletadas de plantas naturalmente infectadas com o patógeno, em diferentes níveis de severidades e a detecção molecular (+) ou não (-) do fragmento específico de 278 bp para *S. sclerotiorum* através do método de detecção molecular.

Tabela 3.1 – Resultado da incidência de *S. sclerotiorum* nas amostras de sementes de soja coletadas de plantas naturalmente infectadas com o patógeno, em diferentes níveis de severidade

Amostra	Sementes contaminadas, nas 400 sementes analisadas			Teste Molecular													
				Tempo de coleta das alíquota após a embebição (horas)													
	“Blotter Test”	Rolo de Papel	Neon-S	0	1	2	3	4	5	6	7	8	12	24	48	72	
PI – 5%	0	10	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PI – 50%	0	1	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
PI – 80%	45	112	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 3.1, é possível observar que todas as amostras tinham a presença de *S. sclerotiorum*, segundo essas metodologias tradicionais, no entanto o resultado variou em função da sensibilidade de cada método e do nível de contaminação de cada amostra. O método em Rolo de Papel conseguiu detectar o fungo nas três amostras, e no caso da amostra PI-80% detectou uma quantidade maior de sementes contaminadas que os outros dois métodos.

Na amostra PI-5% foram detectadas apenas 10 sementes contaminadas através do método de Rolo de Papel, e nenhuma segundo os demais testes, inclusive o método molecular em todos os tempos de coleta das alíquotas testados (Figura 3.1).

Visto que a amostra apresentou certo nível de contaminação, esperava-se que o método molecular detectasse esse fato. No entanto, a reação de PCR pode ser inibida por diversas substâncias, inclusive compostos liberados pelas próprias sementes de soja através da embebição (BLAKEMORE; REEVES, 1993; BLAKEMORE et al., 1994; AUDY et al., 1996; JACCOUD-FILHO, 1996). Tentando superar esta dificuldade, filtraram-se algumas alíquotas (3 e 6 horas) antes da reação de PCR, no entanto também não foi possível a detecção do patógeno nesta amostra de sementes pelo método molecular. Há vários fatores que influenciam o nível de detecção, como, por exemplo, possuir na amostra colocada na reação de PCR, um número mínimo de células que contenham a sequência alvo, pois poucas células alvo, somadas com várias substâncias inibitórias liberadas pelas próprias sementes, podem resultar em um falso-negativo, devido à diminuição da sensibilidade da reação (CHOU, 1991; WILSON, 1997; AL-SOUD; RADSTROM, 1998; AL-SOUD; RADSTROM, 2000).

Jaccoud-Filho (1996) relatou resultados falsos negativos similares, e por meio da técnica de Nested-PCR, que consiste na reamplificação das amostras, utilizando um par de primers internos à região de interesse, foi possível a detecção do fungo pretendido em amostras de sementes de soja, que apenas com a amplificação normal não foi detectada, demonstrando que a pequena quantidade de DNA interferiu na detecção. Talvez o aumento na quantidade de sementes amostradas fosse outra alternativa para superar o problema da pequena quantidade de DNA.

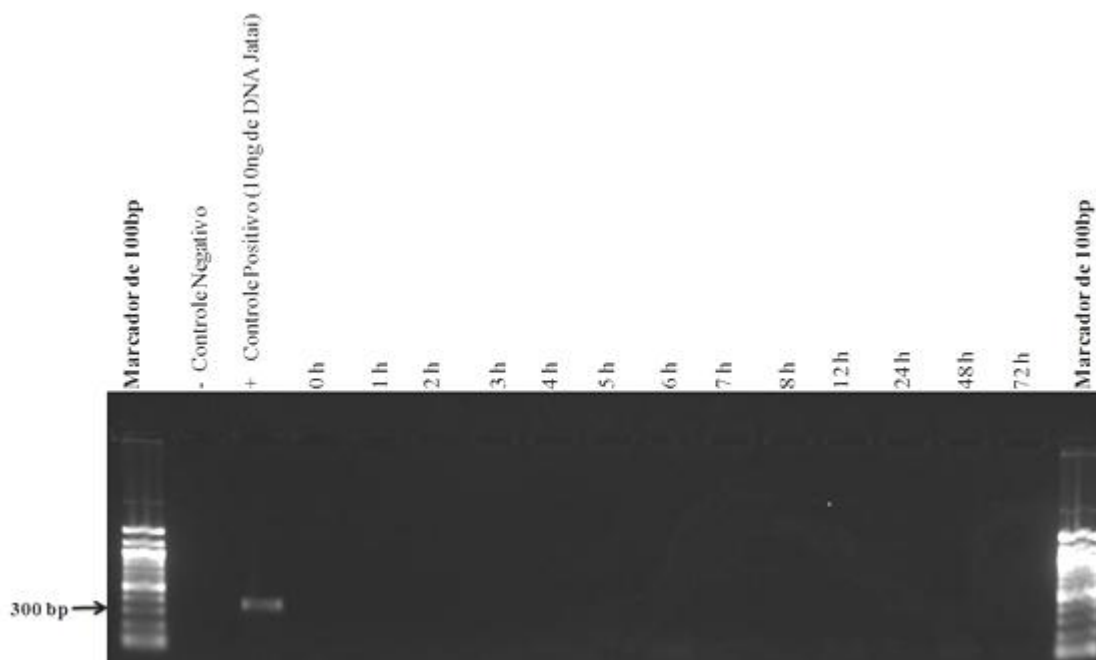


Figura 3.1 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 5%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

Já na amostra PI-50%, o método de incubação em Rolo de Papel e em Neon-S detectaram, respectivamente, 1 (0,25%) e 3 (0,75%) sementes contaminadas por *S. sclerotiorum*, e segundo o “Blottes Test” nenhuma semente contaminada foi acusada, mas como pode-se observar na Figura 3.2, a partir das alíquotas retiradas após 1 hora de embebição das sementes em água até 12 horas de embebição, foi possível a detecção do patógeno através do método molecular proposto no capítulo anterior. Provavelmente, a alíquota anterior a 1 hora de embebição não possibilitou a detecção deste fungo possivelmente pelo tempo ter sido insuficiente para a liberação de células do patógeno no líquido. Por outro lado, as alíquotas retiradas após 12 horas de embebição, possivelmente apresentavam quantidades maiores de substâncias inibitórias da reação de PCR, liberadas pelas próprias sementes (RASMUSSEN; WULFF, 1991; BLAKEMORE; REEVES, 1993; BLAKEMORE et al., 1994; AUDY et al., 1996; JACCOUD-FILHO, 1996; VAN DER ZOUWEN et al., 2002). Nota-se, na mesma Figura 3.2, que a amplificação da banda da alíquota retirada com 6 horas de embebição foi a mais intensa detectada no gel, indicando que talvez nesse tempo de incubação, houvesse maior quantidade de células com o DNA alvo do fungo e, ou, menor interferência das substâncias inibitórias.

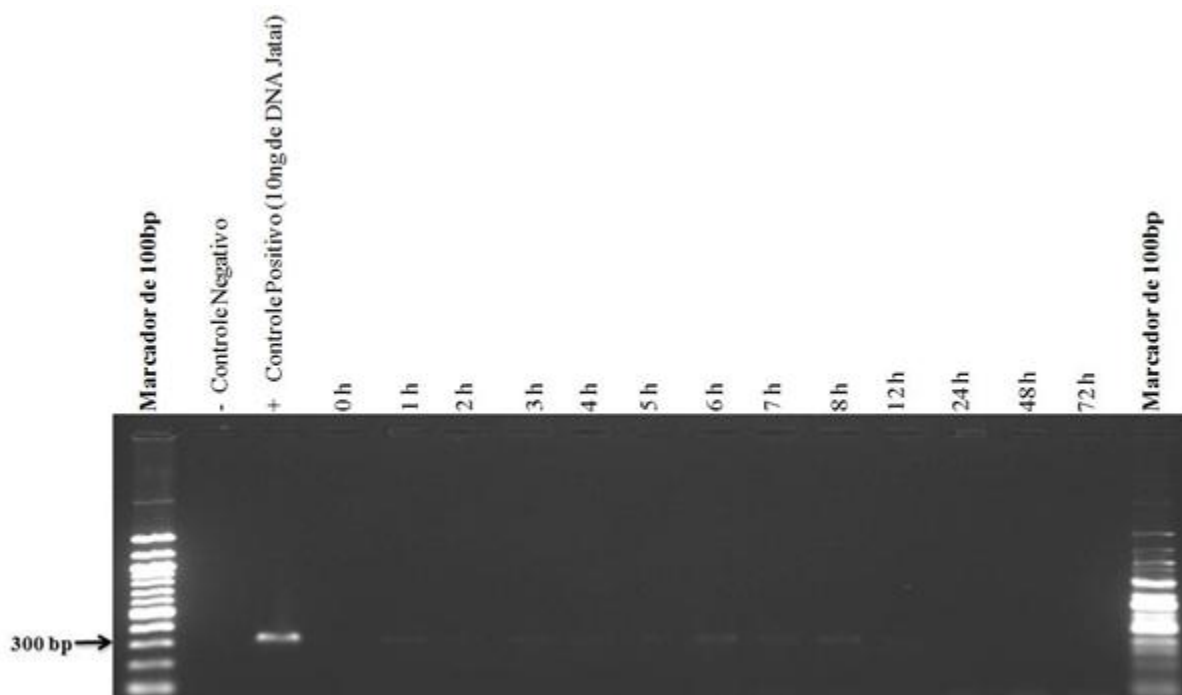


Figura 3.2 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 50%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 33% de brilho e 54% de contraste)

Já, a amostra PI-80%, como esperado, apresentou a maior quantidade de sementes contaminadas, de modo que o patógeno foi detectado pelas três metodologias tradicionais baseadas na incubação das sementes e também através do método molecular baseado na embebição das sementes. O método de incubação em Rolo de Papel apresentou a maior detecção de sementes contaminadas, totalizando 112, contra 45 do “Blotter Test” e 15 pelo Neon-S, das 400 sementes totais amostradas em cada metodologia. Nas alíquotas do líquido de embebição, foi possível detectar o patógeno a partir da primeira alíquota (0 hora de embebição), até 48 horas de embebição, sendo que após 5 horas a banda amplificada tinha a menor intensidade (Figura 3.3). Novamente, a interferência de substâncias inibitórias à reação de PCR não possibilitou a detecção do patógeno na alíquota retirada do líquido com 72 horas de embebição.

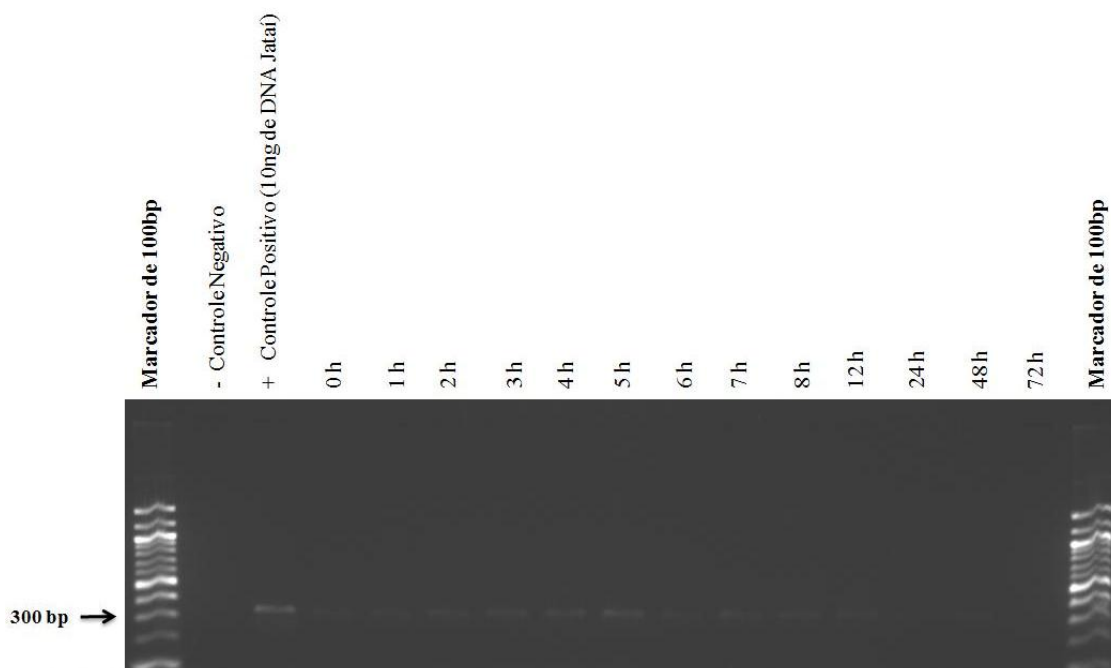


Figura 3.3 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja, de plantas naturalmente infectadas, com severidade de 80%. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão. (Imagem: 22% de brilho e 17% de contraste)

Esses resultados corroboram a eficiência do método de detecção molecular de *S. sclerotiorum* em sementes de soja naturalmente infectadas, mesmo em amostras em que os demais testes detectaram apenas 1 e 3 sementes contaminadas (Amostra PI-50%).

Para a obtenção dos resultados pelos métodos convencionais, são necessários de 5 a 15 dias para finalizar as avaliações, enquanto que o método molecular forneceu o resultado em apenas algumas horas, sendo a rapidez na obtenção de resultados, fator essencial em laboratórios de análise de rotina (MACHADO; LANGERAK, 2002; BLAKEMORE; REEVES, 2002). Havendo, também, variação quanto à sensibilidade de detecção de *S. sclerotiorum*, entre os métodos de incubação convencionais.

Pode-se destacar a precisão dos resultados obtidos através do método molecular, visto que algumas dificuldades foram encontradas nos outros métodos. No método “Blotter Test”, aos 14 dias de incubação, algumas sementes apresentavam micélio similar ao de *S. sclerotiorum*, no entanto sem a formação de escleródios (Figura 3.4), essas sementes foram consideradas sem *S. sclerotiorum*; porém, em pesquisa realizada por Purdi; Grogan (1954) com isolados de *S. sclerotiorum*, os autores observaram que alguns dos isolados avaliados necessitaram de nutrientes especiais para a formação de escleródios, fato que poderia indicar a possibilidade da obtenção de resultados falsos negativos, por este método e também pelo

método de incubação em Rolo de Papel, que igualmente são baseados na formação de escleródios.

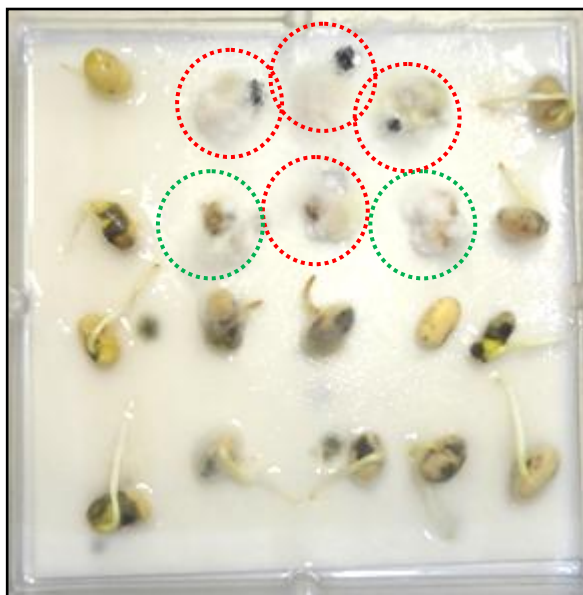


Figura 3.4 – “Blotter test” – Sementes com formação de micélio branco característico de *S. sclerotiorum* com (Tracejado vermelho) e sem (Tracejado verde) a presença de escleródios

No método de incubação em Rolo de Papel, outra dificuldade observada foi a de formação de escleródios do lado de fora do rolo (Figura 3.5), pois não se sabe de qual(is) e, ou, de quantas sementes ele se originou e, ainda, a deterioração das folhas de papel em algumas situações (Figura 3.6).

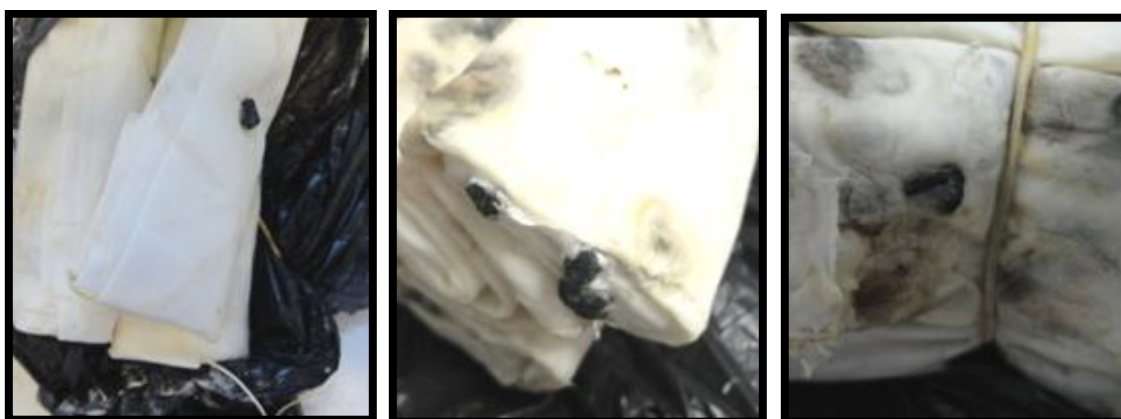


Figura 3.5 – Método de Rolo de Papel: Formação de escleródios externamente aos rolos de papel.



Figura 3.6 – Método Rolo de papel: papel com partes deterioradas e, ou, em decomposição.

No método de incubação em meio Neon-S, houve dificuldade para a quantificação das sementes contaminadas, quando as placas apresentavam mais de uma semente contaminada (Figura 3.7A) e a presença de outros patógenos que formaram halos amarelados (Figura 3.7B), sendo os mesmos problemas relatados por Henneberg (2011) e Henneberg et al. (2012). Outro ponto negativo deste teste, segundo Henning; Bergonsi (2011) é a dificuldade de instalação de tal método.

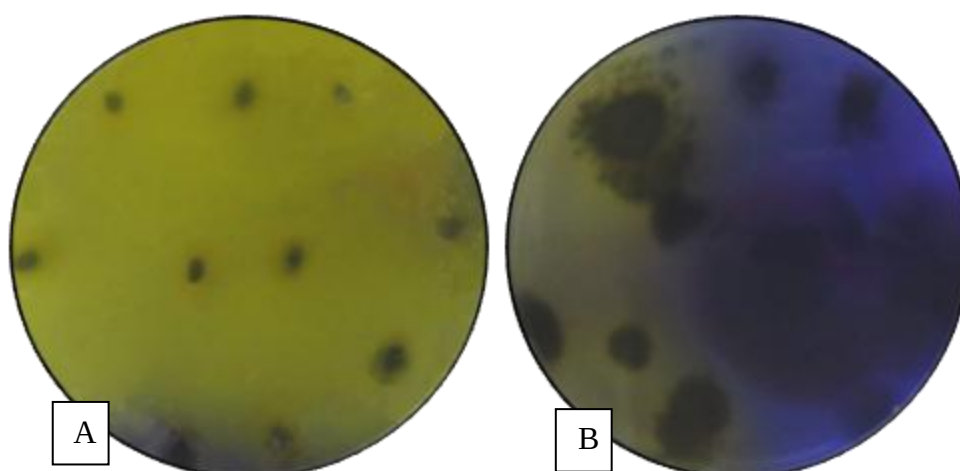


Figura 3.7 – Método Neon-S: A – Formação do halo amarelado característico sob diversas sementes; e B – Formação do halo amarelado sob sementes contaminadas por outros microrganismos.

4.2 Sementes de áreas comerciais de soja

O resultado das análises das amostras de sementes de áreas comerciais com histórico de *S. sclerotiorum* com as metodologias utilizadas encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Resultado dos testes de detecção tradicionais recomendados para *S. sclerotiorum*, com quatro repetições (R1, R2, R3, e R4) com amostras de sementes de soja retiradas de áreas comerciais.

Área	R	Métodos tradicionais					Método Molecular			
		“Blotter Test” (7°C)	“Blotter Test” (14°C)	“Blotter Test” (20°C)	Rolo de Papel	Neon-S	Sem Kit de Purificação		Com Kit de purificação	
							3h	6h	3h	6h
A Ponta Grossa	R1	0	0	0	0	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	-	-
B Teixeira Soares	R1	0	4	0	0	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	-	-
C Ponta Grossa	R1	0	0	0	0	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	1	0	0	0	-	-	-	-
D Carambeí	R1	0	0	0	1	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	+	-
E Ventania	R1	2	0	0	0	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	-	-
F Ipiranga	R1	0	0	0	0	0	-	-		
	R2	0	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	2	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G Ventania	R1	0	0	0	0	0	-	-		
	R2	6	0	0	0	0	-	-		
	R3	0	0	0	0	0	-	-		
	R4	0	0	0	0	0	-	-	-	-

Pelo resultados apresentados na Tabela 3.2, um pequeno número de sementes contaminadas com *S. sclerotiorum* foi detectado pelos métodos baseados na incubação das amostras de sementes, e pelo método molecular o fungo não foi detectado em nenhuma das duas alíquotas (3 e 6 horas) testadas sem filtro (Figuras 3.8; 3.9; 3.10; 3.12; 3.13 e 3.14), e em apenas uma das amostras filtradas (alíquota coletada após 3 horas de embebição, da área D – Carambeí-PR) foi detectado o patógeno (Figura 3.11).

Ao considerar que foram testadas 1.600 sementes de cada área comercial para cada metodologia e que não se detectou sementes contaminadas, pode-se dizer que as sementes da área A apresentavam-se isentas do fungo (Tabela 3.3). Por outro lado, as sementes da área B

apresentaram 0,25% de contaminação segundo o “Blotter Test” a 14 °C; as sementes das áreas C e D 0,06% segundo “Blotter Test” a 14 °C e Rolo de Papel respectivamente; as sementes da amostra E e F, 0,125% segundo “Blotter Test” a 7 °C e Neon-S respectivamente e as sementes da amostra G com 0,375% de contaminação de *S. sclerotiorum*.

Esses baixos níveis de incidência de *S. sclerotiorum* podem justificar a não detecção do patógeno no teste molecular, pois talvez as 1.600 sementes embebidas nas quatro repetições (R1, R2, R3 e R4) realmente não continham a presença do patógeno, ou então, como apresentado anteriormente, a quantidade de DNA alvo era pequena, principalmente quando comparada com a proporção de substâncias inibitórias da reação de PCR liberadas pelas próprias sementes de soja (CHOU, 1991; WILSON, 1997; AL-SOUD; RADSTROM, 1998). Por meio da utilização do filtro foi possível detectar o patógeno em uma amostra de área comercial que continha apenas 0,06% de incidência do fungo, segundo o método de incubação em Rolo de Papel e que não tinha sido detectado em amostras em que não foram utilizados os filtros, demonstrando a interferência dos inibidores da reação de PCR, que, nesse caso, foram superadas pelo filtro.

Por meio de todos os métodos tradicionais foi possível detectar o patógeno quando 1.600 sementes foram analisadas, ao somar as quatro repetições, sugerindo que talvez um aumento no número de sementes analisadas fosse uma maneira de detectar mais precisamente o patógeno, como já ocorre no teste de detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) que analisa 1.000 sementes, ou então, na detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) que analisa 10.000 sementes (BRASIL, 2009). Nos métodos tradicionais isto provavelmente não seria viável principalmente devido ao aumento no tempo gasto, espaço necessário e no custo, enquanto que, por meio do método molecular, esses problemas não influenciariam na viabilidade. Este aumento no número de sementes analisadas também se justifica através da importância da detecção de *S. sclerotiorum* visando a utilização de lotes isento de tal patógeno, já que uma semente contaminada, considerando a formação de um escleródio no campo, representa 2.000.000 de novos focos de infecção (STEADMAN, 1983).

Vários autores relataram também a dificuldade de se avaliar a eficiência dos testes de detecção de patógenos em sementes naturalmente contaminadas, em virtude dos níveis de contaminação apresentados pelas mesmas serem baixos (PERES, 1996; JACCOUD-FILHO, 1996; HENNEBERG, 2011).

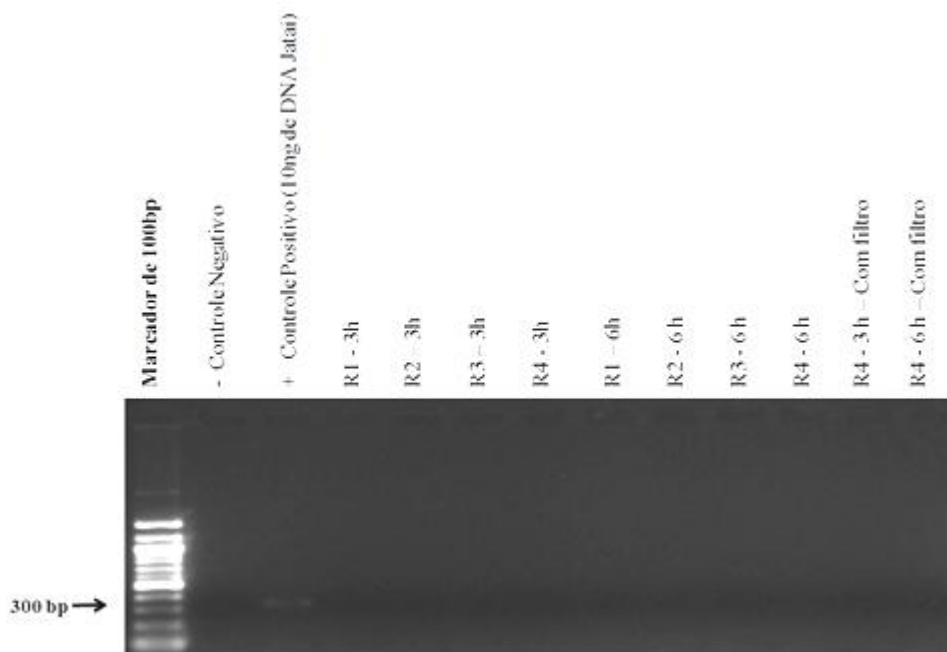


Figura 3.8 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial A (Ponta Grossa-PR) da cultivar CD 231 RR, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

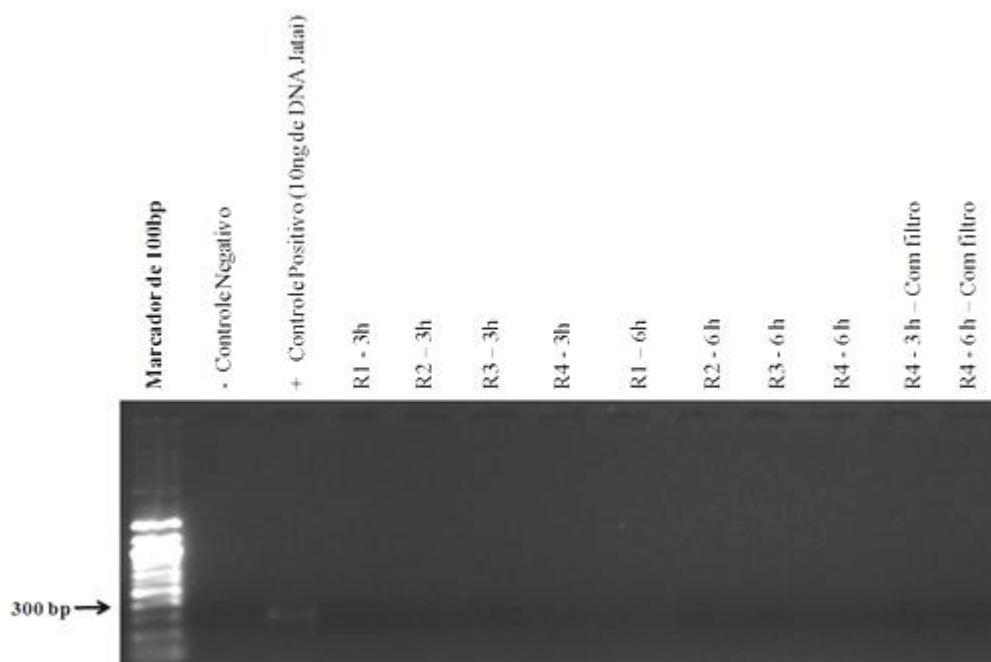


Figura 3.9 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial B (Teixeira Soares-PR) da cultivar CD 219, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.



Figura 3.10 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial C (Ponta Grossa-PR), da cultivar BRS 255 RR, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

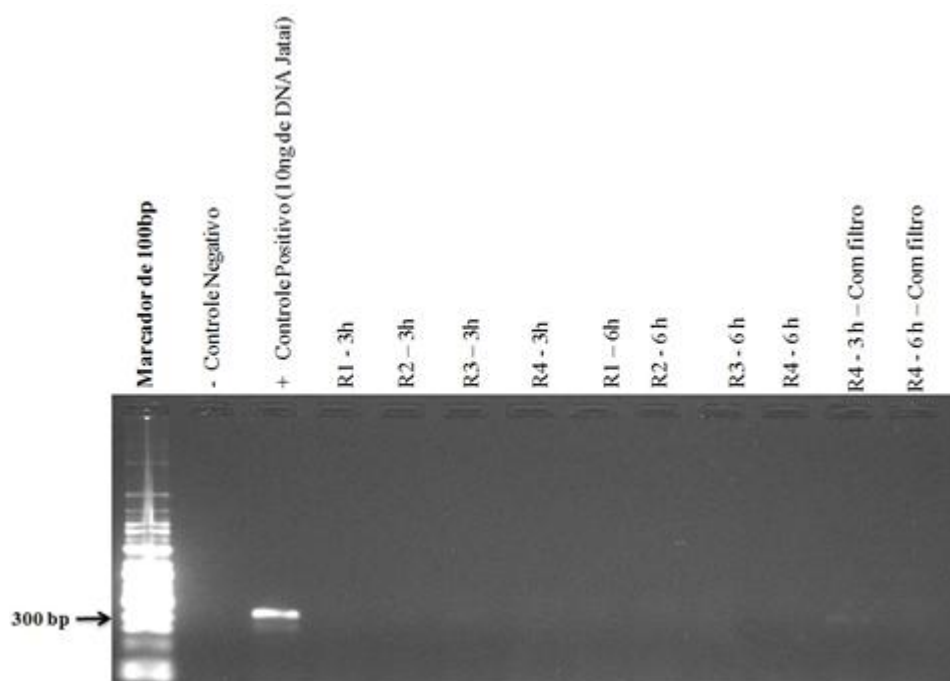


Figura 3.11 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial D (Carambeí), da cultivar CD 206, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

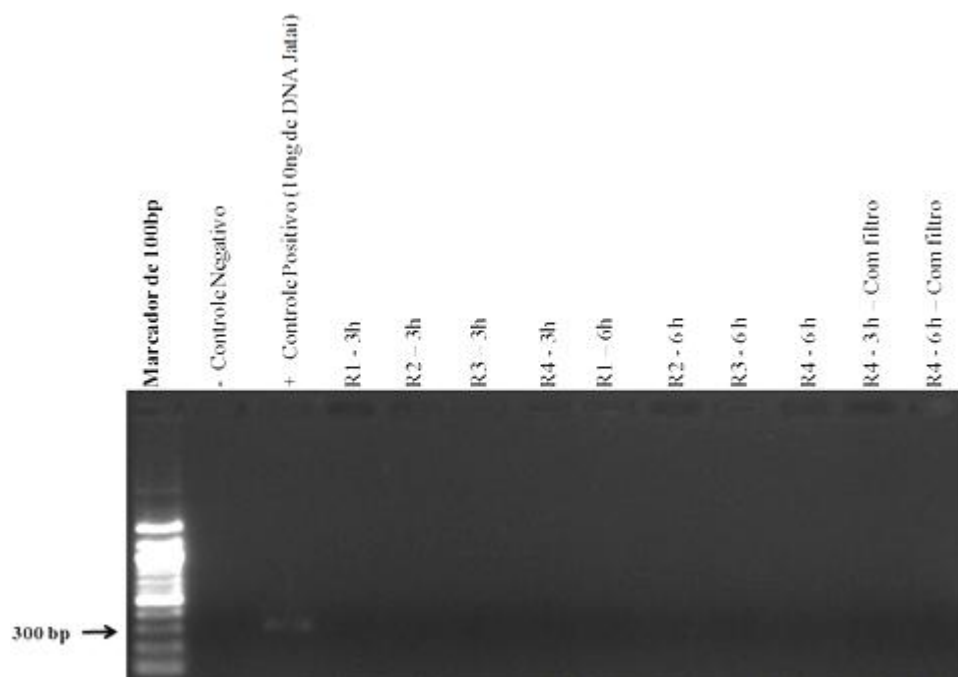


Figura 3.12 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial E (Ventania-PR), da cultivar Don Mario 5,8i, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

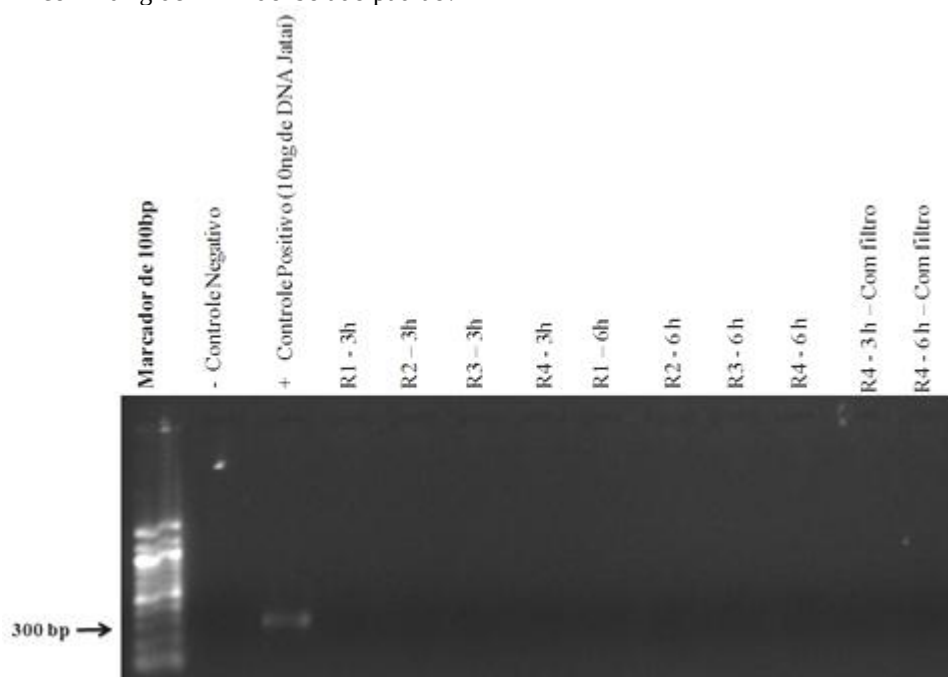


Figura 3.13 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial F (Ipiranga-PR) da cultivar BRS 255, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

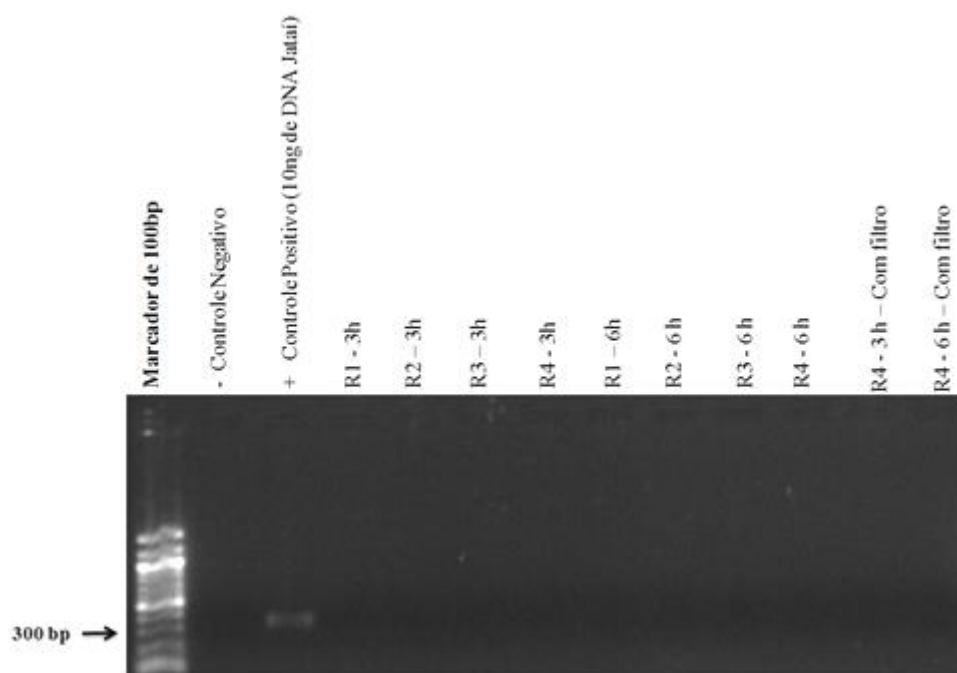


Figura 3.14 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de área comercial G (Ventania-PR) da cultivar Spring, após 3 e 6 horas de embebição, e uma das amostra filtradas antes da reação de PCR. Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

Ao analisar a Figura 3.11, é possível notar a presença da banda específica de 278 bp, apresentada pela alíquota retirada após 3 horas de embebição das sementes de soja, que foi filtrada antes de ser utilizada na reação de PCR. Esse resultado ressalta a interferência das substâncias inibidoras na reação de PCR, que apresentaram resultados falsos negativos nas alíquotas retiradas das amostras de sementes que não foram passadas pelo filtro antes da reação de PCR, e em uma das amostras, após ser filtrada antes da reação, detectou o fungo por meio da amplificação do fragmento específico. Por esse resultado, é possível afirmar que esses filtros podem ser uma ferramenta utilizada para superar os inibidores da reação de PCR, presentes nas alíquotas retiradas de sementes embebidas. Porém, em vista das outras amostras que não amplificaram fragmento algum, mesmo detectando-se a sua contaminação pelos métodos tradicionais e com a utilização do filtro, ainda há dificuldades para serem superadas.

4.3 Sementes de lotes comerciais

Na Tabela 3.3 são apresentados os resultados obtidos com as amostras de sementes de soja de lotes comerciais, submetidas ao método de incubação em Rolo de Papel, e os

resultados obtidos pelo método de detecção molecular com avaliação as 3 e as 6 horas de embebição das sementes.

Tabela 3.3 – Comparação dos resultados das amostras de lotes comerciais de sementes de soja submetidas ao teste de detecção de *S. sclerotiorum* de incubação em Rolo de Papel e método molecular com avaliação as 3 e as 6 horas de embebição.

Código	CIDADE	CULTIVAR	ANO	Método Rolo de Papel	Método molecular	
					3h	6h
1 A	Ponta Grossa	CD 235 RR	2009/10	0	-	-
2 A*	Castro	NA 5909	2010/11	9	-	-
3 A	Ponta Grossa	NK 7059	2009/10	0	-	-
4 A	Ventania	DON MARIO 5.8i	2010/11	0	-	-
5 A	Castro	NK 412113	2010/11	1	-	-
6 A	Ponta Grossa	BMX POTENCIA RR	2009/10	1	-	-
7 A	Castro	NA 5909	2010/11	6	-	-
8 A	Ventania	DON MARIO 5.8i	2010/11	0	-	-
9 A	Ventania	BMX POTENCIA	2010/11	0	-	-
10 A	Castro	NK 3363	2010/11	1	-	-
11 A*	Castro	BMX POTÊNCIA	2010/11	0	-	-
12 A	Ponta Grossa	NK 3363	2009/10	16	-	-
13 A	Ponta Grossa	BRS 246 RR	2009/10	0	-	-
14 A	Ponta Grossa	BMX TITAN RR	2009/10	19	-	-
15 A	Castro	BMX POTENCIA	2010/11	3	-	-
16 A*	Castro	NA 5909	2010/11	14	-	-
17 A	Lapa	NA 5909 RG	2009/10	0	-	-
18 A	Mangueirinha	14	2010/11	0	-	-
19 A	Mangueirinha	19	2010/11	0	-	-
20 A	Mangueirinha	9	2010/11	8	-	-
21 A	Ponta Grossa	DON MARIO	2009/10	0	-	-
22 A	Arapoti	NK 3363	2009/10	0	-	-
23 A	Castro	NA 5909	2010/11	1	-	-
24 A	Ventania	BMX ENERGIA	2009/10	0	-	-
25 A	Ponta Grossa	CD 235 RR	2009/10	0	-	-
26 A	Castro	NA 5909	2010/11	0	-	-
27 A	Ponta Grossa	CD 202	2009/10	22	-	-
28 A	Castro	BMX POTENCIA RR	2010/11	12	-	-
29 A*	Castro	BMX POTÊNCIA RR	2010/11	0	+	-
30 A	Ponta Grossa	DON MARIO 5.8i RR	2009/10	3	-	-
31 A	Arapoti	CD 206/01	2009/10	3	-	-

* Amostras não beneficiadas.

Analisando-se a Tabela 3.3, pode-se observar que as amostras de sementes de soja dos lotes comerciais utilizados, avaliadas pelo método de incubação em Rolo de Papel, 15 das amostras, apresentaram de 1 a 22 sementes contaminadas com *S. sclerotiorum*, e 16 das 31 amostras não apresentaram contaminação com o fungo. Ao analisar essas amostras pelo

método molecular para a detecção de *S. sclerotiorum*, apenas detectou-se o fungo em uma das amostras (29 A) na alíquota das 3 horas de embebição (Figuras 3.15; 3.16; 3.17 e 3.18).

Illipronti et al. (1997) relataram que a liberação de solutos pelas sementes embebidas pode aumentar em função principalmente da presença de rachadura nas mesmas, mas também por fatores como o seu tamanho, seu peso e a sua coloração; fatores que então devem ser considerados na otimização de um teste de detecção molecular baseado no líquido de embebição das sementes. Provavelmente, não houve a detecção do patógeno nessas amostras, pelo método molecular, possivelmente devido a diferença de liberação de solutos pelas sementes, visto que o teste foi aferido por meio de uma única amostra de sementes inoculadas, sendo da Cultivar CD 206 RR e com tamanho de peneira de 6,5 mm.

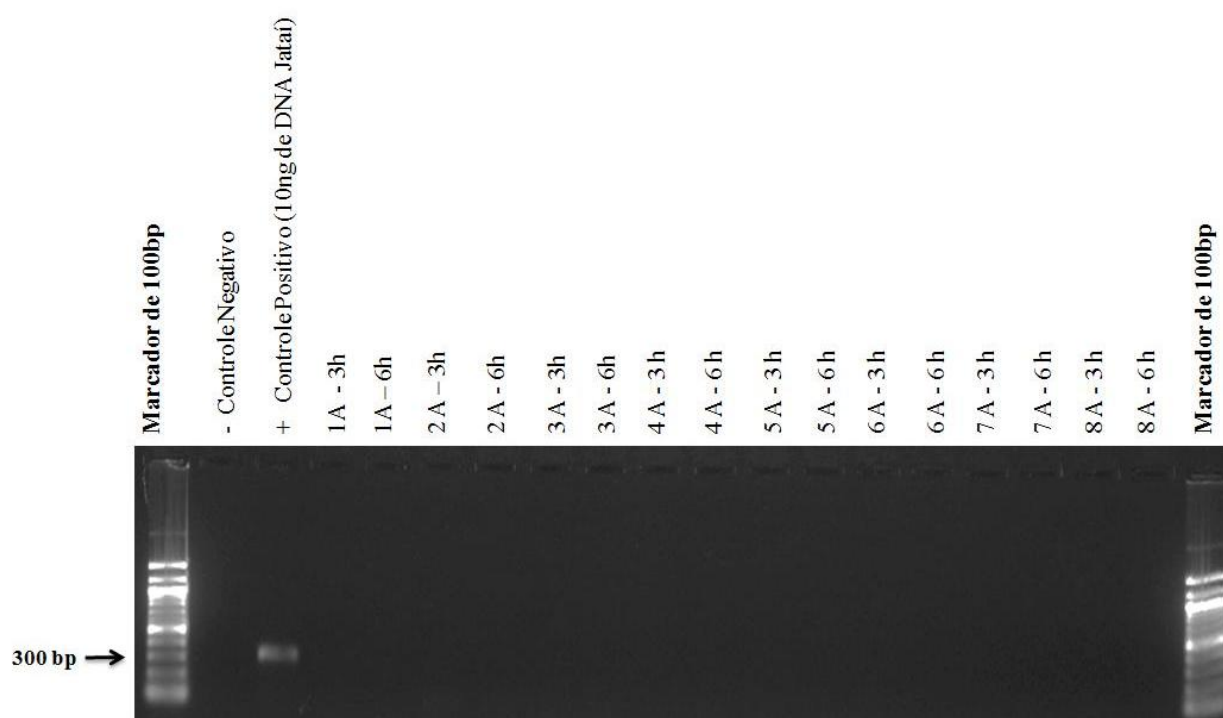


Figura 3.15 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 1: Amostras 1 a 8). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

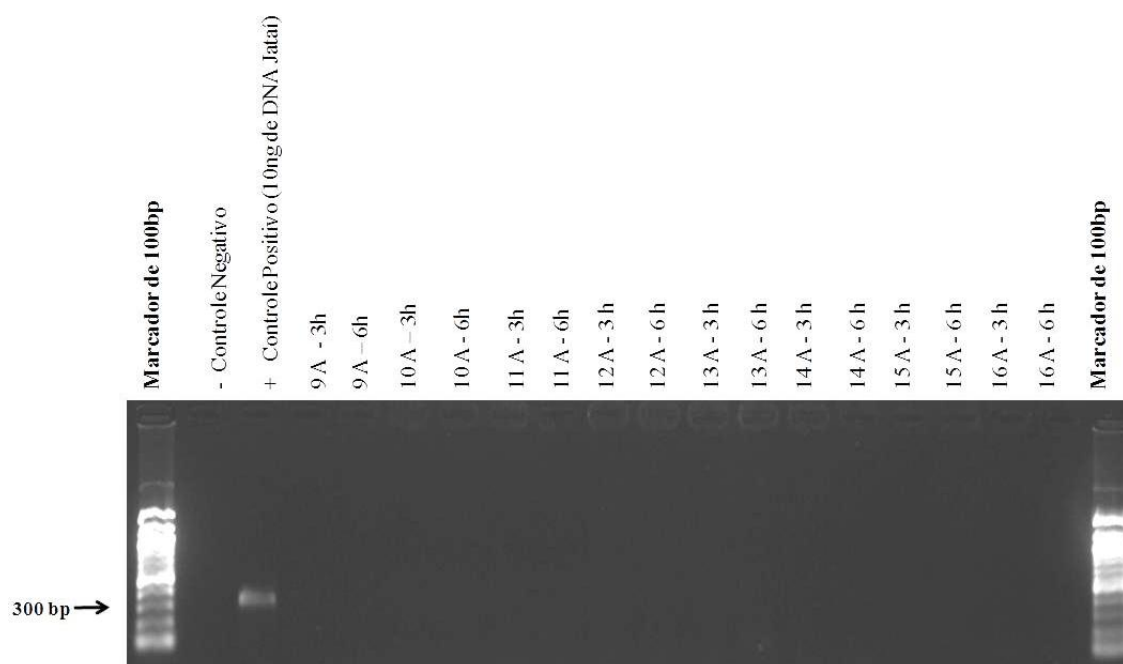


Figura 3.16 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 2: Amostras 9 a 16). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.



Figura 3.17 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 3: Amostras 17 a 24). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

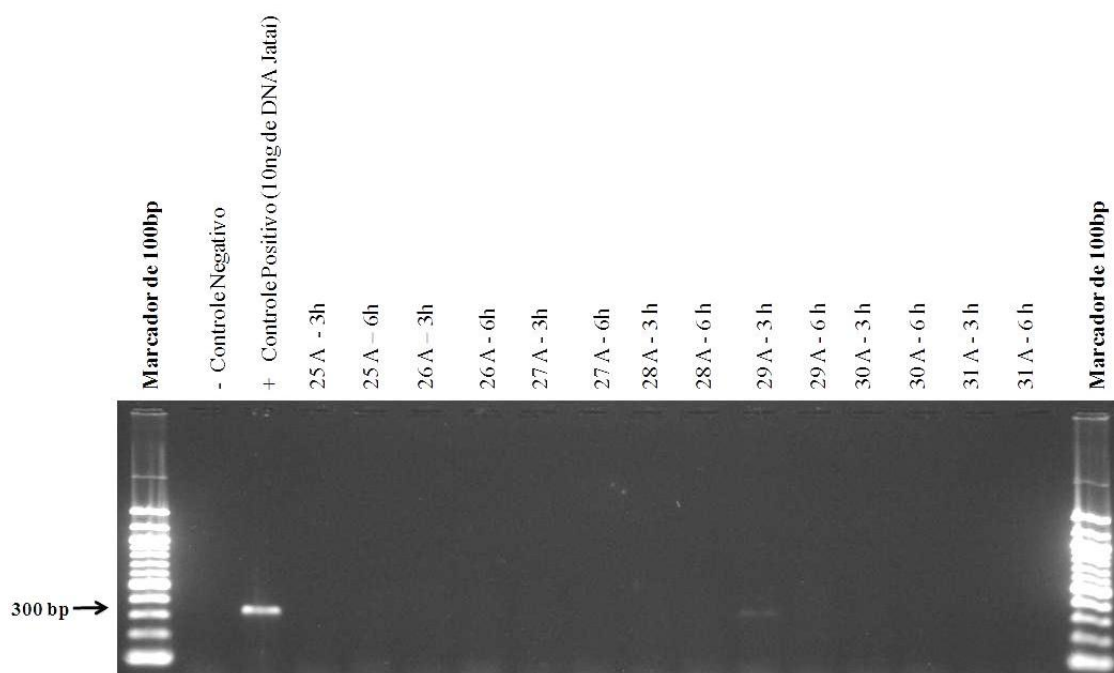


Figura 3.18 – Amplificação do fragmento de 278 bp por meio de PCR com o par de primers SSFWD/SSREV e alíquotas retiradas do líquido de embebição de sementes de soja de lotes comerciais, após 3 e 6 horas de embebição (Parte 4: Amostras 25 a 31). Controle negativo: Reação sem DNA e sem alíquota. Controle Positivo: Reação com 10 ng de DNA do isolado padrão.

Esses resultados falsos negativos obtidos pelo método molecular, onde não se detectou a presença do patógeno, em vista dos resultados positivos obtidos no teste de Rolo de Papel, possivelmente possa ter sido causado pela inibição proporcionada pelas substâncias liberadas pelas sementes de soja embebidas em água, conforme já relatado por diversos autores (RASMUSSEN; WULFF, 1991; JACCOUD-FILHO, 1996; JACCOUD-FILHO, 2002), que talvez, através da utilização de filtros possam ser superados.

Além dos falsos-negativos apresentados pelo teste de detecção molecular, o teste de incubação em Rolo de Papel também apresentou um resultado falso-negativo, demonstrando problemas de sensibilidade na detecção.

Além dos problemas discutidos em relação às substâncias que podem inibir a reação de PCR, essa técnica molecular apresenta a limitação de resultados qualitativos, isto é, indicam a presença do patógeno nos lotes de sementes, mas não indicam o nível de infecção dos lotes (JACCOUD-FILHO et al., 2002). O constante aprimoramento de técnicas moleculares tem-se mostrado promissor com relação à quantificação de sementes infectadas por patógenos em um determinado lote de sementes, como, por exemplo, a PCR quantitativa (BATES et al., 2001), PCR em tempo real (BATES et al., 2001; KONSTANTINIVA et al.,

2002; MCEWAN; MULHOLLAND, 2002) e *Scorpions Primers* (BATES; TAYLOR, 2001; JACCOUD-FILHO et al., 2002).

5 CONCLUSÃO

O método molecular detectou a presença de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja naturalmente contaminadas com 0,25% e 0,75% de contaminação, segundo os métodos de Rolo de Papel e Neon-S, respectivamente.

O método molecular detectou o patógeno em apenas uma das 31 amostras comerciais, sendo que o método de incubação em rolo de papel detectou 15 delas com contaminação.

O líquido de embebição das sementes incubadas possivelmente inibiu a reação de PCR realizada em amostras de áreas comerciais e de lotes comerciais contaminados.

Em uma amostra de área comercial, que apresentava 0,06% de contaminação segundo o método do Rolo de Papel, a utilização de filtro permitiu a detecção de *S. sclerotiorum*, que sem a sua filtragem, o patógeno não tinha sido detectado, apresentando-se como uma ferramenta para superar as substâncias inibidoras de PCR.

O período para a obtenção dos resultados pelo método molecular é menor do que o requerido pelos demais métodos, no entanto, precisa ser otimizado quanto à sensibilidade para sua utilização em laboratórios de análise de rotina.

REFERÊNCIAS

- ABDELMONEM, A. M.; RASMY, M. R. Modern techniques for detection of bacterial diseases in rice. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. 56 p. Posters. N. 63. p. 46-47.
- AGRIANUAL 2011. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2011.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed.. Elsevier Academic Press. 2004. 922p.
- AKAI, J..Studies on the epidemiology and control of *Sclerotinia* disease of beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Hokkaido Prefectural Agr. Exp. Stn. Repr.** v.36, p. 77–79, 1981.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. Canada: John Wiley; Sons, 1996. 868 p.
- ALMEIDA, A.M.R; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas** . 4.ed. São Paulo – SP. Agronômica Ceres Ltda. 2005, v.2.
- AL-SOUD, W. A.; RÅDSTROM, P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases to Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 64, n. 10, p. 3748–3753, Oct. 1998.
- AL-SOUD, W. A.; RÅDSTROM, P. Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 12, p. 4463–4470, Dec. 2000.
- AGENCIA NACIONAL DE DEFESA FITOSSANITÁRIA - ANDEF. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/home>>. Acesso em: 10/ jan/2012.
- ANNIS, S.L. AND GOODWIN, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes in plant pathogenic fungi. **Eur. J. Plant Pathol.** v.103, p.1–14, 1997.
- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based for current detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology** v.86, n.4, p.361-366, 1996.
- AUNG, M.; ROWE, E.; PRATT, R. Necessity of replicated measurements for selection of alfafa plants resistance or susceptible to stem inoculation by *Sclerotinia trifoliorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, p.14-17, 1994.
- AZEVEDO, F. R.; FREIRE, F. C. O. **Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(EMBRAPA) ; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).Documento 102, 2006.

BALL, S. F. L.; REEVES, J. C. Application of rapid techniques to seed health testing prospects and potencial. In: DUNCAN, J.M ., TORRANCE, L. (Ed.). **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**. Oxford: Blackwell Scietific Publ, 1991. p 193-207.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237 p.

BATEMAN, D.F. AND BEER, S.V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotinia rolfsii*. **Phytopathology**, v.55, p.204–211, 1965.

BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. Scorpions ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.2, n.5, p.275-280, 2001.

BATES, J. A.; TAYLOR, E. J.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. The application of real-time PCR to identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.2, n.1, p.49-57, 2001.

BECKERT, O. P.; MIGUEL, M. H.; MARCOS FILHO, J. Absorção de Água d Potencial Fisiológico em Sementes de Soja de Diferentes Tamanhos. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.671-675, out./dez. 2000.

BERENDESEN, M.; KOENRAADT, H.; VAN DER VLUGT, R. Immunocapture reverse transcriptase polymerase chain reaction (IC RT-PCR) for the detection os lettuce mosaic virus. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. Session three. p. 37.

BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D. L.. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**. v.54, n.3, p. 416–427, June 2005.

BLAKEMORE, E. J. A.; REEVERS, J. C. PCR used in the development of a new seed health test to identify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. In: **1st ISTA - PLANT DISEASE COMMITTEE: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**. Canada: ISTA, 1993. p. 19-22.

BLAKEMORE, E. J. A.; JACCOUD FILHO, D. S.; REEVES, J. C. PCR for the Detection of *Pyrenophora* Species, *Fusarium moniliforme*, *Stenocarpella maydis*, and the *Phomopsis/Diaporthe* Complex. In: SCHOTS, A., DEWEY, F. M., OLIVER, R. **Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification**. Cambridge: Cab International. Chapter 29. p. 205-213, 1994.

BLAKEMORE, E. J. A.; REEVES, J. C. Perspectives of the Use of Modern Techniques in Seed Health Testing. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association. Section I. p. 19-22, 2002.

BONDE, M. R.; TOOLEY, P. W.; SCHAAD, N. W. A PCR technique for accurate identification of teliospores of the karnal bunt pathogen, *Tilletia indica*. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International. Poster Session. p. 79, 1996.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 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**, v. 7 n.1, p. 1-16, 2006.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 3, de 5 de janeiro de 2004**.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 200p.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.32, n. 1, p. 42-50, 2006

CAFÉ FILHO, A. C. Alerta aos produtores de ervilha – podridão-de-sclerotinia. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.3, n.2, p.57, 1985

CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P.; CABRAL, D. A. C. SILVA, J. R. C.; RIBEIRO, G. C.; SILVA, R. S. Eficácia de Fungicidas para Controle do Mofo branco na Cultura da Soja na Safra 2010/2011, Montividiu - GO. In: **Resumos Expandidos [da] XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Cap. 42. p. 151-153.

CANTERI, M. G. ; ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. et al. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott – Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. **Isoflavonóides em soja (*Glycine max* (L) Merrill): variabilidade genética e ambiental de cultivares e efeito no processamento do extrato solúvel**. 123f. Tese (Doutorado). Londrina: UEL, 1996.

CARREGAL, L.H.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. **Saiba mais sobre Mofo branco**. 2005 Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/index/ebsite.asp?ID=2065>> Acesso em: 09 jan. 2011.

CARVALHO VIEIRA, M.G. G.; MACHADO, J. C. Applicability of Molecular Techniques for Detection of Seed-Borne Fungi Under Certification. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. 1. ed. Switzerland: International Seed Testing Association, 2002. 138 p. Section II. p. 82-91.

CESSNA, S.G., SEARS, V.E., DICKMAN, M.B. AND LOW, P.S. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, v.12, p.2191–2199.

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

CHAVES, G. M. **Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 1961. 79f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1961.

CHILVERS, M. I., DU TOIT, L. J., AKAMATSU, H., AND PEEVER, T. L.. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. **Plant Disease**. v.91, p.599-608. 2007.

CHOU, S. .Optimizing Polymerase Chain Reaction Technology for Clinical Diagnosis. **Clinical Chemistry**. v. 37, n. 11, 1991

COMPANHIA NACIONAL DE SAFRA BRASILEIRA – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**, Brasília : Conab, 2011. 40 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11\[1\].pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11[1].pdf)> Acesso em: 8 out. 2011

CORRADINI, H.T. **Características em cultura pura e patogenicidade de isolados de (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Lib.) de Bary, associados a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) na região do Alto Paranaíba-MG**. 1989. 59f. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1989.

CRUZ, L.; MANCEAU, C.; SOUSA-SANTOS, M.; OLIVEIRA, H. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* in tomato seeds using polymerase chain reaction. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. 84 p. Poster Session. p. 70.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p.75-112.

DIAS, D.C.F.S; MARCOS FILHO, J.. Testes De Condutividade Elétrica Para Avaliação Do Vigor De Sementes De Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 53, n. 1, Jan. 1996.

DUTTON, M.V. AND EVANS, C.S. (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Can. J. Microbiol.** v.42, p.881–895.

FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12p. (Special Report, 80).

FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da Soja no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1979. 42 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análises Genética** 3.ed Brasília-DF. EMBRAPA- CENARGEN, Documento 20. 1998, 220p.

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

GARCIA, R. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. 154f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

GODOY, G., STEADMAN, J.R., DICKMAN, M.B. AND DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v.37, p.179–191, 1990.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: EMBRAPA AGROPECUARIA OESTE, 2005.

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.. Inhibitory potential of extracts from 11 plants to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bipolaris spp* .. XLII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. **Tropical Plant Pathology**. Rio de Janeiro. 2009.

GRABICOSKI, E. M. G; JACCOUD-FILHO, D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; VRISMAN, C. M.; PIERRE, M. L. C.; SARTORI, F. F.. Estudos Preliminares De Detecção Molecular De *Sclerotinia Sclerotiorum* Em Sementes De Soja. In: **XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES**. ABRATES, Natal-RN, 2011.

GRAU, C. R. *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. In: WYLLIE, T. D.; SCOTT, D. H. **Soybean Diseases of the North Central Region**. United States of America: The American Phytopathological Society, 1988. p. 56-66.

GRAU, D. R. *Sclerotinia* Stem Rot. SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of Soybean Diseases**. 3. ed. APS Press, 1989. p. 47-48.

GRAU, C. R.; HARTMAN, G. L. *Sclerotinia* Stem Rot. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 46-48.

GUILLEMETTE, Th.; LACOMI-VASILESCU, B.; SIMONEAU, P. A PCR-ased diagnostic assay for detecting *Alternaria brassicae* in cruciferous seeds. In: **4th ISTA - PDC SEED HEALTH SYMPOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, 2002. Cap. 19. p. 28.

HANCOCK, J.C. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. **Phytopathology**, v.56, p.975–979, 1966.

HENNEBERG, L. **Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* L. Bary em sementes de soja.** (2011) Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil, 2011.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M., JACCOUD-FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes comerciais de soja. **RBS**. 2012. No prelo

HENNING, A. A.; BERGONSI, J. S. Comparação dos Métodos de Papel de Filtro e Meio de Néon na Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em Sementes de Soja. In: **Resumos Expandidos [da] XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Cap. 66. p. 226-227.

HIGHLAND, H. B.; WALGENBACH, P. Serenade MAX, a biofungicide for use against *Sclerotinia* spp. white mold diseases in vegetable and canola crops. In: **14th INTERNATIONAL SCLEROTINIA WORKSHOP**. Wilmington: [s.n.], 2009. Poster Session. p. 27.

ILLIPRONTI JR., R. A.; LANGERAK, C. J.; LOMMEN, W. J. M. **Variation in and relationships between physical and physiological seed attributes within a soybean seed lot.** In: ILLIPRONTI JR., R. A. Variation in quality of individual seeds within a seed lot of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] 1997. 157p. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University. Wagening. 1997.

JACCOUD FILHO, D. S.; REEVERS, J. C. Detection and identification of *Phomopsis* species in soya bean seeds using PCR. In: **1st ISTA - PLANT DISEASE COMMITTEE: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**. Canada: ISTA, 1993. p. 34-43.

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J. C.; YORINORI, J. T. A PCR-based test for detection of *Phomopsis phaseoli* f. sp. *Meridionalis* from soya bean seeds. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. Session three. p. 35.

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J. C.; YORINORI, J. T. Characterization of the Seed-borne Fungal Pathogen *Phomopsis phaseoli* f. sp. *Meridionalis*: the Agent of Soybean Stem Canker. In: HUTCHINS, J. D; REEVES, J. C. **SEED HEALTH TESTING: PROGRESS TOWARDS THE 21ST CENTURY**. Cambridge: Cab International, 1997. Chapter 19. p. 147-152.

JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; TAYLOR, E.; BATES, J.; LEE, D.; MORAIS, M. H. Diagnose Molecular de Fungos em Sementes. P. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 10, p 287-331, 2002a.

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; BLAKEMORE, E. J.A.; REEVES, J. C. Demonstration of the Use of Molecular Techniques for Detection of *Phomopsis* Species in Soya Bean Seeds. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. 1. ed. Switzerland: International Seed Testing Association, 2002b. Section II. p. 92-110.

JACCOUD FILHO, D. S. Potencial de Risco e Implicações Epidemiológicas de Patógenos de Sementes Introduzidos no País nos Últimos Cinco Anos. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: DFP, 2005. Cap. 14. p. 399-423.

JACCOUD FILHO, D. S.; VRISMAN, C. M.; MANOSSO NETO, M. O.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; SARTORI, F. F. Avaliação da Eficácia e do manejo de fungicidas no Controle do "Mofo branco" (*Sclerotinia sclerotiorum*) na Cultura da Soja. In: **Resumos [da] XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010a. Cap. 57. p. 189-191.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F. Efeito de Diferentes Épocas de Semeadura da Cultura de Soja e sua Relação com a Incidência do Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na Região dos Campos Gerais do Paraná. In: **Resumos [da] XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010b. Cap. 69. p. 223-225.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B.; ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do "Mofo branco" em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná. In: **Resumos [da] XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010c. Cap. 70. p. 226-228.

JACCOUD FILHO, D. S.; DABUL, A. N. G. Novos métodos de detecção de fungos em sementes florestais. In: SANTOS, A. F.; PARISI, J. J.D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo:Embrapa, 2011. Cap. 6. p. 69-86.

JACCOUD FILHO, D.S.; VRISMAN, C. M.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; CANTELE, M. A.; GRABICOSKI, E. M. G.; HENNEBERG, L. Avaliação da Eficácia de Novos Fungicidas para o Controle do Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) da Soja nos Campos Gerais. In: **Resumos Expandidos [da] XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Cap. 43. p. 154-156.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C. **Manejo Integrado de Doenças na Cultura da Soja**. 1. ed. Uberlândia: [s.n.], 2004. 327 p.

JULIATTI, F. C.; GARCIA, R. A., Mofo branco ou Podridão Branca da Haste: Um Desafio Para a Produção da Batateira (*Solanum tuberosum* L.). **Batata Show**. 21.ed, Agosto de 2008, Ano 8. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/2008/revista.asp?id_REVCAT=29&id_REVCON=664>. Acesso em: 09 mai. 2009.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F.C. **Podridão Branca da Haste da Soja: Manejo e Uso de Fungicidas em Busca da Sustentabilidade nos Sistemas de Produção**. Uberlândia: Composer, 2010. 33 p.

JULIATTI, F. C.; REZENDE, A. A.; CAIRES, A. M.; AGUIAR, P.; CARNEIRO, L. M. S. Diferentes Manejos no Controle da Podridão Branca da Haste da Soja (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: **Resumos [da] XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. Cap. 60. p. 196-197.

JUSTENSEN, D. F.; HANSEN, H. J.; PINNSCHMIDT, H. Quantification of leaf stripe, *Pyrenophora graminea*, in barley seed by real-time PCR. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. Session 6. n. 38. p. 20.

KAGAWA, A. **Standard table of food composition in Japan**. Tokyo: University of Nutrition for women, 1995. p. 104-105.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho. (Org.). **Manual de Fitopatologia volume I - Princípios e Conceitos**. 4.ed., São Paulo-SP, Ceres, v. p. 149-206. 2011.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternative para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2. p. 276-279, 2000.

KOHLI, D.K., BACHHAWAT, A.K. CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.13, p.3501–3502, 2003.

KONSTANTINOVA, P.; BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. A. The application of real-time PCR to the identification and detection of *Ustilago nuda* in barley seeds. In: **4th ISTA - PDC SEED HEALTH SYMPOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, 2002. Cap. 15. p. 24.

KULIK, M. M.; SINCLAIR, J. B. Seed Pathology. SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of Soybean Diseases**. 3. ed. APS Press, 1989. p. 72-73.

KULIK, T. Development of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* from wheat. **Journal of Plant Pathology**. v.90, n.3, p.441-447, 2008.

LANDA, B. B., MONTES-BORREGO, M., MUÑOZ-LEDESMA, F. J., AND JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Phylogenetic analysis of downy mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in planta and seed detection of *Peronospora arborescens*. **Phytopathology**, v.97, p.1380-1390, 2007.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, Comunicado Técnico 76, 2005, 3p.

LE TOURNEAU, D.. Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 887-890, 1979.

LUMSDEN, R.D. *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. **Phytopathology**, v.59, p.653–657, 1969.

LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, p.890–896, 1979.

MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; COSER, C. A.; MENDONÇA, L. A. Development of Seed Health Testing Policy in South America. In: HUTCHINS, J. D.; REEVES, J. C. **SEED HEALTH TESTING: PROGRESS TOWARDS THE 21ST CENTURY**. Cambridge: Cab International, 1997. Chapter 16. p. 119-127.

MACHADO, J. da C.. **Manejo sanitário de sementes no controle de doenças**. Textos acadêmicos. 82p. Ed. UFLA. Lavras – MG. 1999.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C.. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.95-101, 2001.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C. J. General Incubation Methods for Routine Seed Health Analysis. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association, 2002. Section II. p. 48-59.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A.. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. 1. ed. Viçosa: DFP, 2005. Cap. 11. p. 295-332.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L.. Fungos Fitopatogênicos. In: L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho. (Org.). **Manual de Fitopatologia volume I - Princípios e Conceitos**. 4.ed. Ceres, São Paulo-SP, v.1, p. 149-206. 2011.

McEWAN, M.; MULHOLLAND, V. Development of molecular diagnostic assays for seed-borne pathogens of wheat. In: **4th ISTA - PDC SEED HEALTH SYMPOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, 2002. Cap. 17. p. 26.

McGEE, D. C. Principles, Advantages and Limitations of Seed Health Testing Methods. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. 1. ed. Switzerland: International Seed Testing Association, 2002. Section I. p. 2-8.

McNEIL, M.; ROBERTS, A. M. I.; McLAREN, G.; COCKERELL, V. Improving the reliability of real-time PCR assays for *Microdochium nivale* and *Tilletia caries*. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. Session 6. n.12. p. 17-18.

MEYER, M. C.; NUNES JUNIOR, J.; PIMENTA, C. B.; SEIL, A. H.; NUNES SOBRINHO, J. B.; COSTA, N. B.; GUARNIERI, S. F. Eficiência de Fungicidas no Controle de Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em Soja, no Estado de Goiás. In: **Resumos Expandidos [da] XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Cap. 41. p. 148-150.

MEIJERINK, G. The International Seed Health Initiative In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB INTERNATIONAL, 1996. SESSION THREE. P. 40.

MELZER, M. S., IKEDA, S. S., AND BOLAND, G. J.. Interspecific transmission of double-stranded RNA and hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. **Phytopathology** v.92, p.780-784, 2002.

MENTEN, J. O. M. Diagnóstico da Patologia de Sementes de Girassol no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, n.1, p. 25-30, 1985.

MICHAELE, F. Manual de normalização bibliográfica para trabalhos científicos. 3.ed. ver. Ponta Grossa: UEPG, 141p., 2010.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. **Soja: Suas aplicações**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996, p. 258.

MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acids Research**. v. 26, n. 13, p.3309–3310, 1998.

MORRAL, R. A.A.; DUCZEK, L., J.; SHEARD, J. W. Variations and correlations within morphology, pathogenicity, and pectolytic enzyme activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.50, n10, p.767-85, Out. 1972.

MULLIS, K.; FALOONA, F.. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.55, p.335-350. 1987.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F.. **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA**. Nucleic Acids Research, Standford, v.8,n.19, p.4321-4325, 1980.

NAPOLEÃO R.; NASSER, L C B; FREITAS MA. **Importância da análise sanitária se sementes para o manejo de Esclerotinia no cerrado**. EMBRAPA-MAPA, Recomendação Tecn 49, 2001.

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C.; FERRAZ, L. C. L.; PERES, A. P.; MACHADO, J. C.; CARE FILHO, A. C. A new approach to detect *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. 84 p. Poster Session. p. 75.

NASSER, L. C. B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R. A. Mofo branco - cuidado com a semente. **Cultivar Grandes Culturas**, n.4, 1999. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=51>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

NEERGARD, P. Research in seed pathology – Basic and technological approaches. In: YORINORI, J. J.; SINCLAIR, J.B.; MEHTA, Y. R.; MOHAN, S. K. **PATHOLOGY PROBLEMS AND PROGRESS – PROCEEDINGS OF FIRST LATIN AMERICAN WORKSHOP ON SEED PATHOLOGY**. Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR. Londrina, Paraná – Brazil. 274p. 1979.

NOYES, R.D. AND HANCOCK, J.G. (1981) Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. **Physiol. Plant Pathol.** v.18, p.123–132.

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, v.32, n.3, p.288-290, 2006.

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

PINTO, N. F. J. A. Análise Sanitária na Produção de Sementes de Grandes Culturas. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: DFP, 2005. Cap. 11. p. 295-332.

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

PURDY, L. H.; GROGAN, R. L. 1954. Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. **Phytopathology**, v.44, p.36–38, 1954.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v.69, p.875–880, 1979.

RASMUSSEN, O. F.; WULFF, B. S. (1991). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* using PCR. In: DURBIN, R. D., SURICO, G.; MUGNAI, L. (eds) **PROCEEDINGS OF THE 4TH INTERNATIONAL WORKING GROUP ON PSEUDOMONAS SYRINGAE PATHOVARS**. Florence, Italy, pp. 369-376.

REZENDE, A. A.; JULIATTI, F. C.; CAIRES, A. M.; AGUIAR, P.; CARNEIRO, L. M. S. Eficiência de Diferentes Produtos Comerciais à Base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: **Resumos [da] XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. Cap. 71. p. 229-232.

RICCIONI, L.; DUVNJAK, T.; PUCCI, N.; HARTMAN, G. L. PCR-RFLP identification of the *Phomopsis/Diaporthes* species on soybean seeds. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. Session 3. n. 33. p. 12.

RICHARDSON, M. J. **An Annotated List of Seed-Borne Diseases**. 4. ed. Switzerland: The International Seed Testing Association, 1990. 173 p.

ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; LEGRAND, D.; COUTEAU, A.; HUMEAU, L.; ROUX-CUVELIER, M.; ROUMAGNAC, P. PRUVOST, O. A nested-PCR multiplex to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* in onion seeds. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. Posters. n. 77. p. 54.

SAGATA, E. **Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2010. 58f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SAHARAN, G.S., MEHTA, **Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management**. India: Springer, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, Third Edition. v.1/2. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K R F ; STANGARLIN, J. R. ; CRUZ, M e S . Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta** (UFPR), v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.61-66. 2005.

SINCLAIR, J. B. Soybean Seed Pathology. In: YORINORI, J. T.; SINCLAIR, J. B.; MEHTA, Y. R.; MOHAN, S. K. **Seed Pathology Problems and Progress**. Londrina: IAPAR, 1979. p. 161-172.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354. 1985.

SHEPPARD, J.W. Diagnostic sensitivity, specificity and predictive values in evaluation of new test. Methods. In: **PROCEEDINGS 1ST ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**. Ottawa, Canadá. p. 132-142, 1993.

SOMAR Meteorologia. **Temperaturas médias: histórico de 30 anos (1961-1990)**. Disponível em: < <http://www.somarmeteorologia.com.br/index.html> >. Acesso: 08/Dez/2011.

SOUSA SANTOS, M.; CRUZ, L.; HENRIQUE, L.; DUARTE, T. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed by polymerase chain reaction analysis. In: **2nd ISTA - PDC SYMPOSIUM: SEED HEALTH TESTING TOWARDS THE 21ST CENTURY**. CAB International, 1996. 84 p.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de doenças de plantas. **Biotecnologia Ciência; Desenvolvimento**, Brasília, v.11, p.16-21, 1999.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal. In:____. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 13. p. 343-372

TAYLOR, E.; BATES, J.; JACCOUD, D. Diagnosis of Seedborne Pathogen. In: Barsa, A.S. (Ed.). **Handbook of seed science and technology**. Binghamton: Food Product Press, 2006. p.649-675.

THOMAS, J. E.; TAYLOR, J. A. Detection of *Pyrenophora* species by PCR. Implementation of a PCR-based method in a routine test to detect *Pyrenophora* species on barley seed in the UK. In: **PROCEEDINGS OF THE 3RD INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION PLANT DISEASE COMMITTEE**. Iowa: ISTA, 1999. 160 p.

THOMAS, J. E.; LEA, V. J.; JOYCE, T. A.; BATES, J. A. Development of a PCR based approach for detection of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* in brassica seed. In: **5th ISTA - SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM**. France: ISTA, 2005. Session 6. n.50. p. 19-20.

TOWNSEND, B.B. AND WILLETTS, H.J. (1954) The development of sclerotia in certain fungi. Trans. Br. **Mycol. Soc.** v.37, p.213–221.

VAN DER ZOUWEN, P. S.; BONANTS, P. J. M.; VAN DEN BULK, R. W.; KONSTANTINOVA, P.; VAN GENT-PELZER, M. P. E. Development of a PCR-assay for *Alternaria* spp. in carrot. In: **4TH ISTA - PDC SEED HEALTH SYMPOSIUM: HEALTHY SEEDS, THE BASIS FOR SUSTAINABLE FARMING**. The Netherlands: ISTA, 2002. 61 p. Cap. 44. p. 53.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E.M.F. Development of primers and method for identification and detection of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* in soybean seeds. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. 2, p.161-169, 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: INNIS, M. A.. GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. 1. ed. California: Academic Press Inc., 1990. Chapter 38. p. 315-322.

WILLETS, H. J.; WONG, J. A. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Bot. Rev.** v.46, p.101-165 1980

WILLIAMS, B.; KABBAGE, M.; KIM, H.; BRITT, R.; DICKMAN, M. B. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. **PLoS Pathogens**, v. 7, p.1-10, 2011.

WILSON, I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 63, n. 10 p. 3741–3751, Oct. 1997.

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

YORINORI, J. T.; CHARCHAR, M. J. D.; NASSER, L. C. B.; HENNING, A. A. Doenças da Soja e seu Controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. **Cultura da Soja nos Cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 334-397.

ZAMBOLIN, L.; SOUZA, A. F.; BARBOSA, J. C. Controle integrado de doenças fúngicas da parte aérea de plantas visando à redução na transmissão por sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. 1. ed. Viçosa: DFP, 2005. Cap. 11. p. 295-332.

ZENG, W.; HAO, J. Efficacy of *Coniothyrium minitans* on controlling *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. In: **14th International Sclerotinia Workshop**. Wilmington: [s.n.], 2009. Session 13. p.12.