**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Deteccção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de
soja**

Juliana Ramiro

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

Juliana Ramiro
Engenheira Agrônoma

Deteção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Ramiro, Juliana

Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja /
Juliana Ramiro. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de
2011. -- Piracicaba, 2015.
88 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Diagnose 2. qPCR 3. Fitopatógenos 4. *Glycine max* l. Título

CDD 633.34
R173d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*À minha Mãe Idalina, meu Pai José e
meu Irmão Julio César, por me incentivarem
a lutar pelos meus sonhos e objetivos,
com todo amor,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me proporcionar paz, saúde e oportunidades para fazer minhas escolhas.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela oportunidade, orientação, paciência, amizade e confiança.

À Dra. Maria Heloísa de Moraes pela orientação e colaboração no projeto.

Ao Dr. Wagner Pereira, a Dra. Danielle Gregório e a Dra. Maisa Ciampi pela colaboração no projeto.

Aos Professores Dr. John Rupe e Dr. Burt Bluhm da Universidade de Arkansas (UARK) pela oportunidade, orientação e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) pela oportunidade e condições oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola (LFN) pelos ensinamentos e colaboração.

Às secretárias Fabiana Nunes Wolak e Iraides Oliveira do LFN e do programa de pós-graduação em Fitopatologia, respectivamente, pela paciência e pela eficiência na execução dos serviços burocráticos dos alunos.

Às alunas de iniciação científica Larissa Pereira Lima, Marina Barbieri, Thaís Boufler e Andressa Schirmer, aos Drs. Maisa Ciampi e Wagner Pereira e a mestranda Flávia Rogério pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia de Sementes, Ana Cláudia Dognini, Mariane Sayuri Ishizuka e Luis Cláudio Sturion pela amizade, paciência e auxílio na condução dos experimentos.

Ao Prof. Luis Eduardo Aranha Camargo e aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, Fernanda Moretti, Mariana Cicarelli, Lillian Bibiano e Raphael Severo pela amizade, paciência e contribuição na utilização dos recursos do laboratório.

À Dr. Maria Heloísa de Moraes e Meyrielle Pires de Camargo pelo fornecimento de isolados utilizados nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Micologia: Ananias Alvez Cruz, Carlos Bragança, Carolina Medeiros, Flávia Rogério, Hugo Tozzi, Maria Eugênia Scanferla, Paulo Mercês, Roberto Chapola, Sergio, Sylvia Moraes e Wagner Pereira pela amizade, apoio e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos colegas dos Laboratórios de Virologia, Procariotos Fitopatogênicos, Fisiologia do Parasitismo, Nematologia e Epidemiologia pelos auxílios nos trabalhos e pela boa convivência.

Aos amigos que fiz durante esta fase de minha vida e que me deram apoio e me proporcionaram muitas alegrias: Ana Carolina Negreiros, Ananias Alvez Cruz, Carlos Bragança, Carolina Medeiros, Cindy Lopez, Cláudia Marqueze, Flávia Rogério, Greicy Andrea Sarria-Villa, Larissa Lima, Leonardo Dias, Maisa Ciampi, Maria Cândida Gasparoto, Marina Barbieri, Thaís Boufler, Victor Hugo de Moura, Wagner Vicente Pereira.

Às amigas que fiz durante a graduação e que continuam presentes, sempre me proporcionando agradáveis momentos de descontração: Ana Oliva, Bruna Mengai, Camila Maitan, Fabiana Menezes, Mariana Monteiro, Mariele Piovesan, Priscila Martins e Renata Ometto.

Aos amigos de longa data que até hoje estão presentes em minha vida: Ana Francisca Oliveira, Bruna Silva, Carla Fracassi, Frederico de Oliveira, Patrícia Cunha, Rachel Ashanti e Vanessa Gibertoni.

Ao Itamar Zatarin de Araújo pelo companheirismo, apoio, paciência e colaboração.

À minha Família pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ASSIM MESMO

*Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.*

*Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil, assim mesmo.*

*Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.*

*Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto assim mesmo.*

*O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.*

*Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja Feliz assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.*

Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.

*Versão de Madre Teresa de Calcuta
(original de Dr. Kent M. Keith)*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.2 Revisão Bibliográfica.....	23
2.2.1 Cultura da soja.....	23
2.2.2 Importância da detecção de patógenos em sementes	23
2.2.3 Principais doenças fúngicas detectadas em sementes	25
2.2.4 Métodos tradicionais de detecção de fungos em sementes de soja.....	28
2.2.5 Métodos moleculares de detecção de fungos em sementes de soja	29
2.3 Objetivo Geral.....	33
2.4 Objetivos Específicos.....	33
2.5 Material e Métodos	34
2.5.1 Obtenção dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan®	34
2.5.2 Obtenção de isolados fúngicos associados às sementes de soja	37
2.5.3 Extração do DNA dos isolados obtidos	40
2.5.4 Avaliação da especificidade dos iniciadores e sondas obtidas para o método de detecção molecular.....	40
2.5.5 Concentração de iniciadores para otimização da qPCR.....	41
2.5.6 Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas.....	41
2.5.7 Avaliação da sensibilidade do método de detecção dos fungos em sementes de soja com os iniciadores selecionados	42
2.5.7.1 Maceração de sementes para extração de DNA	43
2.5.7.2 Embebição de sementes em água ultrapura	43
2.5.7.3 qPCR para avaliação da sensibilidade de iniciadores e sondas obtidas	43
2.5.7.4 Método do papel de filtro (<i>blotter test</i>) para a detecção dos fungos em estudo, exceto <i>S. sclerotiorum</i>	44
2.5.7.5 Método do meio semi-seletivo ágar-azul de bromofenol (NEON) para a detecção de <i>S. sclerotiorum</i>	44

2.5.8 Desenvolvimento de uma qPCR multiplex com os iniciadores e sondas obtidos	45
2.5.8.1 Concentração de iniciadores para otimização de qPCR multiplex	45
2.5.9 Detecção de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja de amostras naturalmente infectadas	46
2.5.9.1 Detecção fungos fitopatogênicos por meio da qPCR	46
2.6 Resultados e Discussão	47
2.6.1 Avaliação da especificidade dos iniciadores e sondas obtidas	47
2.6.3 Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas	50
2.6.4 Avaliação da sensibilidade do método de detecção dos fungos em sementes de soja com os iniciadores e sondas selecionados	53
2.6.5 Desenvolvimento de uma qPCR multiplex com os iniciadores e sondas obtidos	55
2.6.6 Detecção de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja de amostras naturalmente infectadas	56
2.6.6.1 Detecção por meio de qPCR	58
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	73

RESUMO

Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja

Fungos fitopatogênicos veiculados por sementes de soja podem causar sérios prejuízos à cultura, bem como danos diretos reduzindo o poder germinativo, vigor e emergência das sementes. A detecção e identificação precisa de fitopatógenos é uma das estratégias mais importantes para iniciar as medidas preventivas ou curativas no controle de doenças de plantas. Para se evitar a introdução e propagação de patógenos em áreas onde ainda não ocorrem, uma atenção especial deve ser tomada na detecção de agentes patogênicos em sementes. Os métodos tradicionalmente utilizados para detectar e identificar fungos em sementes são, muitas vezes, demorados, laboriosos e exigem um conhecimento extenso de taxonomia clássica. Métodos moleculares têm sido utilizados para detectar, identificar e quantificar uma longa lista de fungos fitopatogênicos. A técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é atualmente considerada a mais eficiente para a detecção de fitopatógenos, não exigindo conhecimentos taxonômicos especializados para interpretar seus resultados. Considerando a importância e as implicações da diagnose rápida e bem sucedida de agentes patogênicos em sementes de soja, este estudo teve como objetivo estabelecer uma metodologia para elevar a eficiência de detecção dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis* spp. e *Corynespora cassiicola*, encontrados com maior frequência em sementes de soja, por meio de qPCR. Iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® foram projetados para os diferentes patógenos e avaliados quanto à sua especificidade e sensibilidade. Curvas padrões, baseando-se em diluições seriadas dos DNAs alvos de iniciadores e sondas específicas, foram estabelecidas para a quantificação desses patógenos. Amostras de sementes de soja naturalmente infectadas, provenientes dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, foram submetidas a testes de detecção por meio de qPCR e métodos tradicionais, para fins de comparação. De todos os iniciadores e sondas projetados, apenas os de *Phomopsis* spp. e *S. sclerotiorum* apresentaram-se específicos e sensíveis, viabilizando sua utilização na detecção desses patógenos. Por meio dos testes tradicionais de detecção, *Phomopsis* spp. apresentou incidência máxima de 2,75% em uma amostra de Minas Gerais e *S. sclerotiorum* não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas. O método de qPCR proporcionou a detecção de *Phomopsis* spp. em todas as amostras testadas, alcançando o nível de incidência máximo de 6,75% em amostra de Minas Gerais. *S. sclerotiorum* não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas pelo método de qPCR. Comparando-se os métodos de detecção testados, a qPCR foi mais sensível na detecção de *Phomopsis* spp. em sementes de soja.

Palavras-chave: Diagnose; qPCR; Fitopatógenos; *Glycine max*

ABSTRACT

Molecular detection of seed-born pathogenic fungi in soybean

Seed-born pathogenic fungi in soybean can cause serious damage to the crop, as well as direct damage by reducing seeds germination, vigor and emergence. The detection and accurate identification of plant pathogens is one of the most important strategies to initiate preventive and curative measures in the management of plant diseases. Particular attention should be taken in the detection of pathogens in seeds in order to avoid introduction and spread of pathogens in areas where they do not occur. The traditionally used methods for detection and identification of seed-born pathogenic fungi are often time consuming, laborious and require extensive knowledge of classical taxonomy. Molecular methods have been used to detect, identify and quantify a long list of plant pathogenic fungi. Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) is currently considered the most efficient technique for the detection of pathogens because it does not require specialized taxonomical knowledge to interpret its results. Given the importance and implications of rapid and successful diagnosis of seed-born pathogenic fungi in soybean, this study aimed to establish a qPCR methodology to increase the detection efficiency of plant pathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis* spp. and *Corynespora cassiicola*, the most commonly occurring seed-born pathogenic fungi. Primers and TaqMan® hydrolysis probes were designed for these four pathogens and tested for specificity and sensitivity. Standard curves were established to quantify these pathogens, based on serial dilutions of the target DNA and specific primers and probes. Samples of naturally infected soybean seed from the states of Goiás, Minas Gerais and Paraná were subjected to detection tests using qPCR and traditional methods, for comparison purposes. From all primers and probes designed, only those for *Phomopsis* spp. and *S. sclerotiorum* showed up specificity and sensitivity, enabling their use to detect of these pathogens. Detection by traditional tests, resulted in a maximum *Phomopsis* spp. incidence of 2.75% in a sample from Minas Gerais and *S. sclerotiorum* was not detected in any of the samples. The detection and quantification of these pathogens by qPCR revealed the presence of *Phomopsis* spp. in all tested samples, the highest incidence level of 6.75% in a sample from Minas Gerais. *S. sclerotiorum* was not detected in any sample assessed by qPCR method. In comparison with traditional methods, qPCR was more sensitive in detecting *Phomopsis* spp. in soybean seeds.

Keywords: Diagnosis; qPCR; Plant pathogens; *Glycine max*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sonda de hidrólise TaqMan®. Este sistema é composto por única cadeia de oligonucleotídeos (sonda) com um fluoróforo *reporter* e *quencher* ligados, respectivamente, à extremidade 5' e à 3'(A). A sonda liga-se à sequência do fragmento amplificado durante cada passo de anelamento da PCR (B) e gera um sinal através da atividade exonucleasse 5' → 3' da Taq DNA polimerase, que degrada a sequência da sonda e libera tanto fluoróforo *reporter* como o *quencher* para a solução (C). Uma vez clivado a partir do resto da sequência da sonda, o fluoróforo 5' é libertado do efeito *quencher* (por meio de FRET) (SCHENA et al., 2004).....32
- Figura 2 - Curva padrão dos valores de C_T calculada a partir das diluições seriadas do DNA do isolado Pho 3 da *Phomopsis* spp. (A) e do isolado Ss 4 de *Sclerotinia sclerotiorum* (B)51
- Figura 3 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola* e *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), reveladas por meio do *blotter test* e meio NEON.....57
- Figura 4 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), avaliadas por dois métodos de detecção, qPCR e *blotter test*59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® de <i>Phomopsis</i> spp.	34
Tabela 2 - Sequências de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® obtidas para <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i>	36
Tabela 3 - Sequências de iniciadores e sondas TaqMan® obtidas para <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i>	37
Tabela 4 - Relação de diferentes isolados obtidos a partir de sementes de soja infectadas	39
Tabela 5 - Especificidade dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® utilizadas nos ensaios para a detecção e quantificação de <i>Phomopsis</i> spp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i>	47
Tabela 6 - Valores de C _T para as diferentes concentrações de iniciadores de <i>Phomopsis</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	50
Tabela 7 - Valores de C _T de diluições seriadas do DNA de isolados de <i>Phomopsis</i> spp. e de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	53
Tabela 8 - Sensibilidade do método de detecção, por meio da obtenção de DNA de amostras embebidas em água ultrapura, utilizando iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® de <i>Phomopsis</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	54
Tabela 9 - Quantificação do DNA de <i>Phomopsis</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes em diferentes níveis de incidência de cada fungo pelo método da curva padrão...	55
Tabela 10 - Valores de C _T s da qPCR multiplex com os iniciadores e sondas de <i>Phomopsis</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
Tabela 11 - Valores de C _T da qPCR multiplex para as diferentes concentrações de iniciadores de <i>Phomopsis</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a cultura agrícola que mais cresceu nos últimos anos no Brasil, sendo considerada uma das principais *commodities* do país. O complexo soja (soja grão, óleo e farelo) representa um dos mais importantes do agronegócio brasileiro, tanto em volume quanto em valor (OUTLOOK FIESP 2023, 2013). Um dos principais fatores que afetam a qualidade da produção da cultura são as doenças. Dentre essas, destacam-se as doenças fúngicas, que em sua maioria, têm as sementes como seu principal veículo de disseminação (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007; YORINORI, 1986). Os fungos veiculados pelas sementes de soja podem causar sérios prejuízos nos diferentes estádios de desenvolvimento da cultura no campo, além de causar danos diretos como redução do poder germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento e rendimento (EMBRAPA, 2011). A estratégia mais efetiva de manejo de doenças é a exclusão, realizada por meio da detecção de patógenos nas sementes para que os lotes contaminados possam ser eliminados antes do plantio (WALCOTT, 2003). Os fungos patogênicos de maior ocorrência em sementes de soja são *Phomopsis* spp. *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium pallidoroseum* (sin. *F. semitectum*), *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., entre outros (GOULART, 2004; ROY; RATNAYAKE, 1997).

A doença mofo branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, pode ser transmitida pela semente (HENNEBERG et al., 2011). O uso de sementes livres do patógeno tem sido um dos principais meios de controle dessa doença na cultura, para evitar a introdução da doença em áreas isentas. A presença de uma semente infectada na amostra é preocupante, pois cada semente produz mais que um escleródio que, por sua vez, pode produzir até 20 apotécios com capacidade individual de liberar cerca de 2.000.000 ascósporos em dez dias (HENNEBERG et al., 2011; STEADMAN, 1983). Sendo assim, uma única semente infectada tem o potencial de produzir milhões de focos da doença. Segundo Henneberg et al. (2011), é necessária a realização de estudos envolvendo procedimentos mais representativos de amostragens e métodos de detecção mais sensíveis de *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

Recentemente, tem-se observado com frequência a ocorrência de *Corynespora cassiicola*, fungo causador da doença mancha-alvo na soja, que tem a semente como um dos seus principais veículos de disseminação (EMBRAPA, 2011; TERAMOTO et al., 2013). É encontrado em praticamente todas as regiões de cultivo de soja do Brasil e pode sobreviver

em restos de cultura e sementes infectadas, sendo essa uma forma de disseminação do patógeno. Condições de alta umidade relativa e temperaturas amenas são favoráveis à infecção na folha. Os sintomas mais comuns são manchas arredondadas nas folhas, com halo amarelado, presença de linhas concêntricas e pontuação escura no centro, podendo causar severa desfolha (EMBRAPA, 2011).

A detecção e identificação precisa de fitopatógenos é uma das estratégias mais importantes para iniciar as medidas preventivas ou curativas no controle de doenças de plantas. Uma atenção especial deve ser tomada na detecção de agentes patogênicos em sementes, plantas matrizes e materiais propagativos, para evitar a introdução e propagação de patógenos em áreas onde ainda não ocorrem. Por esse motivo, é cada vez mais necessária a disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e precisos para a detecção e identificação de fungos patogênicos, para melhorar a tomada de decisão de controle da doença (CAPOTE et al., 2012).

Vários métodos convencionais podem ser utilizados para se detectar patógenos em sementes de soja, sendo que a escolha de um método particular dependerá do tipo do patógeno ou espécie a ser detectada. O principal método utilizado é o do papel de filtro (*blotter test*). Têm-se comprovado que este método é perfeitamente viável e o mais eficaz para a cultura da soja (GOULART, 2004). Em casos particulares, como na detecção de *S. sclerotiorum*, o método do papel de filtro apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a possibilidade de outros fungos fitopatogênicos e saprófitas crescerem mais rapidamente sobre as sementes, dificultando a avaliação. Nesse caso, estudos realizados recentemente destacam o método com o meio de cultura ágar-azul de bromofenol como sendo promissor para a detecção de *S. sclerotiorum*, no qual as sementes são incubadas por sete dias em temperaturas de 14 a 20°C no escuro, sendo o patógeno detectado pela mudança de coloração do meio, que ocorre na presença de substâncias ácidas (ácido oxálico) liberados pelo fungo durante o seu crescimento (HENNEBERG et al., 2011).

A maior parte dos métodos convencionais para identificar fungos em sementes é baseada em morfologia e características de colônias. Estes métodos, no entanto, são muitas vezes demorados, laboriosos e exigem um conhecimento extenso de taxonomia clássica. Outras limitações incluem a dificuldade de algumas espécies de serem cultivadas *in vitro*, e da incapacidade de quantificar com precisão o patógeno (GOUD; TERMORSHUIZEN, 2003). Estas limitações conduziram ao desenvolvimento de abordagens moleculares com maior precisão e confiabilidade. Grande variedade de métodos moleculares tem sido utilizada para detectar, identificar e quantificar uma longa lista de fungos fitopatogênicos. Métodos

moleculares têm sido também aplicados ao estudo da variabilidade genética de populações de patógenos, e até mesmo para a descrição de novas espécies de fungos. Em geral, estes métodos são muito mais rápidos, específicos, sensíveis e precisos, e podem ser realizados e interpretados por pessoas sem conhecimentos taxonômicos especializados (ATALLAH et al., 2007; CAPOTE et al., 2012; DEBODE et al., 2009; TOOLEY et al., 2005; ZHANG et al., 1999).

A técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é atualmente considerada a mais eficiente para a detecção de fitopatógenos. Esta técnica permite o acompanhamento da reação durante a amplificação por meio da utilização de um sinal de fluorescência, que aumenta proporcionalmente com o número de fragmentos amplificados e o número de alvos presentes na amostra (COCKERILL; SMITH, 2002; KURIAN et al., 1999; WITTEWER et al., 1997).

PCR multiplex baseia-se na utilização de vários iniciadores de PCR na mesma reação, o que permite detecção simultânea e sensível de diferentes alvos de DNA, reduzindo o tempo e custo. Este método é útil na fitopatologia uma vez que as plantas são infectadas normalmente por mais de um patógeno (CAPOTE et al., 2012).

Estudos envolvendo detecção de fitopatógenos por meio de qPCR e/ou qPCR multiplex apontam potencial eficiência do método para diversos patossistemas. Iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® foram utilizados para detectar *Diaporthe phaseolorum* e *Phomopsis longicolla* em sementes de soja, os quais forneceram resultados mais rápidos quando comparados com outros métodos de detecção testados (ZHANG et al., 1999). Esse método de detecção foi também utilizado para detectar *Phytophthora ramorum* e *Phytophthora pseudosyringae* em espécies de carvalho (*Quercus agrifolia* e *Lithocarpus densiflorus*) na Califórnia, *Verticillium dahliae*, causador da murcha de verticillium em batata, *Colletotrichum acutatum* em folhas de morangueiro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (ATALLAH et al., 2007; DEBODE et al., 2009; SOUSA et al., 2014; TOOLEY et al., 2005).

Diante dos fatos apresentados, presume-se a necessidade de novos estudos relacionados aos métodos de detecção de fungos em sementes de soja. A associação de técnicas moleculares aos métodos de detecção já existentes pode se tornar uma opção rápida e precisa para ser incorporada às Regras para Análises de Sementes no Brasil (BRASIL, 2009b).

2 DESENVOLVIMENTO

2.2 Revisão Bibliográfica

2.2.1 Cultura da soja

A soja, (*Glycine max* (L.) Merrill), pertence à família das Fabáceas (leguminosas), é originária da Ásia e atualmente é a principal oleaginosa produzida no mundo. Sua semente é utilizada para diversas finalidades: origina a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. O Brasil e os Estados Unidos disputam a posição de maior produtor do grão, embora o Brasil apresente potencial mais elevado de expandir a oferta nos próximos anos e, assim, consolidar-se como líder global (OUTLOOK FIESP 2023, 2013). O oitavo levantamento realizado pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) aponta para a safra brasileira de soja na temporada atual, uma produção de 86.569,2 mil toneladas, representando um incremento de 6,2% em relação à safra 2012/13. (CONAB, 2014). Na safra 2012/2013, o Centro-Oeste foi o principal produtor do grão, com 47% da oferta nacional, seguido da Região Sul, com 37%. As projeções indicam que o Centro-Oeste continuará sendo o maior produtor da oleaginosa até 2022/2023, com 48% do total, enquanto o Sul perderá participação na oferta nacional, indo a 29%. As regiões Norte e Nordeste, que compreendem a atual fronteira agrícola, ganham espaço no cenário nacional, saindo de 3% para 5% e de 7% para 12%, respectivamente (OUTLOOK FIESP 2023, 2013).

Dentre os principais fatores limitantes na produção dessa cultura estão as doenças, sendo em sua maioria disseminadas via sementes.

2.2.2 Importância da detecção de patógenos em sementes

A semente pode ser considerada o mais eficiente veículo de disseminação de patógenos, pois essa se constitui em um abrigo seguro à sobrevivência e um eficiente meio de transporte do patógeno a várias distâncias (DHINGRA, 2005). Os patógenos podem sobreviver como micélio dormente em sementes (no tegumento e cotilédones) (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Sementes infectadas com determinadas doenças podem não germinar ou, se germinarem, na maioria das vezes, podem dar origem a plantas doentes, reduzindo o valor comercial da cultura. Isso indica que a presença de micélio dormente em sementes infectadas pode, além de disseminar o patógeno, aumentar a intensidade de doença

no campo, caso tenha ocorrido a transmissão para a planta (PAULA JÚNIOR, 2010). No entanto, ao se determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e, consequentemente do lote que representa, permite obter informações que podem ser usadas para diferentes finalidades, como comparar a qualidade de diferentes lotes de sementes ou determinar a sua utilização comercial. A detecção de patógenos em sementes pode indicar a necessidade e orientar o seu tratamento visando o controle de doenças originadas com essas sementes (BRASIL, 2009b). Além disso, no caso de lotes de sementes importadas, pode ocorrer a introdução de patógenos em áreas isentas, fazendo-se necessário teste de quarentena e de certificação para o comércio internacional de sementes (BRASIL, 2009b). Já foram propostos níveis de tolerância de patógenos em sementes para algumas espécies, como trigo, soja, feijão, arroz e algodão. Esses níveis de tolerância propostos são para Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas (PNQR), ou seja, pragas que já existem no país e que podem apresentar repercussões economicamente inaceitáveis. Sempre que recomendado epidemiologicamente, é prioritária a erradicação de patógenos na estratégia de áreas livres de doenças (HENNING, 2004). Em 1999 foi publicada a Instrução Normativa n° 71 constituindo o Grupo Técnico Permanente em Sanidade de Sementes (GTPSS), com as atribuições de análise e emissão de parecer técnico relativo a estudos técnico-científicos relacionados às proposições de níveis de tolerância para as PNQR e propor os níveis de tolerância destas pragas na produção e comercialização de sementes (PEREIRA, 2010). O GTPSS estudou o estabelecimento de níveis máximos de tolerância para as PNQR em diversas culturas, como algodão, arroz, aveia, trigo, cevada, soja, girassol e milho, com base na análise de risco de pragas (ARP). Os padrões sugeridos não foram estabelecidos e o grupo foi desativado temporariamente entre 2002 e 2005. Entretanto, voltou a ser reativado em 2006 pela Portaria n° 192, mantendo as mesmas atribuições. O GTPSS propôs e o MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) submeteu à consulta pública, pela Portaria n°47, de 26 de fevereiro de 2009, o projeto de Instrução Normativa e seus respectivos anexos, que visa aprovar os níveis de tolerância de pragas para PNQR nas culturas milho, sorgo, algodão, soja, trigo, feijão, girassol, café, goiaba, abacaxi e banana (PEREIRA, 2010). No caso da soja, essa Portaria recomenda que sejam recusados lotes de sementes que apresentem um escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* por 500g de sementes por meio de exames da amostra de sementes secas.

No Brasil, dentre as doenças fúngicas consideradas importantes, muitas são essencialmente transmitidas pelas sementes. Diante da extensão desse problema, torna-se indispensável a produção de sementes livres de patógenos (DHINGRA et al., 2013). Com a

expansão do cultivo da soja em novas áreas, torna-se imprescindível a detecção de patógenos para a utilização de sementes saudáveis.

2.2.3 Principais doenças fúngicas detectadas em sementes

Os patógenos mais importantes que infectam as sementes são os fungos, responsáveis não somente pelo desenvolvimento da doença na cultura, mas também pelo apodrecimento das sementes no solo, a deterioração durante o armazenamento e a produção de micotoxinas (DHINGRA et al., 2013).

Os fungos patogênicos de maior ocorrência em sementes de soja são *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium pallidoroseum* (sin *F. semitectum*), *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. entre outros (GOULART, 2004, ROY; RATNAYAKE, 1997). Recentemente tem-se detectado com frequência *Corynespora cassiicola*, fungo causador da doença mancha alva em sementes de soja (EMBRAPA, 2011). A seguir serão descritas algumas das principais doenças da soja que são transmitidas por fungos veiculados por sementes.

2.2.3.1 Mofo branco

A doença mofo branco é causada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, à ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (INDEX FUNGORUM, 2014; KIRK et al., 2008; MASSOLA; KRUGNER, 2011). O micélio é hialino, septado, muito ramificado, formando uma massa felpuda na superfície dos órgãos atacados. Sob condições ambientais favoráveis, o micélio continua multiplicando-se indefinidamente. Porém, quando as mesmas se tornam desfavoráveis como, por exemplo, ao se esgotarem as reservas alimentares do hospedeiro, a massa micelial se transforma em estruturas de forma irregular, a princípio brancas, logo mais rosadas e finalmente, negras e rígidas chamadas escleródios (BRUSTOLIN et al., 2012).

Nas últimas safras, tem-se aumentado a ocorrência e a intensidade dessa doença em todo o Brasil, destacando-se a região dos cerrados. Por isso, o mofo branco tornou-se numa grande preocupação para os pesquisadores e produtores de soja (BRUSTOLIN et al., 2012).

2.2.3.2 Doenças causadas por fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis*

Podridão de sementes, seca da haste e da vagem e cancro da haste da soja são três doenças causadas pelo complexo *Diaporthe/Phomopsis* (ZHANG, 1998). Espécies do complexo *Diaporthe/Phomopsis* pertencem ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, à ordem Diaporthales e família Diaporthaceae (INDEX FUNGORUM, 2014; KIRK et al., 2008).

Podridão de sementes é a principal causa da queda da qualidade de sementes de soja das principais regiões produtoras no mundo todo. Essa doença é causada pelo fungo *Phomopsis longicolla*. Sementes infectadas por *P. longicolla* podem parecer desde assintomáticas assim como enrugadas, alongadas, rachadas e muitas vezes esbranquiçadas. Têm sua germinação e emergência reduzidas no campo e, em condições severas, podem apresentar grandes perdas de produção (SINCLAIR, 1995). Segundo Li (2011), essa espécie de patógeno é a mais frequente em sementes e/ou grãos, podendo ser isolado com frequência de demais partes da planta. Sua fase sexuada ainda não foi relatada (HOBBS et al., 1985; SANTOS et al., 2011).

De acordo com Sinclair (1999), o complexo *Diaporthe/Phomopsis* inclui, além de *P. longicolla*, três variantes de *Diaporthe phaseolorum* (Cooke and Ellis) Sacc. : (i) *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (S.G.Lehman) Wehmeyer (telemorfo). Anamorfo: *Phomopsis phaseoli*, (Desmaz.) Sacc. (sin. *Phomopsis sojae*) agente causal da seca-da-haste e da vagem; (ii) *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* K. L. Athow and R.M. Caldwell (telemorfo), agente causal do cancro caulívora (anamorfo *P. phaseoli*); e (iii) *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* Fernández (telemorfo), agente causal do cancro meridionalis (anamorfo *Phomopsis* sp.).

A seca-da-haste e da-vagem ocorre sobre hastes, vagens, pecíolos, folhas, sementes e raízes. É a principal doença que ocorre sobre hastes e vagens próximas a maturação. A doença surge quando ocorrem chuvas frequentes acompanhadas de temperatura e umidade elevada. Nessa ocasião, as vagens alcançam a metade do seu tamanho esperado. As plantas doentes são menores e, normalmente, passam despercebidas pelo observador. Quando encontradas, apresentam-se parcialmente mortas e, geralmente, os tecidos destruídos estão revestidos por numerosos pontos negros que são os corpos de frutificação assexual do agente causal (picnídios). Os danos causados por essa doença ainda não foram quantificados cientificamente. São estimados em até 15% e evidenciados pela má qualidade das sementes, sendo considerados mais qualitativos do que quantitativos (CARMONA et al., 2012).

Em relação aos cancos, considerando-se os sintomas, ocorrem duas doenças semelhantes, porém distintas, denominadas conjuntamente de cancro-da-haste. Para distingui-las pelos nomes comuns, propõem-se as denominações de cancro-meridionalis e cancro-caulívora. No cancro-meridionalis, as lesões tornam-se alongadas e raramente circundam a haste. Os sintomas foliares são clorose e necrose internervural, sem murcha. Esse sintoma secundário é denominado de folha-carijó (REIS et al., 2012). Essa doença, na década de 90, causou epidemias severas até a substituição de cultivares suscetíveis por resistentes (BERTAGNOLLI et al., 2002). Os sintomas de cancro-caulívora ocorrem em pecíolos, folhas e, à medida que o tempo passa, as lesões se expandem longitudinalmente, formando cancos levemente deprimidos e inicialmente pardo-avermelhados. Os cancos mais velhos podem ter a margem pardo-avermelhada e o centro pardo-acinzentado (REIS et al., 2012).

2.2.3.3 Antracnose

A antracnose da soja é causada por espécies pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2014; KIRK et al., 2008). A espécie mais comum associada à antracnose é *Colletotrichum truncatum*, porém, outras espécies podem estar envolvidas, incluindo *C. cocodes*, *C. destructivum*, *C. goeoesporioides*, *C. incanum*, *C. chlorophyti* e *C. graminicola* (MANANDHAR; HARTMAN, 1999; MAHMODI et al., 2013; YANG, 2013; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014).

A antracnose pode afetar a soja em todos os estádios de desenvolvimento da cultura, no entanto, a fase mais destrutiva ocorre em plantas adultas. Na semente, tem sido observada como lesão cotiledonar, determinando às vezes a morte prematura das plantas. Quando sementes infectadas são semeadas, muitas plântulas morrem antes ou após emergirem do solo. Nas hastes e nas vagens, os tecidos necrosados apresentam-se densamente cobertos com acérvulos pretos, dotados de inúmeras setas. A aparência macroscópica lembra a seca da haste e da vagem, causada por *Phomopsis phaseoli*. Porém, os acérvulos estão irregularmente dispostos na superfície das hastes atacadas, sem nenhuma tendência de organização em linhas retas, como ocorre com os picnídios de *Phomopsis*. Nas vagens, às vezes, os acérvulos distribuem-se em círculos concêntricos (LEHMAN; WOLF, 1926; REIS et al., 2012).

No Brasil, em condições ambientais favoráveis, os danos podem chegar até 100% de perda na produção (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Temperaturas de 25-30°C, com chuvas frequentes, favorecem todas as fases do ciclo da doença, resultando em epidemias

destrutivas. O cultivo da soja em monocultura, plantio direto, cultivar suscetível e alta densidade de plantas favorece o desenvolvimento de epidemias da doença (REIS et al., 2012).

2.2.3.4 Mancha alvo

Tendo o fungo *Corynespora cassiicola* como seu agente causal, a mancha alvo é encontrada em muitas áreas produtoras de soja do Brasil (ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA, 2011). Essa espécie pertencente ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, e família Corynesporascaceae (INDEX FUNGORUM, 2014; KIRK et al., 2008).

C. cassiicola pode atacar as hastes, as vagens e, principalmente, as folhas das plantas, causando redução da área fotossintética, em função das lesões foliares, devido à desfolha precoce das folhas. Os sintomas nas folhas, inicialmente se caracterizam por pequenos pontos de coloração castanho-avermelhados. Com a evolução da doença, esses pontos progridem para manchas de formato arredondado ou irregular, da mesma coloração, variando em tamanho de 10 a 15 mm. Muitas vezes, as lesões, quando completamente desenvolvidas, apresentam anéis concêntricos de tecidos mortos, circundados por halo de coloração verde-amarelado, muito similar a um alvo. Por isso, o nome comum da doença ser mancha-alvo. Nas vagens, pecíolos e hastes, as lesões são irregulares, de coloração castanho-avermelhada e levemente deprimidas (ALMEIDA et al., 2005; AVOZANI; FERREIRA, 2012).

No Brasil, na safra 1995/96, foi verificada a ocorrência dessa doença em diversas propriedades nos municípios do estado do Paraná, causando desfolhas prematuras, 20 a 25 dias após a emergência, com danos estimados entre 40 a 45% (YORINORI, 1996). Surto severos, mas esporádicos, têm sido observados nas regiões mais frias do Sul e nas regiões altas dos Cerrados (ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA, 2011; TERAMOTO et al., 2013).

2.2.4 Métodos tradicionais de detecção de fungos em sementes de soja

Vários métodos de detecção podem ser utilizados para determinar o nível de sanidade em sementes de soja. Dentre esses métodos podem-se citar: inspeção visual da amostra de sementes; exame da suspensão de lavagem das sementes; incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (*blotter test*); plaqueamento em meio ágar sólido; incubação em rolo de papel; incubação em meio semi-seletivo ágar azul de bromofenol (NEON), sendo os

dois últimos específicos para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b; DINGRA, 1997; GOULART, 2004).

De todos os métodos de detecção citados, o mais aplicável para a maioria dos fungos é o *blotter test*, no qual sementes são dispostas individualmente sobre camada de papel de filtro umedecido e mantidas sob luz fluorescente branca com fotoperíodo de 12 horas por um período de sete/oito dias à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, as sementes são examinadas individualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico para a observação da ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos. Conidióforos com conídios e corpos de frutificação (p.ex., picnídios, acérvulos, peritécios) formados nas sementes são características importantes para identificar espécies fúngicas. Observações de lâminas ao microscópio óptico são, algumas vezes, necessárias para confirmar a identidade dos fungos em nível de espécie (BRASIL, 2009a).

Para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, o método mais aplicável é o NEON. Neste, as sementes são colocadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) contendo o indicador de pH azul de bromofenol e antibióticos. As placas devem ser expostas a luz negra, ou com 12 horas de fotoperíodo ou colocadas no escuro, a 20°C por cinco a oito dias. A partir do terceiro dia de incubação, observações diárias devem ser realizadas para verificar a formação de halos amarelo-avermelhados ao redor das sementes. A formação de halos ocorre devido à produção de ácido oxálico pelo fungo sobre o meio contendo azul de bromofenol (NAPOLEÃO et al., 2006). Este método é específico para detecção de *S. sclerotiorum*, porém algumas espécies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Sclerotium* podem também provocar alteração da cor do meio. Nestes casos, a formação de frutificações típicas dessas espécies pode ser facilmente distinguida de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009a; HENNENBERG et al., 2012; PERES; NASSER; MACHADO, 2002).

2.2.5 Métodos moleculares de detecção de fungos em sementes de soja

A biologia molecular vem proporcionando uma nova e poderosa ferramenta que tem sido utilizada na fitopatologia para a identificação de patógenos, os quais são difíceis de serem detectados e identificados pelas técnicas tradicionais normalmente empregadas (JACCOUD FILHO et al., 2002).

A detecção de fungos via técnicas moleculares tem como princípio a análise de ácidos nucleicos, presentes no núcleo ou em organelas celulares tipo ribossomos e mitocôndrias

(BRASIL, 2009a). As técnicas baseadas nos ácidos nucleicos proporcionam um alto grau de especificidade porque estão diretamente relacionadas com o genoma dos organismos (JACCOUD FILHO et al., 2002). Uma dessas técnicas, a da reação em cadeia da polimerase (PCR), é rápida e sensível e baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências específicas de ácidos nucleicos por meio de reações simultâneas de extensão de iniciadores complementares à fita de DNA (MULLIS, 1990).

O desenvolvimento de métodos baseados na detecção molecular de patógenos em sementes de soja vem sendo realizado por diversos pesquisadores para *Sclerotinia sclerotiorum* (BOTELHO, 2011; GRABICOSKI, 2012) e *Phomopsis* spp. (JACCOUD FILHO et al., 2002; ZHANG et al., 1999). Embora os estudos para algumas espécies já se encontrem em fase avançada, a disponibilização dos métodos para sua detecção enfrenta ainda dificuldades em análise de rotina, em razão da interferência, dentre vários fatores, de elementos celulares das sementes nas reações que constituem os protocolos desenvolvidos para essas espécies alvos das pesquisas até momento (BRASIL, 2009a). Desta forma, nenhum método molecular é utilizado oficialmente para a detecção de fungos fitopatogênicos em sementes, tendo-se como argumento o fato de que os protocolos já desenvolvidos até o momento ainda requerem estudos adicionais para sua aplicação na prática. Acredita-se que, em um futuro próximo, alguns destes métodos voltados para fungos serão incorporados às Regras para Análise de Sementes, no Brasil (BRASIL, 2009b).

É importante ressaltar que o uso de métodos baseados em técnicas moleculares para detecção de fungos terá sua aplicação mais extensiva em casos que a distinção morfológica entre determinadas espécies é extremamente difícil ou insegura e em situações onde a demanda de análise sanitária seja elevada em um curto período de tempo (BRASIL, 2009b).

2.2.5.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

A técnica da qPCR é atualmente considerada a mais eficiente para a detecção de fitopatógenos. Esta técnica permite o acompanhamento da reação durante o processo de amplificação, através da utilização de um sinal de fluorescência, que aumenta proporcionalmente com o número de fragmentos amplificados e o número de alvos presentes na amostra (COCKERILL; SMITH, 2002; KURIAN et al., 1999; WITTEWER et al., 1997). Os dados são, dessa forma, coletados ao longo da PCR, em vez de apenas no final da reação, como na PCR convencional.

Comparada à PCR convencional, a qPCR apresenta muitas vantagens, incluindo 1) ciclo rápido, o que reduz o tempo de amplificação do DNA significativamente; 2) este sistema não requer o uso de eletroforese pós-PCR para determinar os resultados da amplificação, evitando o risco de contaminações e reduzindo o tempo de trabalho e custos de material; 3) a conclusão da PCR num sistema fechado, que reduz o risco de contaminação cruzada de amplificação de DNA ou seja, a detecção de DNA subsequente é realizada no mesmo tubo; 4) PCR em tempo real permite a quantificação do DNA, o que pode ser útil na determinação dos níveis de infestação de sementes; 5) o sistema permite a análise de 96 amostras ou múltiplos desse número simultaneamente, facilitando a automatização da extração de ácidos nucleicos e das etapas de preparação do Master Mix, reduzindo o tempo, sendo particularmente interessante nas situações em que um diagnóstico rápido é necessário; 6) o uso de sondas com diferentes fluoróforos permite o uso de PCR multiplex, capaz de detectar dois ou mais patógenos na mesma reação (CAPOTE et al., 2012; GIULIETTI et al., 2001; WITTWER et al., 2001).

O sistema de detecção via sondas de hidrólise TaqMan® utiliza uma sonda fluorescente para a detecção de um produto específico da PCR, conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. Nesse sistema são utilizados três oligonucleotídeos: um iniciador direto, um iniciador reverso e uma sonda. Todos eles são específicos e complementares ao alvo. O sistema utiliza uma tecnologia de sonda que explora a atividade 5' → 3' de uma enzima nuclease, sendo que a mais comumente utilizada é a Taq DNA polimerase (GIULIETTI et al., 2001).

A sonda é um oligonucleotídeo com um corante (ou fluoróforo) *reporter* na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo corante *reporter* devido à proximidade dos dois. Essa proximidade entre o *quencher* e o *reporter* permite a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Quando a sequência alvo está presente, a sonda se anela logo após um dos iniciadores e é clivada através da atividade exonuclease 5' → 3' da Taq DNA polimerase, enquanto o iniciador é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando a emissão do sinal de fluorescência do corante *reporter* e remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do iniciador continue até o final da fita molde. As moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é medido a cada ciclo e é

diretamente proporcional à quantidade de produto de amplificação produzido (GIULIETTI et al., 2001; SCHENA et al. 2004) (Figura1).

Figura 1 - Sonda de hidrólise TaqMan®. Este sistema é composto por única cadeia de oligonucleotídeos (sonda) com um fluoróforo *reporter* e *quencher* ligados, respectivamente, à extremidade 5' e à 3' (A). A sonda liga-se à sequência do fragmento amplificado durante cada passo de anelamento da PCR (B) e gera um sinal através da atividade exonucleásica 5' → 3' da Taq DNA polimerase, que degrada a sequência da sonda e libera tanto fluoróforo *reporter* como o *quencher* para a solução (C). Uma vez clivado a partir do resto da sequência da sonda, o fluoróforo 5' é libertado do efeito *quencher* (por meio de FRET) (SCHENA et al., 2004)

As vantagens do sistema TaqMan® são as seguintes: (i) é necessário a hibridização específica entre a sonda e a sequência alvo para gerar sinal de fluorescência; (ii) as sondas podem ser marcadas com corantes *reporter* distintos e distinguíveis, permitindo a amplificação de duas ou mais sequências distintas em um mesmo tubo de reação.

Como aplicação quantitativa, o sistema permite determinar alguns valores durante a fase exponencial da reação, como por exemplo, o *Cycle Threshold* (C_T). O C_T é o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, por meio do sinal de

fluorescência (GIULIETTI et al., 2001; SCHENA et al., 2004). O C_T é usado para calcular o número inicial de cópias de DNA, uma vez que esse valor está inversamente relacionado com a quantidade inicial de alvo. Por exemplo, ao comparar os resultados de PCR em tempo real a partir de amostras contendo diferentes quantidades de alvo, uma amostra contendo duas vezes mais a quantidade inicial irá produzir um C_T um ciclo antes da amostra que continha metade do número de cópias do alvo da primeira antes da amplificação (SCHENA et al., 2004).

Uma diluição em série de concentrações conhecidas de um DNA alvo pode ser utilizada para estabelecer uma curva padrão, visando determinar a quantidade inicial desse alvo nas amostras experimentais ou para a avaliação da eficiência da reação. O log de cada concentração conhecida na série de diluição (eixo x) é representado graficamente contra o valor de C_T para a concentração (eixo y). A partir desta curva padrão, informações sobre a eficiência da reação, bem como vários outros parâmetros (incluindo a inclinação da reta, interceptação y , e o coeficiente de correlação) podem ser obtidos. As concentrações escolhidas para a curva padrão devem abranger a gama de concentrações esperadas do alvo nas amostras experimentais (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010; SCHENA et al., 2004).

2.3 Objetivo Geral

Considerando a importância e as implicações da diagnose rápida e bem sucedida de agentes patogênicos em sementes de soja, este estudo teve como objetivo estabelecer uma metodologia para elevar a eficiência de detecção dos fungos fitopatogênicos encontrados com maior frequência em sementes de soja.

2.4 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- i) Desenvolvimento e avaliação de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® de diferentes fungos fitopatogênicos frequentemente encontrados em sementes de soja no Brasil;
- ii) Desenvolvimento de um qPCR multiplex a partir dos iniciadores obtidos para detecção desses fungos em sementes de soja;
- iii) Avaliação da validade do método desenvolvido, comparando-o com os métodos tradicionais de detecção.

2.5 Material e Métodos

2.5.1 Obtenção dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan®

Iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® foram projetados para as espécies *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* que, juntamente com *Phomopsis* spp., são consideradas as espécies mais frequentemente encontradas em sementes de soja no Brasil (EMBRAPA, 2011; GOULART, 2004; TERAMOTO et al., 2013). Para a detecção de *Phomopsis* spp., foram utilizados os iniciadores com as sequências direta PL-5 F, reversa PL-5 R e a sonda PL-5 P já existentes, capazes de detectar as espécies *Phomopsis longicolla*, *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (ZHANG et al., 1999), listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® de *Phomopsis* spp.

Iniciador e sonda	Sequência	Posição (pb)	Especificidade
PL-5 F ^a	5'-CGAGCTCGCCACTAGATTTC-3'	142 – 162	<i>P. longicolla</i> , <i>D.</i>
PL-5 R ^a	5'-CCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG-3'	237– 219	<i>phaseolorum</i> var.
PL-5 P ^a	5'-CCATCACCAAGCCAGGCTTGAGG-3'	191– 213	<i>meridionalis</i> e <i>D.</i> <i>phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> .

^a Zhang et al. (1999)

Sequências de nucleotídeos de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* foram selecionadas a partir de regiões ITS e β -tubulina depositadas no banco de dados GenBank/NCBI, para desenvolver iniciadores e sondas específicas a cada um desses patógenos. Para projetar os iniciadores e as sequências de sonda, foi utilizado o Software Primer Express (LIFE TECHNOLOGIES, EUA). Para o desenho de iniciadores e sondas específicos para *S. sclerotiorum*, foram utilizadas as sequências com número de acesso AY312374 e SSU07553. O desenho de iniciadores e sondas de *C. truncatum* e *C. cassiicola* foi realizado utilizando-se as sequências com números de acesso FJ172227.1 e KC544023, respectivamente. Todas as sequências de iniciadores e sondas foram comparadas a sequências disponíveis em bases de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) para avaliar a sua especificidade. Mais de 50 pares de iniciadores com suas respectivas sondas foram obtidos a partir de cada sequência utilizada. Para a

escolha dos iniciadores a serem sintetizados para sua utilização nas posteriores análises, foram avaliados alguns parâmetros recomendados para desenho de iniciadores e sondas para qPCR, como comprimento do iniciador (em número de bases), tamanho do fragmento amplificado (*amplicon*), temperatura de *Melting* (T_M), conteúdo G/C(%) e problemas estruturais (interação intramolecular e interação intermolecular). O tamanho do iniciador ideal é de 18 a 30 bases, o tamanho recomendado do *amplicon* é de 50 a 150 pares de bases, a T_M dos iniciadores deve ser de 58 a 60°C, o conteúdo G/C aceitável é de 20 a 80% (sendo ideal de 40 a 60%). Problemas estruturais devem ser evitados, como a interação intramolecular (formação de *hairpins*) e interação intermolecular (formação de dímeros), especialmente em duas ou mais bases da extremidade 3'. Além disso, devem ser evitadas repetições consecutivas do mesmo nucleotídeo (mais do que quatro), principalmente guaninas (Gs). Na extremidade 3' (cinco últimos nucleotídeos) devem ser evitadas mais do que dois Cs e/ou Gs. Para o desenho de sondas, deve-se levar em consideração o tamanho de 18 a 30 bases (sendo ideal 20), o conteúdo G/C de 30 a 80% e a T_M da sonda deve ser de 68 a 70°C (8 a 10°C superior à T_M dos iniciadores). Deve-se evitar repetições consecutivas do mesmo nucleotídeo (mais do que quatro), evitar G na extremidade 5' (efeito *quencher*) e evitar complementaridade da sonda com os iniciadores (LIFE TECHNOLOGIES, EUA). Após essa avaliação, apenas um conjunto de iniciadores e sonda de *C. truncatum* e dois conjuntos de iniciadores e sonda de *S. sclerotiorum* apresentaram os parâmetros adequados para serem submetidos à síntese.

As sequências de iniciadores e sondas selecionadas para os diferentes patógenos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® obtidas para *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum*

Iniciador e sonda	Sequência	Posição (pb)	Especificidade
SS1For	5'-AGCCACCCATCCTACGGAGAT-3'	940 - 960	
SS1Rev	5'-TGACCAGGGAAACGGAGACA-3'	1022 - 1003	<i>S. sclerotiorum</i>
SS1 P	5'- TCCGCTGTCATGTCCGGTGTACCA-3'	976- 1000	
SS2For	5'-AACGCAGCGAAATGCGATAA-3'	221 - 240	
SS2Rev	5'-CATGCCCCCGGAATACC-3'	318 - 301	<i>S. sclerotiorum</i>
SS2 P	5'-CTTTGAACGCACATTGCGCCCCT-3'	277 - 299	
Col1For	5'-CCTGCGGAGGGATCATTACTG-3'	2 - 22	
Col1Rev	5'-CTACCCGCCGAAGCAACAG-3'	78 - 60	<i>C. truncatum</i>
Col P	5' -CCGCTCATCAACCCTTTGTGAACATACCTT-3'	28 - 57	

Cada iniciador apresentado na Tabela 2 foi submetido à síntese e testado previamente por PCR convencional, para conferir sua especificidade aos patógenos em estudo, antes da síntese da sua respectiva sonda. No experimento para teste de especificidade, as sequências de iniciadores foram submetidas à PCR para confirmar amplificação de isolados dos fungos alvos bem como a não amplificação de fungos não alvos (ANEXO A).

Concomitantemente ao desenho de iniciadores e sondas, iniciadores específicos para PCR convencional já existentes e, considerados específicos de acordo com a literatura (CHEN et al., 2006, 2010; FREEMAN et al., 2002; QI et al., 2009; ROGERS et al., 2009), foram submetidos a testes de especificidade por meio de PCR convencional (ANEXO A) com o objetivo de, a partir deles, em caso de comprovada especificidade, obter uma sonda para sua utilização na qPCR.

De todos os iniciadores testados (projetados e os já existentes), apenas TYF/TYR e SSFWD/SSREV de *S. sclerotiorum* (CHEN et al., 2010; FREEMAN et al., 2002) e Colg1/CT2 de *C. truncatum* (CHEN et al., 2006) apresentaram especificidade (ANEXO A). Para *S. sclerotiorum*, os iniciadores escolhidos para as posteriores análises foram TYF/TYR por já apresentarem uma sonda projetada (TYP) e temperatura de anelamento próxima à dos iniciadores de *C. truncatum* (CHEN et al., 2006, 2010). A proximidade de temperatura de anelamento facilitaria a otimização de uma reação multiplex. A obtenção da sonda para os iniciadores Colg1/CT2 foi realizada por meio do software Primer3 Plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), seguindo-se as recomendações específicas para desenho de sondas (LIFE TECHNOLOGIES, EUA). Os iniciadores TYF/TYR e Colg 1/CT2 com suas respectivas sondas apresentam-se especificados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequências de iniciadores e sondas TaqMan® obtidas para *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum*

Iniciador e sonda	Sequência	Posição (pb)	Especificidade
TYF ^a	5'- ATATAACGCTACTCTCTCTGTTC-3'	834-856	
TYR ^a	5'- AGCCAACCTTCGGAGATTTG-3'	1050-1031	<i>Sclerotinia</i>
TYP ^a	5'- CGAGAACTCTGACGAGACCTTCTGTA- 3'	867-892	<i>sclerotiorum</i>
Colg 1 ^b	5'- AACCCCTTTGTGAACATACC - 3'	37-55	
CT2 ^b	5'- CTTTAAGGGCCTACGTCAA - 3'	410-392	<i>Colletotrichum</i>
CTP	5'-TGACACAAGCAAATAATCA-3'	178-197	<i>truncatum</i>

^a Chen et al. (2010), ^b 2006)

A sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp. (Tabela 1) foi marcada com o fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) na extremidade 5' e quencher TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) na extremidade 3'. A sonda TYP de *S. sclerotiorum* foi marcada com o fluoróforo VIC (4,7,2'-triclora-7'-fenil-6-carboxifluoresceína) na extremidade 5' e quencher QSY (ácido carboxílico, éster succinimidílico) na extremidade 3' e a sonda CTP de *C. truncatum* foi marcada com o fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) na extremidade 5' e quencher MGB (quencher não-fluorescente) na extremidade 3' (Tabela 3). Todos os iniciadores foram sintetizados pela empresa Thermo Fisher Scientific e as sondas foram obtidas pela Applied Biosystem.

2.5.2 Obtenção de isolados fúngicos associados às sementes de soja

Sementes provenientes de regiões produtoras de soja foram colocadas em placas de Petri contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas, embebidas em água destilada. As sementes de soja foram dispostas de forma equidistante, em número de dez por placa. Em seguida, os recipientes contendo as sementes foram incubados em ambiente controlado, com temperatura de 20±2°C, sob regime de 12 h de luz e 12 h de escuro. Após um período de incubação de sete dias, as sementes foram examinadas individualmente, sob

microscópio estereoscópico e os micro-organismos foram identificados e submetidos ao isolamento. A identificação foi feita com base na esporulação dos fungos e ou, na presença de estruturas reprodutivas típicas de cada espécie em estudo (BRASIL, 2009a). O isolamento foi feito com o auxílio de uma agulha de repicagem flambada. Estruturas dos fungos a serem isolados foram transferidas ao meio BDA e incubadas a 25°C sob fotoperíodo de 12h até o início de crescimento das colônias. No caso de *S. sclerotiorum*, a obtenção dos isolados foi feita através de amostras de sementes de soja contendo escleródios visíveis a olho nu ou de colônias detectadas em placas de Petri contendo meio NEON com presença de escleródios. Os escleródios isolados a partir das amostras de sementes foram desinfestados superficialmente em solução de hipoclorito 1% e aqueles obtidos a partir de colônias crescidas em meio NEON foram diretamente colocados em meio BDA e incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12h até o início de crescimento das colônias.

Após o início do crescimento, colônias dos diferentes fungos foram transferidas para novas placas e submetidas a diferentes regimes de luz e temperatura, com o objetivo de se obter esporulação para as diferentes espécies em estudo. Colônias de *Phomopsis* spp. foram incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12h para a produção de picnídios e esporos (RUPE; FERRISS, 1990). *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. foram incubados a $\pm 25^\circ\text{C}$, sob luz contínua. *Cercospora kikuchii* e *Corynespora cassiicola* foram incubadas em luz negra próxima à ultravioleta (“NUV”) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ para a obtenção de esporos.

Após a esporulação, cada isolado foi submetido a culturas monospóricas, exceto os de *S. sclerotiorum*. Para a obtenção de culturas monospóricas, os topos das colônias em constante esporulação foram tocados por uma alça flambada, a qual foi utilizada para fazer estrias em novas placas de BDA e, posteriormente, os esporos individuais foram selecionados sob o microscópio com uma agulha esterilizada e transferidos para novas placas de BDA.

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram submetidos a culturas puras. Discos de micélio proveniente de bordas de colônias de *S. sclerotiorum* foram transferidos para meio BDA e após aproximadamente 18h de crescimento, com auxílio de uma agulha flambada, as extremidades das hifas foram transferidas para novas placas.

Após 3-5 dias, as colônias de cada isolado eram visíveis e, a partir delas foram retirados discos de micélio e armazenadas a -80°C em glicerol a 25%. Posteriormente também foi feito o armazenamento em papel de filtro seco em sílica gel. Os isolados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Todos os isolados coletados foram obtidos para serem utilizados na avaliação de especificidade e sensibilidade de iniciadores e sondas.

Tabela 4 - Relação de diferentes isolados obtidos a partir de sementes de soja infectadas

(continua)

Identificação	Gênero/espécie	Local de origem	Ano de isolamento
Col1	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Col2	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Col3	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Col4	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Col5	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Pho1	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2013
Pho2	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2013
Pho 3	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Pho 4	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Pho 5	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Fus1	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus2	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus3	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus4	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus5	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Cory1	<i>Corynespora cassiicola</i>	Desconhecido	2013
Cory2	<i>Corynespora cassiicola</i>	Desconhecido	2013
Cory 3	<i>Corynespora cassiicola</i>	Itararé-SP	2011
Ss1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Campos Novos-SC	2013
Ss2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Papanduva-SC	2013
Ss3	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Fraiburgo-SC	2013
Ss4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Água Doce-SC	2013
Ss5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	São Miguel do Passa Quatro-GO	2013

Tabela 4 - Relação de diferentes isolados obtidos a partir de sementes de soja infectadas
(conclusão)

Identificação	Gênero/espécie	Local de origem	Ano de isolamento
Alt1	<i>Alternaria</i> sp.	Matão-SP	2013
Alt2	<i>Alternaria</i> sp.	Matão-SP	2013
Alt3	<i>Alternaria</i> sp.	Matão-SP	2013

2.5.3 Extração do DNA dos isolados obtidos

Os isolados descritos na Tabela 4 foram cultivados em meio líquido semissintético descrito por Alfenas (1998). O micélio de cada isolado foi seco em papel filtro esterilizado, congelado a -80°C , liofilizado em liofilizador Modelo Alpha 2-4LD plus (CHIST®) e macerado com pistilo em microtubos de 1,5mL tipo Eppendorf. Foi feita a pesagem em balança analítica e 20mg do tecido liofilizado e macerado de cada isolado foi submetido à extração de DNA utilizando-se o kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI) seguindo o manual do fabricante.

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas por meio de leituras em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm e ajustado a uma concentração final de 10ng/ μL para as posteriores análises.

2.5.4 Avaliação da especificidade dos iniciadores e sondas obtidas para o método de detecção molecular

Após a síntese dos iniciadores e das sondas, foram otimizadas reações qPCR para a condução dos ensaios. Essas reações foram utilizadas para a avaliação da especificidade e sensibilidade desses iniciadores e sondas. Para isso, foi utilizado o termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. A reação de avaliação da especificidade foi feita a partir do DNA genômico dos diferentes isolados de cada espécie em estudo, bem como de isolados de outras espécies associadas à cultura da soja (Tabela 4). Além das espécies não alvo, foi utilizada água ultrapura esterilizada como controle negativo.

A qPCR foi realizada em volume total de 12 μL por reação, contendo 3 μL do DNA da amostra (a 10 ng/ μL), 0,83 μM de cada iniciador, 6 μL de Path-ID™ qPCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 0,2 μM da sonda TaqMan®. O termociclador foi programado para

um ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 52°C, 56°C e 60°C durante 60 segundos, para *C.truncatum*, *S.sclerotiorum* e *Phomopsis* spp., respectivamente.

A análise dos dados foi realizada com base no *Ciclo de Threshold* (C_T) ajustado manualmente na fase exponencial da amplificação, onde as curvas apresentavam-se paralelas. O valor do C_T de cada reação foi acessado utilizando-se o 7500 Software v 2.0.6 (Applied Biosystems). Reações com valores de $C_T \leq 45$ foram considerados positivos para a presença do DNA alvo.

2.5.5 Concentração de iniciadores para otimização da qPCR

A padronização da concentração dos iniciadores foi realizada com o objetivo de buscar as melhores condições de amplificação na qPCR. Para isso, foi utilizada amostra padrão de DNA de cada alvo e, foram realizadas reações de qPCR com diferentes concentrações de iniciadores. As concentrações de iniciadores utilizadas para cada alvo foram 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,3 μ M e 0,4 μ M, mantendo-se a mesma concentração da sonda e quantidade de Master Mix. As condições de ciclagem foram as mesmas descritas no item 2.5.4.

2.5.6 Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas

Os iniciadores e sondas que apresentaram especificidade foram submetidos ao teste de sensibilidade por meio de uma curva padrão. Isolados padrões de cada espécie em estudo foram utilizados para a construção de uma curva padrão com diluição seriada de oito vezes da concentração inicial de DNA (300 ng/ μ L a 30 fg/ μ L). Para cada nível de diluição, foram conduzidas três réplicas técnicas de qPCR para estabelecer as curvas de regressão linear entre o C_T e o logaritmo das concentrações de DNA genômico seriadas. As condições da qPCR foram as mesmas utilizadas para o teste de especificidade (item 2.5.4), modificando-se apenas as concentrações dos iniciadores para as mais adequadas, determinadas no item 2.5.5. Além de sua utilização para testar o nível de sensibilidade de iniciadores e sondas, a curva padrão também pode ser utilizada para quantificação das amostras testadas.

2.5.7 Avaliação da sensibilidade do método de detecção dos fungos em sementes de soja com os iniciadores selecionados

Para a avaliação da sensibilidade do método de detecção, sementes de soja da cultivar Pioneer 97R01 obtidas na safra 2013/2014, foram submetidas ao teste de sanidade de acordo com as Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009b). As sementes se apresentaram isentas dos patógenos em estudo, sendo consideradas sadias. Antes de serem inoculadas, essas sementes foram submetidas à desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos, enxaguadas com água destilada e, em seguida, secas sobre papel de filtro durante 48h em temperatura ambiente. A inoculação artificial das sementes com os diferentes fungos foi realizada por meio de metodologia desenvolvida em experimento preliminar (ANEXO B). Foram depositados discos de micélio de cada patógeno sobre BDA e incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12h. Quando as colônias de cada patógeno haviam atingido todo o diâmetro das placas, as sementes foram depositadas em camada única sobre a colônia e mantidas sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo durante 24h. Após esse período, as sementes foram removidas das placas e colocadas para secar sobre papel de filtro durante três dias em temperatura ambiente (ANEXO B). Posteriormente, foram colocadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria até a sua utilização para os experimentos posteriores (MACHADO et al., 2001).

As diluições para obtenção de diferentes concentrações de inóculo foram feitas misturando-se sementes inoculadas artificialmente com sementes sadias nas seguintes proporções (sementes inoculadas: sementes sadias) 1 : 399, 1 : 799, 1 : 1599, sendo consideradas como níveis de incidência 0,25%, 0,125% e 0,0625% respectivamente. A escolha dos níveis de diluição foi determinada em experimento realizado anteriormente, no qual se detectou *S. sclerotiorum* até o nível de incidência de 0,25% por meio de PCR convencional (GRABISCOSKI, 2012). Essas diluições foram feitas em triplicata para se testar a sensibilidade por meio de qPCR, utilizando-se dois métodos de obtenção de DNA e verificação da sanidade por meio de teste convencional, utilizando-se o método de incubação em meio semi-seletivo ágar azul de bromofenol (NEON) para *S. sclerotiorum* e *blotter test* para os demais fungos, para fins de comparação.

2.5.7.1 Maceração de sementes para extração de DNA

Para facilitar a moagem de sementes e, posteriormente, a extração de seus DNAs, a diluição de sementes, nas mesmas proporções descritas, foi feita por meio de pesagem de sementes inoculadas trituradas com sementes sadias trituradas. Para a obtenção do peso médio das sementes Pioneer 97R01 (safra 2013/2014), 10 porções de 400 sementes foram pesadas e, a partir do peso de cada porção, foram obtidos os pesos médios de 0,19g para uma semente e 76g para 400 sementes. Para alcançar as proporções de 0,25%, 0,125% e 0,0625%, os pesos de sementes trituradas (inoculadas : sadias) foram 0,19g : 75,81g, 0,095g : 75,905g e 0,0475g : 75,9525g respectivamente.

Sementes sadias, bem como as inoculadas, foram liofilizadas e trituradas em Moinho Desruptor/Pulverizador E Analise De DNA, marca MARCONI, modelo MA 2302/FIT. Este equipamento possui cápsulas de aço inoxidável individuais para processamento de cada amostra, as quais foram autoclavadas entre uma amostra e outra, de modo a excluir completamente a possibilidade de contaminações entre amostras. Em seguida, o DNA de cada amostra foi extraído com Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI).

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas por meio de leituras em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), o qual foi diluído a 10ng/μL para as análises posteriores.

2.5.7.2 Embebição de sementes em água ultrapura

Sementes inoculadas nas proporções descritas no item 2.5.7 foram colocadas em frascos fechados com água ultrapura Milli-Q esterilizada na proporção de 100 sementes/100mL de água e mantidas a 20°C±2 durante quatro horas. Desse líquido, foram retiradas alíquotas de 1 mL e armazenadas a -20°C. Os frascos foram agitados durante 10 segundos antes da coleta das alíquotas (GRABICOSKI, 2012; JACCOUD FILHO et al., 2002).

2.5.7.3 qPCR para avaliação da sensibilidade de iniciadores e sondas obtidas

O DNA extraído de cada amostra inoculada (item 2.5.7.1) e as alíquotas obtidas de sementes embebidas em água ultrapura (item 2.5.7.2) com diferentes potenciais de inóculo,

foram submetidos à qPCR sob as mesmas condições utilizadas para o teste de especificidade (item 2.5.4). A quantificação do produto de amplificação foi realizada utilizando-se a técnica da curva padrão, com base na curva construída, descrita no item 2.5.5. Como controle positivo, foi utilizado o DNA puro de cada fungo alvo e sementes 100% inoculadas e, como controle negativo, sementes sadias e água ultrapura estéril.

2.5.7.4 Método do papel de filtro (*blotter test*) para a detecção dos fungos em estudo, exceto *S. sclerotiorum*

As sementes foram colocadas em placas de Petri contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas, embebidas em água destilada. As sementes foram dispostas de forma equidistante, em número de dez por placa. Em seguida, os recipientes contendo as sementes foram incubados em ambiente controlado, com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob regime de 12 h. O objetivo da utilização da luz foi de estimular a esporulação da maioria dos fungos. Após um período de incubação de sete dias, as sementes foram examinadas uma a uma, sob microscópio estereoscópico e os micro-organismos foram identificados com base na esporulação dos fungos e ou, na presença de estruturas reprodutivas típicas de cada espécie em estudo. Para cada amostra, foram utilizadas 400 sementes tomadas ao acaso. O resultado do teste foi expresso em percentagem de cada fungo detectado (BRASIL, 2009b).

2.5.7.5 Método do meio semi-seletivo ágar-azul de bromofenol (NEON) para a detecção de *S. sclerotiorum*

Neste método, as sementes de soja foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos e lavadas duas vezes em água destilada. Posteriormente, essas sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio ágar-azul de bromofenol, dispostas de forma equidistante, em número de 10 por placa. O meio foi preparado com BDA Difco®, com 150 ppm de sulfato de estreptomicina, 150 ppm de penicilina G e 150 ppm de azul de bromofenol. Esses compostos foram adicionados ao meio após autoclavagem, quando este atingiu a temperatura de aproximadamente 50°C . Alguns autores sugerem o ajuste de pH do meio para 4,7 com HCl ou NaOH, com o objetivo de facilitar a detecção durante a formação do halo amarelado em torno das sementes infectadas com *S. sclerotiorum* (NASSER; BOLAND; SUTTON, 1995; PERES; NASSER; MACHADO, 2002). Porém, Napoleão et al. (2006), ao testar a velocidade de formação do halo amarelo de sementes infectadas com *S.*

sclerotiorum, verificou que a velocidade de sua formação não diferiu estatisticamente em função do ajuste de pH do meio, dispensando assim esta etapa de preparação.

Após a transferência das sementes para o meio de cultivo previamente descrito, as mesmas foram incubadas em câmara sob temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante oito dias, no escuro. A partir do terceiro dia de incubação, iniciou-se a avaliação por meio da verificação da formação de halos amarelo avermelhados ao redor das sementes para a confirmação da presença de *S. sclerotiorum*. As placas que mostraram mudança de cor foram analisadas sob microscópio estereoscópico para avaliar o crescimento de micélio típico e a presença de escleródios de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009b).

2.5.8 Desenvolvimento de uma qPCR multiplex com os iniciadores e sondas obtidos

Após serem testados quanto à especificidade e sensibilidade, os iniciadores específicos de diferentes fungos foram submetidos a reações qPCR multiplex, com o objetivo de reduzir o número de reações a serem realizadas na detecção dos diferentes patógenos. Dois pares de iniciadores e duas sondas foram utilizados no preparo dessas reações multiplex. Para a primeira reação multiplex, foram utilizadas amostras de DNA de cinco isolados de cada um dos dois fungos alvos separadamente, bem como a mistura do DNA em proporções equivalentes de cada isolado. Para que todas as amostras de DNA tivessem a mesma concentração da amostra com os DNAs misturados, foi realizada uma diluição pela metade das amostras que não foram submetidas à mistura ($5\text{ng}/\mu\text{L}$). As condições de ciclagem foram as mesmas descritas no item 2.5.4, alterando-se somente a temperatura de anelamento para a menor entre os iniciadores utilizados na reação multiplex.

2.5.8.1 Concentração de iniciadores para otimização de qPCR multiplex

Para determinar a concentração de iniciadores mais adequada para a qPCR multiplex, várias concentrações desses iniciadores foram testadas. Para isso, foi utilizada uma amostra padrão de DNA alvo, sendo realizadas reações de qPCR multiplex com diferentes concentrações de iniciadores. As concentrações de iniciadores utilizadas para cada alvo, assim como para a mistura de dois alvos, foram $0,1\mu\text{M}$, $0,2\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$ e $0,4\mu\text{M}$, mantendo-se a mesma concentração da sonda e quantidade de Master Mix.

2.5.9 Detecção de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja de amostras naturalmente infectadas

Para a confirmação da eficácia do método molecular desenvolvido, amostras médias de lotes de sementes provenientes dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná (safra 2013/14) foram enviadas ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola (LFN) da ESALQ – USP e submetidas a testes de sanidade para a determinação da ocorrência dos fungos *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis* spp., *Corynespora cassiicola* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Cinco amostras de sementes provenientes de cada local foram selecionadas para os testes de sanidade. De cada amostra de 1kg, 400 sementes foram submetidas ao teste de sanidade pelo método do papel de filtro (descrito no item 2.5.7.4), 400 sementes foram submetidas ao método do meio semi seletivo ágar-azul de bromofenol (descrito no item 2.5.7.5) e 400 sementes foram submetidas a extração de DNA para, em caso comprovada a eficiência do método, serem submetidas à qPCR. Os testes de sanidade por meio do papel de filtro e do meio semi seletivo ágar-azul de bromofenol foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do LFN e as reações de PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do LFN.

2.5.9.1 Detecção fungos fitopatogênicos por meio da qPCR

As amostras de sementes de soja foram homogeneizadas e delas foram retiradas 400 sementes para o teste molecular de detecção dos patógenos em estudo. As sementes foram submetidas a um dos métodos de obtenção do DNA selecionados (item 2.5.7.1 e item 2.5.7.2) e submetidas à qPCR sob as mesmas condições descritas no item 2.5.4. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de um isolado padrão de cada fungo em estudo e, para controle negativo, DNA de sementes sadias e água ultrapura esterilizada. A quantificação foi realizada utilizando a técnica da curva padrão, com diluição seriada de oito vezes (300 ng a 30 fg) de DNA genômico de isolados padrões de cada espécie em estudo. Para cada amostra, foram conduzidas três réplicas técnicas de qPCR para estabelecer a curva de regressão linear entre o valor de C_T e o logaritmo da concentração do DNA da amostra. Para determinar a incidência de cada patógeno em 400 sementes, foi utilizado um valor padrão de referência determinado pelo teste de sensibilidade do método de obtenção do DNA dos patógenos alvos. Esse valor padrão de referência foi o de 0,25% de incidência (correspondente a uma semente inoculada em um total de 400 sementes). A quantidade de DNA detectado em nanogramas nessa

proporção foi utilizada para calcular o número de sementes infectadas nas amostras e, posteriormente, a porcentagem de incidência de sementes infectadas.

2.6 Resultados e Discussão

2.6.1 Avaliação da especificidade dos iniciadores e sondas obtidas

Foi observada especificidade dos iniciadores e sondas de *Phomopsis* spp e *S. sclerotiorum*. No entanto, os iniciadores e sonda de *C. truncatum* não apresentaram especificidade para os isolados da espécie testados. Os resultados da avaliação da especificidade dos iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp., dos iniciadores TYF/TYR e sonda TYP de *S. sclerotiorum* e dos iniciadores Colg1/CT2 e sonda CTP de *C. truncatum* encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Especificidade dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® utilizadas nos ensaios para a detecção e quantificação de *Phomopsis* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* (continua)

	Valores de C _T ^a		
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp	Iniciadores e sonda de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i>	Iniciadores e sonda de <i>C.</i> <i>truncatum</i>
<i>C. truncatum</i>			
Col1	> 45 ± 0 ^b	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Col2	> 45 ± 0	> 45 ± 0	26,26 ± 1,46
Col3	> 45 ± 0	> 45 ± 0	31,43 ± 5,52
Col4	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Col5	> 45 ± 0	> 45 ± 0	24,45 ± 4,47
<i>Phomopsis</i> spp.			
Pho1	31,91 ± 0,68	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Pho2	34,12 ± 1,39	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Pho 3	30,21 ± 0,88	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Pho 4	34,38 ± 0,65	> 45 ± 0	> 45 ± 0

Tabela 5 - Especificidade dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® utilizadas nos ensaios para a detecção e quantificação de *Phomopsis* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* (conclusão)

	Valores de C _T ^a		
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>	Iniciadores e sonda de <i>C. truncatum</i>
Pho 5	29,64 ± 1.26	> 45 ± 0	> 45 ± 0
<i>S. sclerotiorum</i>			
Ss1	> 45 ± 0	30,31 ± 0,78	> 45 ± 0
Ss2	> 45 ± 0	32,71 ± 1,07	> 45 ± 0
Ss3	> 45 ± 0	33,22 ± 1,35	> 45 ± 0
Ss4	> 45 ± 0	30,82 ± 0,97	> 45 ± 0
Ss5	> 45 ± 0	33,49 ± 1,89	> 45 ± 0
Outras espécies ^c			
Fus1	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Fus2	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Fus3	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Fus4	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Fus5	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Cory1	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Cory2	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Cory 3	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Alt1	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Alt2	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Alt3	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0
Controle negativo	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0

^a Valores apresentados representam a média de três repetições ± Erro padrão

^b Valores de C_T>45 indicam que nenhuma fluorescência foi detectada até 45 ciclos de amplificação, quando testada uma concentração inicial de 30ng de DNA

^c Outras espécies de fungos fitopatogênicos listadas na Tabela 4

Para os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P, os resultados da qPCR mostraram a amplificação de 30ng de DNA dos isolados Pho1, Pho2, Pho3, Pho4 e Pho5 de *Phomopsis* spp., cujos valores de C_T variaram entre 29,64 e 34,38 (Tabela 5). Esses iniciadores e sua respectiva sonda não apresentaram amplificação para 30ng de DNA dos demais isolados testados. Sendo assim, foi observada especificidade dos iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P para os isolados de *Phomopsis* spp., confirmando sua potencial utilidade nos ensaios de detecção e quantificação de *Phomopsis* spp. em sementes de soja.

Para os iniciadores TYF/TYR e sonda TYP, os resultados da qPCR mostraram a amplificação de 30ng do DNA dos isolados Ss1, Ss2, Ss3, Ss4 e Ss5 de *S. sclerotiorum*, cujos valores de C_T variaram entre 30,31 e 33,49 (Tabela 5). Nenhuma amplificação foi observada em 30ng do DNA de cada um dos demais isolados testados. Foi observada especificidade dos iniciadores TYF/TYR e sonda TYP para os isolados de *S. sclerotiorum*, confirmando também sua potencial utilidade nos ensaios de detecção e quantificação de *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

Apenas o DNA dos isolados Col2, Col3 e Col5 de *C. truncatum* amplificaram com os iniciadores Colg1/CT2 e sonda CTP, com uma variação de valores de C_T entre 24,45 e 31,43. Não houve amplificação do DNA dos isolados Col1 e Col4 de *C. truncatum* bem como dos demais isolados testados. Podem-se observar também altos valores de erro padrão (Tabela 5) de Col3 e Col5 (5,52 e 4,47 respectivamente), devido à grande diferença dos valores de C_T entre as repetições. Esses resultados indicam a pouca eficiência desses iniciadores e sonda na amplificação do DNA alvo, inviabilizando sua potencial utilidade para os ensaios de detecção e quantificação de *C. truncatum* em sementes de soja.

A especificidade dos iniciadores e sondas é atribuída à capacidade do método de detectar o alvo desejado, ao mesmo tempo em que não detecta alvos indesejáveis. Em outras palavras, refere-se à especificidade da proporção de amostras negativas que estejam corretamente identificadas como negativas, incluindo outros organismos ou sequências não alvo. Por exemplo, na detecção de organismos infecciosos, a especificidade seria analisada testando se o método detecta apenas as espécies desejadas. Se o ensaio proporciona um resultado positivo com um organismo não alvo, ocorreu um falso positivo (BURSTIN et al., 2009; GUNDY; POULSON, 2011).

No caso dos iniciadores Colg1/CT2 e sonda CTP de *C. truncatum*, não se observou a ocorrência de falso positivos, mas sim de falsos negativos, ou seja, a não amplificação de DNA de amostras alvos, o que determina a baixa eficiência de especificidade desses iniciadores e sonda.

Portanto, apenas apresentaram-se específicos os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp. e os iniciadores TYF/TYR e sonda TYP de *S. sclerotiorum*. Os resultados posteriormente apresentados estão baseados nas análises realizadas com esses iniciadores e sondas que foram considerados específicos aos respectivos patógenos alvos.

2.6.2 Concentração de iniciadores para otimização da qPCR

Das concentrações de iniciadores testadas, a que se adequou melhor para *Phomopsis* spp. foi de 0,4 μ M e, para *S. sclerotiorum* foi de 0,2 μ M, pois essas foram as menores concentrações pelas quais obteve-se o maior nível de amplificação. Estas concentrações apresentaram os valores de C_T mais baixos quando comparadas com as outras concentrações testadas, sendo $C_T = 27,78$ para *Phomopsis* spp. e $C_T = 27,50$ para *S. sclerotiorum* (Tabela 6). Os DNAs alvos utilizados nessas reações foram obtidos dos isolados Pho 3 e Ss 4 de *Phomopsis* spp e *S. sclerotiorum*, respectivamente.

Tabela 66 - Valores de C_T para as diferentes concentrações de iniciadores de *Phomopsis* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Isolado	Espécie	Valor de C_T^a para cada concentração e iniciador			
		0,1 μ M	0,2 μ M	0,3 μ M	0,4 μ M
Pho 3	<i>Phomopsis</i> spp.	34,18 $\pm$ 0,6	31,47 $\pm$ 0,82	30,94 $\pm$ 0,57	27,78 $\pm$ 0,63
Ss 4	<i>S. sclerotiorum</i>	28,96 $\pm$ 0,36	27,50 $\pm$ 0,15	31,07 $\pm$ 0,65	28,37 $\pm$ 0,11

^a Valores apresentados representam a média de três repetições $\pm$ Erro padrão

2.6.3 Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas

Os resultados de qPCR com base nas diluições seriadas do DNA do isolado Pho 3 de *Phomopsis* spp. mostrou que a amplificação com os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P ocorreu até a concentração de 300 fg de DNA, com um valor de $C_T = 42,82$. A curva padrão foi calculada com base em três réplicas de cada nível de diluição de DNA e demonstrou linearidade ($y = -4,4936 \text{ Log}(x) + 27,24$, $R^2 = 0,9969$) para as diferentes concentrações (Figura 2A). A eficiência de amplificação nessa reação foi de 66,93%. A amplificação das diluições seriadas do DNA do isolado Ss 4 de *S. sclerotiorum* com os iniciadores TYF/TYR e sonda TYP também ocorreu até 300 fg de DNA, com um valor de $C_T = 40,86$. A curva padrão, calculada com base em três réplicas técnicas de cada nível de diluição de DNA, também demonstrou linearidade ($y = -3,1703 \text{ Log}(x) + 30,3227$, $R^2 = 0,9911$)

para as diferentes concentrações (Figura 2B). A eficiência de amplificação nessa reação foi de 106,74%.

Figura 2 - Curva padrão dos valores de C_T calculada a partir das diluições seriadas do DNA do isolado Pho 3 da *Phomopsis* spp. (A) e do isolado Ss 4 de *Sclerotinia sclerotiorum* (B)

Uma reação de PCR 100% eficiente, o que equivale a uma inclinação de -3,32, representa a quantidade de produto que é duplicado em cada ciclo durante a amplificação exponencial. Uma inclinação calculada entre -3,58 e -3,10, corresponde a valores de eficiência de 90% a 110%, respectivamente, que é, geralmente, considerado um intervalo aceitável para uma curva padrão em qPCR. No entanto, para obter resultados precisos e reprodutíveis, as reações devem ter eficiência o mais próximo possível de 100% (KAVANAGH; JONES; NAYABY, 2011). A eficiência das reações de amplificação

depende de diversos fatores, tais como: precisão nas pipetagens, qualidade e integridade das amostras, desenho dos iniciadores, condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos iniciadores), qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Condições específicas para cada experimento devem ser padronizadas (KAVANAGH; JONES; NAYABY, 2011; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp. apresentaram uma curva com baixa eficiência (66,93%), portanto a quantidade de DNA a ser determinada por essa curva, pode não ser exata. Como esses iniciadores foram projetados para identificar simultaneamente as espécies *Phomopsis longicolla*, *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (ZHANG et al. , 1999), a ausência de especificidade pode ser um dos fatores que está interferindo na eficiência da curva. Nesse caso, a quantificação de *Phomopsis* spp. neste trabalho, por meio de qPCR, pode sofrer interferência na exatidão dos resultados em decorrência da baixa eficiência da curva.

No caso dos iniciadores TYF/TYR e sonda TYP de *S. sclerotiorum*, a eficiência de amplificação de 106,74% está dentro de um intervalo aceitável (90% a 110%), sendo adequada para a quantificação do DNA alvo das amostras com maior exatidão.

O coeficiente de correlação de linha ou o valor de R^2 é medida de quão bem os dados ajustam-se à curva padrão, que deve, idealmente, ser igual a 1. Entretanto, na maioria dos casos, demonstra repetitividade suficiente de uma curva padrão se for maior do que 0,985. O valor de R^2 é influenciado pela precisão da pipetagem e pelo número de diluições da curva (KAVANAGH; JONES; NAYABY, 2011). Ambos os conjuntos de iniciadores e sonda, dos dois patógenos alvos, apresentaram precisão nas curvas, pois atingiram um valor de R^2 acima de 0,985 até o limite de detecção de 300 fg. O ultimo valor testado (30 fg) foi excluído da curva, pois nenhum dos conjuntos de iniciadores e sonda atingiu esse limite de detecção.

As concentrações escolhidas para a curva padrão devem abranger a gama de concentrações esperadas do alvo nas amostras experimentais (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). No caso de detecção de patógenos, deve-se escolher uma gama de concentrações em função do nível de infecção esperado. No caso de uma alta porcentagem de infecção, devem-se incluir altas concentrações de DNA.

Os valores de C_T para cada diluição seriada de cada isolado alvo apresentam-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de C_T de diluições seriadas do DNA de isolados de *Phomopsis* spp. e de *Sclerotinia sclerotiorum*

Quantidade de DNA de cada isolado	Valores de C_T ^a	
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> sp.	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>
3×10^2 ng (300 ng)	16,47±0,26	21,94±0,32
3×10^1 ng (30ng)	20,86±0,23	25,35±0,91
3×10^0 ng (3ng)	24,24±0,34	29,42±0,58
3×10^{-1} ng (300 pg)	29,43±0,09	32,10±0,13
3×10^{-2} ng (30 pg)	33,88±0,18	36,26±2,39
3×10^{-3} ng (3 pg)	39,43±0,06	37,95±0,45
3×10^{-4} ng (300 fg)	42,82± 0,10	40,86±1,34
3×10^{-5} ng (30 fg)	> 45 ± 0	> 45 ± 0

^a Valores apresentados representam a média de três repetições ± Erro padrão

2.6.4 Avaliação da sensibilidade do método de detecção dos fungos em sementes de soja com os iniciadores e sondas selecionados

A avaliação da sensibilidade do método de detecção, utilizando-se os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp. e os iniciadores TYF/TYR e sonda TYP de *S. sclerotiorum*, inicialmente testada com DNA extraído de sementes artificialmente inoculadas com diferentes concentrações de inóculo (item 2.5.7.1), não foi bem sucedida. Não houve amplificação de DNA alvo em nenhum dos níveis de potencial de inóculo, nem mesmo das sementes com 100% de incidência do patógeno, para ambos os patógenos alvos. Motivo pelo qual um novo método, o da embebição de sementes em água (item 2.5.7.2) foi testado.

Vários métodos de extração baseados em sementes maceradas já foram relatados (BARROCAS et al., 2012; BOTELHO, 2011; SOUSA et al., 2014). Sousa et al. (2014) utilizaram um moinho de café para moer sementes de feijão em estudos de detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por meio de qPCR. E esse método foi considerado pelos autores como essencial na obtenção de DNA dos patógenos estudados para os testes. No entanto, os mesmos autores testaram previamente métodos de moagem, os quais não foram eficazes na obtenção do DNA dos patógenos. Diante dos fatos apresentados neste trabalho, assim como dos fatos mencionados por Sousa et al. (2014), o insucesso do método de extração por meio de sementes maceradas pode ser atribuído à presença de inibidores de PCR nesses extratos obtidos de sementes maceradas. Inibidores de PCR são comumente

encontrados em DNA extraídos de sementes (MA; MICHAILIDES, 2007; PRYOR; GILBERTSON, 2001; WALCOTT et al., 2004) e podem interferir nas reações durante o processo de amplificação de DNA. Diante disso, uma alternativa para obtenção do DNA das amostras foi testada, através da embebição de sementes de soja em água ultrapura estéril. Esse método de obtenção de DNA vem sendo testado por alguns autores (GRABICOSKI, 2012; JACCOUD FILHO et al., 2002). A partir desse método, Grabicoski (2012) conseguiu detectar *S. sclerotiorum* até o nível de 0,25% de incidência em sementes de soja por meio de PCR convencional.

O método de detecção do DNA dos fungos das sementes embebidas em água ultrapura permitiu aos iniciadores e sonda de *Phomopsis* spp. detectarem seu DNA alvo até o nível de incidência de 0,0625% de sementes artificialmente inoculadas, que corresponde a uma semente inoculada para um total de 1600 sementes. Iniciadores e sonda de *S. sclerotiorum* foram capazes detectar o patógeno até o nível de incidência de 0,25% de sementes inoculadas (uma semente inoculada para um total de 400 sementes) (Tabela 8).

Tabela 8 - Sensibilidade do método de detecção, por meio da obtenção de DNA de amostras embebidas em água ultrapura, utilizando iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® de *Phomopsis* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Incidência de sementes artificialmente inoculadas (%)	Sementes artificialmente inoculadas/total de sementes	Valores de C_T^a	
		Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp.	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>
100	400/400	32,36 ± 0,02	38,04 ± 2,22
0,25	1/400	41,27 ± 2,31	42,24 ± 1,70
0,125	1/800	41,75 ± 1,15	> 45 ± 0
0,0625	1/1600	42,32 ± 1,27	> 45 ± 0
0,0	0/400	> 45 ± 0 ^b	> 45 ± 0

^aValores apresentados representam a média de três repetições ± Erro padrão

^b>45 – Nenhuma fluorescência foi detectada até 45 ciclos de amplificação

O teste de sensibilidade do método em níveis menores do que 0,25% permite determinar níveis de incidência dos patógenos em sementes pelos quais os métodos tradicionais não determinariam.

A quantidade do DNA de cada patógeno, obtida pela curva padrão, em cada nível de incidência nas sementes encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Quantificação do DNA de *Phomopsis* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes em diferentes níveis de incidência de cada fungo pelo método da curva padrão

Incidência de sementes artificialmente inoculadas (%)	Sementes artificialmente inoculadas/total de sementes	Quantidade de DNA ^a	
		<i>Phomopsis</i> spp.	<i>S. sclerotiorum</i>
100	400/400	72,42 pg	3,70 pg
0,25	1/400	753,43 fg	175 fg
0,125	1/800	591,16 fg	-
0,0625	1/1600	44,43 fg	-
0,0	0/400	-	-

^a Dados representam a quantidade de DNA detectada em amostras (alíquotas) de 3µL retirada de sementes embebidas em água em cada nível de incidência

Essa alta sensibilidade proporcionada pelo método da obtenção de DNA por embebição de sementes em água ultrapura demonstra sua viabilidade na detecção de patógenos em sementes por meio de qPCR.

Os métodos de detecção tradicionais, tanto o *blotter test* como o do meio semi seletivo ágar azul de bromofenol, confirmaram a eficiência das porcentagens de diluições das sementes. Somente as sementes artificialmente inoculadas apresentaram estruturas típicas de *Phomopsis* sp. (picnídios e esporulação) ao serem observadas sob microscópio estereoscópio pelo método *blotter test*, na proporção de 1:399, 1:799, 1:599 (semente inoculada: semente sadias). Por meio do método do meio semi seletivo ágar-azul de bromofenol, apenas as sementes inoculadas artificialmente com *S. sclerotiorum* foram identificadas com a formação do halo amarelo avermelhado após dois dias da instalação do experimento, apresentando micélio típico do fungo na proporção de 1:399, 1:799, 1:599 (semente inoculada: semente sadias). Após quatro dias, quando a colônia atingiu toda a placa, observou-se presença de escleródios.

2.6.5 Desenvolvimento de uma qPCR multiplex com os iniciadores e sondas obtidos

A qPCR multiplex testada não foi bem sucedida. Nas reações em que foram incluídos ambos os DNAs alvos, de *Phomopsis* spp. e de *S. sclerotiorum*, apenas os iniciadores PL-5 F/ PL-5 R e sonda PL-5 P de *Phomopsis* spp. amplificaram o patógeno alvo (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de C_T s da qPCR multiplex com os iniciadores e sondas de *Phomopsis* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

	Valores de C_T ^a	
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>
<i>Phomopsis</i> spp. / <i>S. sclerotiorum</i>		
Pho1/ Ss1	27,97± 0,66	> 45 ± 0
Pho2/ Ss2	30,15± 1,07	> 45 ± 0
Pho 3/ Ss3	27,30± 0,20	> 45 ± 0
Pho 4/ Ss4	30,85± 0,05	> 45 ± 0
Pho 5/ Ss5	26,79± 0,25	> 45 ± 0

^a Valores apresentados representam a média de três repetições ± Erro padrão^b >45 – Nenhuma fluorescência foi detectada até 45 ciclos de amplificação

Uma segunda tentativa de qPCR multiplex foi realizada (item 2.5.8.1) com diferentes concentrações de iniciadores e, mais uma vez, houve amplificação apenas para *Phomopsis* spp (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de C_T da qPCR multiplex para as diferentes concentrações de iniciadores de *Phomopsis* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Isolado	Iniciadores e sonda	Valor de C_T ^a para cada concentração e iniciador			
		0,1 µM	0,2 µM	0,3 µM	0,4 µM
Pho 3/Ss 4	<i>Phomopsis</i> spp.	39,06 ± 0,93	33,45 ± 1,77	27,83 ± 2,43	29,48 ± 2,37
Pho3/Ss 4	<i>S. sclerotiorum</i>	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0	> 45 ± 0

^a Valores apresentados representam a média de três repetições ± Erro padrão^b >45 – Nenhuma fluorescência foi detectada até 45 ciclos de amplificação

Diante dos resultados apresentados, a qPCR multiplex testada não pôde ser utilizada em análises posteriores.

2.6.6 Detecção de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja de amostras naturalmente infectadas

Embora o método de detecção por meio de qPCR tenha apresentado sucesso apenas para *Phomopsis* spp e *S. sclerotiorum* nos testes de especificidade e sensibilidade, na

detecção pelos métodos tradicionais (*blotter test* e meio semi-seletivo ágar azul de bromofenol) foi observada e registrada a presença ou não de cada um dos fungos inicialmente propostos: *Phomopsis* spp. *C. truncatum*, *C. cassiicola* e *S. sclerotiorum*. Apenas *Phomopsis* spp. e *C. truncatum* estiveram presentes nas amostras quando analisadas por esses métodos de detecção, porém ambos os fungos foram detectados com baixíssima incidência, não chegando a 7% para nenhum desses fungos (Figura 3).

Figura 3 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola* e *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), reveladas por meio do *blotter test* e meio NEON

As cinco amostras de sementes de soja provenientes de cada Estado foram designadas como A1, A2, A3, A4, A5; B1, B2, B3, B4, B5; e C1, C2, C3, C4; C5 para Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente. A não identificação das amostras pelo nome da cultivar se deu devido a um acordo de confidencialidade estabelecido com as empresas/instituições e/ou produtores que forneceram as amostras de sementes.

O nível máximo de incidência de *C. truncatum* nas amostras de Goiás foi de 0,5% na amostra A1 e de *Phomopsis* spp., de 0,25% na amostra A3. Nas amostras de Minas Gerais, a máxima incidência de *C. truncatum* foi na amostra B2, com 0,5% e, de *Phomopsis* spp., 2,75% na amostra B5. Das amostras analisadas do Estado do Paraná, a maior incidência de *C. truncatum* foi na amostra C4 com 6,5% e de *Phomopsis* spp., na amostra C5 com 0,5%. *S. sclerotiorum* e *C. cassiicola* tiveram 0% de incidência em todas as amostras testadas das diferentes localidades.

Esses dados mostram o alto nível de sanidade das amostras testadas dos diferentes Estados, utilizando-se os métodos tradicionais de detecção. Porém, para fins de comparação com o novo método molecular de detecção, as mesmas amostras foram submetidas à qPCR. Mesmo com alto nível de sanidade, o novo método molecular, ao ser testado, comprovaria sua eficácia caso conseguisse detectar os patógenos de baixa incidência ou até mesmo os que não foram detectados nas amostras pelos métodos tradicionais.

2.6.6.1 Detecção por meio de qPCR

Como a tentativa de desenvolvimento de uma qPCR multiplex não foi bem sucedida, as mesmas amostras submetidas aos métodos de detecção tradicionais foram submetidas a qPCR para detecção, em reações separadas, de cada patógeno alvo, *Phomopsis* spp. e *S. sclerotiorum*. O método de obtenção de DNA utilizado foi o de embebição de sementes de soja em água ultrapura esterilizada.

Nenhuma amplificação foi observada nas amostras submetidas à detecção de *S. sclerotiorum* por meio de qPCR com os iniciadores TYF/TYR e sonda TYP, concordando com os resultados obtidos por meio do método do meio semi-seletivo ágar azul de bromofenol. Diante dessa constatação, pode-se afirmar que as amostras de sementes de soja submetidas aos testes estavam livres desse patógeno.

Por meio de qPCR, foi possível detectar *Phomopsis* spp. em todas as amostras testadas, mesmo que ainda com baixa incidência, mais uma vez comprovando o alto nível de sanidade das amostras testadas. Entretanto, os níveis de infecção detectados por qPCR foram maiores do que os detectados por meio de métodos tradicionais, chegando a 6,75%.

O valor padrão de referência 753,43 fg de DNA, que foi detectado em 0,25% de incidência (uma semente inoculada em 400 sementes) (Tabela 9), foi utilizado para calcular a porcentagem de sementes infectadas com *Phomopsis* spp. em cada amostra. A porcentagem

de incidência de *Phomopsis* spp. nas amostras submetidas aos método de detecção por meio de qPCR, assim como por *blotter test* estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), avaliadas por dois métodos de detecção, qPCR e *blotter test*

Os resultados apresentados na Figura 4 evidenciaram que o método de detecção por meio de qPCR foi mais sensível do que o método tradicional de detecção *blotter test*, pois detectou *Phomopsis* spp. em amostras nas quais o patógeno não havia sido detectado pelo método tradicionalmente utilizado e, nas que havia sido detectado, conseguiu revelar índices mais altos de incidência. Recentemente, estudos com outros patossistemas têm mostrado que detecção por meio de qPCR é mais precisa, mais sensível e mais rápida quando comparada aos métodos tradicionais de detecção (CHEN et al., 2013; SOUSA et al., 2014). O tempo que se levaria para realizar um *blotter test* (mínimo de sete dias) pode ser substituído por algumas horas ao se utilizar qPCR. Sendo assim, qPCR seria uma alternativa viável para utilização como método atual de detecção de patógenos em sementes, podendo ser incorporado aos métodos oficiais de detecção e utilizados por laboratórios de diagnose certificados (GANCHON et al., 2004; MUNKVOLD, 2009). Além disso, um grande número de amostras

pode ser processado dentro de curto período de tempo e isso pode ser convenientemente aplicado aos ensaios de sementes comerciais e certificação (MBOFUNG; PRYOR, 2010; SOUSA et al., 2014).

Embora ainda não tenha sido estabelecido um padrão de sanidade de sementes de soja, estudos que envolvam a quantificação de patógenos nessas sementes são importantes para que o produtor tenha conhecimento do nível de infecção das sementes que está sendo utilizada em sua lavoura. Para os patógenos transmissíveis por sementes, o risco de um surto de doença geralmente depende da quantidade de inóculo nas sementes (MUNKVOLD, 2009; SOUSA et al., 2014). Por conseguinte, um ensaio para determinar a quantidade de DNA do patógeno em testes de sanidade de sementes é desejável para que se tenha o conhecimento do nível de infecção real do lote de sementes, e isso pode ser efetivamente alcançado por meio de qPCR (GLYNN; EDWARDS, 2010; SOUSA et al., 2014).

Em alguns casos, a simples detecção, sem a necessidade de quantificação, já é suficiente no que diz respeito à sanidade de sementes. Alguns patógenos, como por exemplo, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, categorizado como praga quarentenária devido à sua natureza epidemiológica, tem recebido proposição de tolerância zero no que diz respeito à sua presença em amostras de sementes de soja submetidas à análise sanitária pelos programas de certificação de qualidade (BOTELHO, 2011; MACHADO; POZZA, 2005).

Segundo Camargo (2013), devido à baixa incidência do patógeno em sementes naturalmente infectadas, a quantidade de 400 sementes recomendada atualmente para testes de sanidade de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009b), não é adequada para detectar o fungo com confiabilidade, havendo a necessidade de utilizar maior número de sementes. O uso de maior número de sementes dificultaria ainda mais a condução dos testes de sanidade atualmente utilizados, aumentando o tempo de instalação e de avaliação dos testes e a necessidade de maior espaço em laboratórios e/ou câmaras de incubação. O método de detecção por meio de qPCR poderia ser uma alternativa para essa problemática, já que pode proporcionar maior sensibilidade quando comparado com testes tradicionais de detecção. O uso de conjuntos específicos de iniciadores e sonda poderá se tornar essencial para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja de maneira sensível e eficiente.

A correta identificação de fungos em sementes de soja terá uma importância especial para os laboratórios de diagnóstico e para os produtores. Além disso, o uso de métodos mais rápidos e mais sensíveis será essencial para a detecção do agente patogênico nas sementes, antes mesmo da sua entrada na área, evitando assim a introdução e disseminação da doença na cultura.

O crescente volume de artigos publicados demonstra a utilidade da qPCR aplicada à área microbiológica. A elevada sensibilidade e especificidade, associada a um curto tempo de obtenção dos resultados e facilidade de realização da técnica, tem feito da qPCR uma metodologia atrativa na substituição de métodos tradicionais e de ensaios baseados em antígenos (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). Entretanto, existem limitações no uso da qPCR aplicada à microbiologia. Em contraposição aos métodos tradicionais, esta técnica é baseada na amplificação de DNA e, portanto, não diferencia entre patógenos vivos e mortos (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). A associação de ambas as técnicas seria uma alternativa viável para a situação apresentada. A qPCR funcionaria como uma triagem para um grande volume de amostras e, posteriormente, o método tradicional seria aplicado apenas às amostras positivas na qPCR, para teste de viabilidade do patógeno alvo.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O desenvolvimento de novos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® para os diferentes fungos fitopatogênicos frequentemente encontrados em sementes de soja no Brasil não foi bem sucedido;
- Na avaliação de iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® já existentes na literatura, apenas iniciadores de *Phomopsis* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* apresentaram eficiência quanto a sensibilidade e especificidade para detecção de patógenos associados às sementes de soja;
- Não foi possível desenvolver uma qPCR multiplex a partir dos iniciadores e sondas obtidas para detecção desses fungos em sementes de soja;
- Comparando-se a qPCR com os métodos tradicionais de detecção, a primeira mostrou-se mais rápida, mais sensível e específica na detecção de *Phomopsis* spp. *S. sclerotiorum* em sementes de soja.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J.R.; ALONSO, S.K. de; SCORTCHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 151-182.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo; Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 64, p. 569-588.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, p. 403-410, 1990.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments**. Foster City, 2010.
- ATALLAH, Z.K., BAE, J., JANSKY, S.H., ROUSE, D.I.; STEVENSON, W.R. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium wilt*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 865-872, 2007.
- AVOZANI, A.; FERREIRA, A.S. Mancha-alvo da soja. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças da soja**: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 151-164.
- BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; MIRELLA FIGUEIRÓ DE ALMEIDA, M.F.; BOTELHO, L.S.; PINHO, E.V.R.V. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 218-224, 2012.
- BERTAGNOLLI, P.F.; BONATO, E.R.; LINHARES, A.G.; COSTAMILAN, L.M.; KIIHL, R.A.S.; ALMEIDA, L.A. Novas cultivares - cultivar de soja BRS 66. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1347-1348, set. 2002.
- BOTELHO, L.S. **Deteção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009a. 200 p.
- _____. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009b. 399 p.
- BRUSTOLIN, R.; ROSSI, R.L.; REIS, E.M. Mofo-branco. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças da soja**: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 217-232.

BURSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, London, v. 55, n. 4, p. 611-622, Aug. 2009.

CAMARGO, M.P. *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas. 2013. 77 p. (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: UEPG, 1999. 178 p.

CAPOTE, N.; PASTRANA, A.M.; AGUADO, A.; SÁNCHEZ-TORRES, P. **Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/plantpathology/molecular-tools-for-detection-of-plant-pathogenic-fungi-and-fungicide-resistance>>. Acesso em: 14 abr. 2013.

CARMONA, M.A.; SCADIANI, M.M.; LUQUE, A.G. A seca-da-haste e da-vagem. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças da soja**: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 243-255.

CHEN, C.; ZHAO, W.; ZHOU, M.; WANG, J. High-throughput detection of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape by Taqman quantitative realtime PCR. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 6, S 23, 2010.

CHEN, L.S.; CHU, C.; LIU, C.D.; CHEN, R.S.; TSAY, J.G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 154 p. 654-662, 2006.

CHEN, Y.Y.; CONNER, R.L.; GILLARD, C.L.; MCLAREN, D. L.; BOLAND, G.J.; BALASUBRAMANIAN, P.M.; STASOLLA, C.; ZHOU, Q.X.; HWANG, S.F.; CHANG, K.F.; BABCOCK, C. A quantitative real-time PCR assay for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in navy bean seeds. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 62, p. 900–907, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 1 - Safra 2013/14, n. 8 - Oitavo Levantamento**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

DEBODE, J.; HEMELRIJCK, W. van; BAEYEN, S.; CREEMERS, P.; HEUNGENS, K.; MAES, M. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 58, p. 504–514, 2009.

DHINGRA, O.D. **Patologia de semente de soja**. Viçosa: UFV, 1997. 119 p.

_____. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, 2005. p. 11-75.

DHINGRA, O.D.; SILVA JUNIOR, G.J.; RODRIGUES, F.A. Patologia de sementes. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção de sementes de soja**. Londrina: Mecnas, 2013. p. 135-162.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja, Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p.

FREEMAN, J.; WARD, E.; CALDERON, C.; MCCARTNEY, A. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p. 877-886, July 2002.

GALLI, J.A.; PANIZZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2007.

GANCHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1445–1454, 2004.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 386-401, 2001.

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

GOUD, J.C.; TERMORSHUIZEN A.J. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, n. 6, p. 523-534, 2003.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 72 p.

GRABISCOSKI, E.M.G. **Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e detecção em sementes de soja**. 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

GUNDRY, C.N.; POULSON, M.D. Obtaining maximum PCR sensitivity and specificity. In: KENNEDY, S.; OSWALD, N. **PCR troubleshooting and optimization: the essential guide**. Norkfolk: Caister Academic Press, 2011. chap. 4, p. 79-96.

HENNENBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; JACCOUD-FILHO, D.S.; PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e suscetibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 763-768, 2012.

HENNEBERG, L.; JACCOUD FILHO, D.S.; GRZYBOWSKI, C.R.S.; PANOBLANCO, M. Importância da detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 21, n. 3, p. 41-46, 2011.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p.

HOBBS, T.W.; SCHMITTHENNER, A.F.; KUTER, G.A. A new *Phomopsis* species from soybean. **Mycologia**, Lawrence, v. 77, p. 535-544, 1985.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

JACCOUD-FILHO, D.S.; MATIELLO, R.R.; TAYLOR, E.; BATES, J.; LEE, D.; MORAES, M.H. Diagnose molecular de fungos em sementes. **Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 287-331, 2002.

KAVANAGH, I.; JONES, G.; NAYABY, S.N. Significance of controls and standard curves in PCR. In: KENNEDY, S.; OSWALD, N. **PCR Troubleshooting and optimization**: the essential guide. Norkfolk: Caister Academic Press, 2011. chap. 3, p. 67-78.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi**. 10th ed. Wallingford: CABI Publ., 2008. 784 p.

KURIAN, K.M.; WATSON, C.J.; WYLLIE, A.H. DNA chip technology. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v.187, p. 267-271, 1999.

LEHMAN, S.G.; WOLF, F.A. Soybean anthracnose. **Journal of Agricultural Research**, Lahore, Pakistan, v. 33, p. 381-391, 1926.

LI, S. *Phomopsis* seed decay of soybean. In: SUDARIC, A. (Ed.). **Soybean**: molecular aspects of breeding. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/soybean-molecular-aspects-of-breeding/phomopsis-seed-decay-of-soybean>>. Acesso em: 02 maio 2014.

MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 145-161, 2007.

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

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**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

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

MAHMODI, F.; KADIR, J.B.; WONG, M.Y.; A. NASEHI, A. First report of Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on soybean (*Glycine max*) in Malaysia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, n. 6 p. 841, June 2013.

MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L. Anthracnose. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 13-14.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo; Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, cap. 8, p. 149-206.

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

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

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

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**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 180-182, 2006.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**. Especial Oncologia, São Paulo, v. 67, supl. 10, p. 7-19, nov. 2010.

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 376, 1995.

OUTLOOK FIESP 2023: projeções para o agronegócio brasileiro. São Paulo: FIESP, 2013. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/outlook>> Acesso em: 20 jul. 2014.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; CARNEIRO, J.E.S. Mofo branco. In: DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. cap. 6 e 7, p. 279-299.

PEREIRA, J.M. Estabelecimento de padrões sanitários de sementes no Brasil. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 82-83, 2010.

- PERES, A.P.; NASSER, L.C.B.; MACHADO, J.C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 123-127, 2002.
- PRYOR, B.M.; GILBERTSON, R.L.A. PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 18-23, 2001.
- QI, Y.X.; ZHANG, X.; PU, J.J.; XIE, Y.X.; ZHANG, H.Q.; HUANG, S.L.; LI, S.L.; ZHANG, H. Nested PCR assay for detection of *Corynespora* leaf fall disease caused by *Corynespora cassiicola*. **Australian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 38, p. 141-148, 2009.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; REIS, A.C. Cancros-da-haste: meridionalis e caulívora. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Berthier, 2012a. p. 199-216.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; REIS, A.C.. Antracnose. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Berthier, 2012b. p. 191-198.
- ROGERS, S.L.; ATKINS, S.D.; WEST, J.S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 324-331, 2009.
- ROY, K.W.; RATNAYAKE, S. Frequency of occurrence of *Fusarium pallidorozeum*, effects on seeds and seedlings, and associations with other fungi in soybean seeds and pods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Quebec, v. 19, p. 188-189, 1997.
- RUPE, J.C.; FERRISS, R.S. Effect of temperature on the rate of infection of soybean by *Phomopsis longicolla*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Quebec, v. 12, p. 43-47, 1990.
- SANTOS, J.M.; VRANDECIC, K.; COSIC, J.; DUVNJAK, T.; PHILLIPS, A.J.L. Resolving the Diaporthe species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia**, Leiden, v. 27, p. 9-19, 2011.
- SHENA, L.; NBIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 893-908, 2004.
- SINCLAIR, J.B. Reevaluation of grading standards and discounts for fungus-damaged soybean seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Quebec, v. 72, p. 1415-1419, 1995.
- SINCLAIR, J.B. Diaporthe/Phomopsis complex. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 31-35.

- SOUSA, M.V.; MACHADO, J.C.; SIMMONS, H.E.; MUNKVOLD, G.P. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, London, DOI: 10.1111/ppa.12257, July 2014. Acesso em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12257/pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2014.
- STEADMAN, J.R. White mold: a serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.
- TERAMOTO, A.; MACHADO, T.A.; SANTOS, L.M.; VOLF, M.R.; MEYER, M.C.; CUNHA, M.G. Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 68-71, 2013.
- TOOLEY, P.W.; MARTIN, F.N.; CARRAS, M.M.; FREDERICK, R.D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 336-345, 2006.
- WALCOTT, R.R. Detection of seed borne pathogens. **HortTechnology**, Alexandria, v. 13, p. 40-47, Jan./Mar. 2003.
- WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D.; LANGSTON, D.B. Detection of *Botrytis aclada* in onion seed using magnetic capture hybridization and the polymerase chain reaction. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 32, p. 425-438, 2004.
- WITTWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; GUNDRY, C.N.; ELENITOBA-JOHNSON, K.S.J. Real-time multiplex PCR assays. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 430-442, 2001.
- WITTWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, London, v. 22, n. 1, p. 130-138, 1997.
- YANG, H.C. First Report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in Arkansas, United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, n. 11, p. 1510, Nov. 2013.
- YANG, H.C.; HAUDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, Lawrence, v. 106, n. 1, p. 32-42, 2014.
- YORINORI, J.T. Doenças de soja no Brasil. In: FUNDAÇÃO CARGILL. **A soja no Brasil Central**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1986. v. 1, p. 314.
- YORINORI, J.T. Epidemia de mancha alva (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1996/1997. In: REUNIÃO DE PESQUISA SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 18., 1996, Uberlândia. **Anais...** p. 319.
- ZHANG, A.W.; HARTMAN, G.L.; CURIO-PENNY, B.; PEDERSEN, W.L.; BECKER, K.B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 796-804, 1999.

ZHANG, A.W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W.L.; KOLLIPARA, K.P.; HARTMAN, G.L. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, p. 1306-1314, 1998.

ANEXOS

Anexo A

Avaliação de especificidade de iniciadores de *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Corynespora cassicola* por meio de PCR convencional

1. OBJETIVO

Esse experimento teve como objetivo a obtenção e a seleção de iniciadores específicos para a identificação de *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Corynespora cassicola*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Iniciadores projetados a partir do software Primer Express (Applied Biosystems) de *C. truncatum*, *S. sclerotiorum* (Tabela 1), assim como iniciadores de *C. truncatum*, *S. sclerotiorum* e *C. cassicola* (Tabela 2) já existentes na literatura foram selecionados para serem submetidos a testes de especificidade por meio de PCR convencional.

Tabela 1 - Iniciadores desenhados a partir do software Primer Express

Iniciador e sonda	Sequência	Posição (pb)	Especificidade
SS1For	5'-AGCCACCCATCCTACGGAGAT-3'	940 - 960	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
SS1Rev	5'-TGACCAGGGAAACGGAGACA-3'	1022 - 1003	
SS2For	5'-AACGCAGCGAAATGCGATAA-3'	221 - 240	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
SS2Rev	5'-CATGCCCCCGGAATACC-3'	318 - 301	
Col1For	5'-CCTGCGGAGGGATCATTACTG-3'	2 - 22	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Col1Rev	5'-CTACCCGCCGAAGCAACAG-3'	78 - 60	

Tabela 2 - Iniciadores já existentes na literatura selecionados para teste de especificidade

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Especificidade	Referência
Colg 1	AACCCTTTGTGAACATACC	<i>Colletotrichum</i>	CHEN et al.,
CT 2	CTTTAAGGGCCTACGTCAA	<i>truncatum</i>	2006
mtSSFor	AGGTAACAAGTCAGAAGATGATCGAAAGAGTT	<i>Sclerotinia</i>	ROGERS et al.,
mtSSRev	GCATTAAGCCTGTCCCTAAAAACAAGG	<i>sclerotiorum</i>	2009
SSFWD	GCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGC	<i>Sclerotinia</i>	FREEMAN et
SSREV	TGACATGGACTCAATACCAAGCTG	<i>sclerotiorum</i>	al. , 2002
CCF	CCCTTCGAGATAGCACCC	<i>Corynespora</i>	
CCR-1	GATCCGTTG TTGAAAGTTGT	<i>cassiicola</i>	QI et al., 2009
CCR-2	ATGCCCTAAGGAATACCAAA		
TYF	ATATAACGCTACTCTCTGTTC	<i>Sclerotinia</i>	CHEN et al.,
TYR	AGCCAACTTTTCGGAGATTTG	<i>sclerotiorum</i>	2010

Para cada par de iniciadores testado, foram utilizados 20 isolados de diferentes fungos associados às sementes de soja, sendo dois de *C. truncatum*, cinco de *Phomopsis* sp, três de *Fusarium* sp., dois de *C. cassiicola*, quatro de *S. sclerotiorum*, dois de *Cercospora kikuchii* e dois de *Alternaria* sp.. Cada isolado utilizado encontra-se especificado na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação de diferentes isolados obtidos a partir de sementes de soja infectadas

(continua)

Identificação	Gênero/espécie	Local de origem	Data de isolamento
Col2	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Col3	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão-SP	2013
Pho1	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2013
Pho2	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2013
Pho 3	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Pho 4	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Pho 5	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão-SP	2014
Fus1	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus2	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013
Fus3	<i>Fusarium</i> sp.	Matão-SP	2013

Tabela 3 - Relação de diferentes isolados obtidos a partir de sementes de soja infectadas (conclusão)

Identificação	Gênero/espécie	Local de origem	Data de isolamento
Cory1	<i>Corynespora cassiicola</i>	Desconhecido	2013
Cory2	<i>Corynespora cassiicola</i>	Desconhecido	2013
Ss1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Campos Novos-SC	2013
Ss2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Papanduva-SC	2013
Ss4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Água Doce-SC	2013
Ss5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Bahia	2013
Ck2	<i>Cercospora kikuchii</i>	Matão-SP	2014
Ck3	<i>Cercospora kikuchii</i>	Matão-SP	2014
Alt1	<i>Alternaria</i> sp.	Matão-SP	2013
Alt2	<i>Alternaria</i> sp.	Matão-SP	2013

Os isolados das diferentes espécies (Tabela2) foram cultivados em meio líquido semi-sintético descrito por Alfenas (1998). O micélio de cada isolado foi seco em papel filtro esterilizado, congelado em -80°C, liofilizado e macerado com pistilo. Foi feita a pesagem em balança analítica e 20mg do tecido de cada isolado teve seu DNA extraído utilizando-se o método de CTAB segundo Murray e Thompson (1980) modificado. O tecido macerado foi transferido para microtubo de 1,5 mL com 400 µL de tampão de extração de CTAB (CTAB 2%; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M ; PVP 1% e água ultrapura) pré-aquecido a 60°C. O material foi aquecido durante 30 minutos a 60°C, agitando-se manualmente a cada 10 minutos. Posteriormente, foi feita a centrifugação a 20.817 x g e 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL contendo 400 µL de clorofórmio:álcool-isoamílico (proporção de 24:1). Cada microtubo foi agitado manualmente até obter uma emulsão e centrifugado a 20.817 x g durante 5 minutos. Foram coletados 200 µL da fase superior formada após a centrifugação e transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 120 µL de isopropanol. Novamente, o microtubo foi agitado manualmente e mantido por 20 min em -80°C, seguido de nova centrifugação a 20.817 x g por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante formado foi descartado do microtubo e ao mesmo foi adicionado 1 mL de etanol 70%. O tubo foi agitado manualmente e centrifugado a 20.817 x g

durante 10 minutos. O sobrenadante formado após a centrifugação foi descartado e o precipitado formado foi seco à temperatura ambiente durante cinco horas. Por fim, o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de água Milli-Q e os microtubos contendo o DNA extraído foram mantidos a -20°C.

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas por meio de leituras em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O DNA foi diluído a 10ng/µL para as análises posteriores.

Cada par de iniciadores descritos nas Tabelas 1 e 2 foi submetido à PCR em volume total de 25 µL por reação, contendo 2 µL do DNA de cada espécie fúngica (Tabela 3), 1 µL de cada iniciador (10 µM), 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI) e 8,5 µL de água ultrapura Milli-Q®. Para os iniciadores SS1For/SS1Rev e COL1For/COL1Rev o termociclador foi programado para um ciclo a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 60 segundos, 72°C por 60 segundos com uma extensão final de 72°C por 6 minutos. Para os pares de iniciadores SS2For/SS2Rev e Colg1/CT2 manteve-se as mesmas condições de ciclagem descritas para os iniciadores anteriores, alterando-se apenas as temperaturas de anelamento para 56 °C e 52°C respectivamente. Para mtSSFor/mtSSRev e SSFWD/SSREV, o termociclador foi programado para um ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, temperatura de anelamento de 72-65°C decrescendo 1 °C a cada dois ciclos até a temperatura mínima de 65°C durante 60 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos (FREEMAN et al., 2002). Com os iniciadores CCF/CCR-1 /CCR-2 foi realizada uma reação de Nested PCR. Inicialmente, com os pares CCF/ CCR-2, o termociclador foi programado para um ciclo a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos a 94°C durante 60 segundos, 54°C durante 60 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A segunda reação foi realizada a partir da diluição da primeira reação em 100 vezes, utilizando os pares de iniciadores CCF/CCR-1 e submetida à mesma programação de termociclador da reação anterior (QI et al., 2009). Para TYF/TYR, o termociclador foi programado para um ciclo a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 60 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos (CHEN et al., 2010).

Os fragmentos amplificados foram comparados com um marcador de peso molecular de 100pb em corrida eletroforética de gel de agarose a 3% e fotografados em um foto documentador com auxílio de luz ultravioleta.

3. RESULTADOS

Na avaliação da especificidade os iniciadores Colg1/CT2 amplificaram apenas para os isolados Col 2 e Col 3 de *C. truncatum*, comprovando sua especificidade para essa espécie (Figura 1A). Os iniciadores SSFWD/SSREV e TYF/TYR amplificaram apenas para os isolados SS1, SS2 e SS5, confirmando sua especificidade para *S. sclerotiorum* (Figura 1B e 1C).

Figura 1 - Amplificação do DNA dos diferentes isolados fúngicos associados às sementes de soja. (A) Amplificação de Col 2 e Col 3 pelos iniciadores Colg1/CT2. (B) Amplificação de SS1, SS2 e SS5 pelos iniciadores SSFWD/SSREV. (C) Amplificação de SS1, SS2 e SS5 pelos iniciadores TYF/TYR

Os iniciadores SS1For/SS1Rev e mtssFor/mtssRev de *S. sclerotiorum* não amplificaram nenhum dos isolados testados, não podendo ser considerados específicos (Figura 2A e 2C). Os iniciadores SS2For/SS2Rev amplificaram todos os isolados testados,

(Figura 2B) assim como os iniciadores CCF/CCR-1 que também apresentaram amplificação de quase todos os isolados, comprovando sua ausência de especificidade (Figura 2D).

Figura 2 - Ausência de amplificação ou amplificação inespecífica do DNA dos diferentes isolados fúngicos associados às sementes de soja. (A) Ausência de amplificação pelos iniciadores SS1For/SS1Rev. (B) Amplificação inespecífica pelos iniciadores SS2For/SS2Rev. (C) Ausência de amplificação pelos iniciadores mtssFor/mtssRev. (D) Amplificação inespecífica pelos iniciadores CCF/CCR-1

Os iniciadores COL1For/COL1Rev amplificaram todos os isolados testados, sendo considerados inespecíficos à espécie alvo, mesmo tendo gerado bandas mais intensas para os isolados Col 2 e Col 3 de *C. truncatum* em comparação aos isolados de outras espécies (Figura 3).

Figura 3 - Amplificação inespecífica pelos iniciadores COL1For/COL1Rev

4. CONCLUSÃO

Na avaliação da especificidade dos iniciadores testados, apenas apresentaram-se específicos os iniciadores Colg1/CT2 de *C. truncatum* e SSFWD/SSREV e TYF/TYR de *S. sclerotiorum*. Os demais produziram amplificações inespecíficas ou a ausência de amplificação.

REFERÊNCIAS

- CHEN, C.; ZHAO, W.; ZHOU, M.; WANG, J. High-throughput detection of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape by Taqman quantitative real time PCR. **Phytopathology**, St Paul, v. 100, n. 6, S23, 2010.
- CHEN, L.S.; CHU, C.; LIU, C.D.; CHEN, R.S.; TSAY, J.G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 154, p. 654-662, 2006.
- FREEMAN, J.; WARD, E.; CLADERON, C.; McCARTNEY, A. A polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 877-886, 2002.

QI, Y.X.; ZHANG, X.; PU, J.J.; XIE, Y.X., ZHANG, H.Q.; HUANG, S.L.; LI, S.L.; ZHANG, H. Nested PCR assay for detection of Corynespora leaf fall disease caused by *Corynespora cassiicola*. **Australian Plant Pathology**, Dordrecht, v.38, p. 141-148, 2009.

ROGERS, S.L.; ATKINS, S.D.; WEST, J.S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 324-331, 2009.

Anexo B

Utilização do restritor hídrico manitol na inoculação de fungos em sementes de soja

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes do Brasil. As doenças dessa leguminosa contribuem para a redução da sua produção.

Grande parte das doenças que afetam essa cultura é transmitida pelas sementes. Por meio das sementes, inúmeras doenças podem ser disseminadas a longas distâncias e causar sérios prejuízos dependendo das condições ambientais que favorecem o seu desenvolvimento.

Para auxiliar nos estudos de patógenos associados às sementes de soja, existem diferentes métodos de inoculação de sementes, visando altos índices de incidência e de infecção de patógenos.

O uso de restrição hídrica para inoculação de sementes tem sido relatado por vários autores (BOTELHO, 2011; CARVALHO, 1999; COSTA et al., 2003; MACHADO et al., 2001a, 2001b, 2004).

Botelho (2011) inoculou sementes de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* em Batata dextrose ágar (BDA) com adição do restritor hídrico manitol, ajustado à -1,0 Mpa, sob diferentes períodos de exposição das sementes para obter diferentes potenciais de inóculo.

Machado et al. (2001b) testou diferentes potenciais osmóticos utilizando o restritor hídrico manitol para avaliar a viabilidade do uso da técnica de restrição hídrica na inoculação de sementes de soja pelos fungos *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, visando a obtenção de sementes infectadas por estes patógenos.

BDA com manitol possibilitou um maior tempo de exposição de sementes de milho aos fungos *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Cephalosporium acremonium* propiciando um maior número de plântulas doentes oriundas de sementes inoculadas, sendo que foram alcançados maiores índices de infecção das sementes em potenciais hídricos na faixa de -0,8 a -1,2 MPa. Através da técnica da restrição hídrica, sementes de milho foram inoculadas com *Stenocarpella maidys*, utilizando manitol ajustado para o potencial hídrico de -1,4 Mpa, obtendo-se após 96 horas de exposição das sementes à colônia fúngica, média de 67% de infecção desse patógeno (CARVALHO, 2004).

Carvalho (1999) utilizou restrição hídrica em meio BDA com manitol (-0,8Mpa) para inocular *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão. Com esse tratamento pôde-

se aumentar o período de exposição das sementes ao inóculo sem, contudo, ocorrer a germinação das mesmas. Além disso, o restritor incorporado ao meio foi capaz de estimular o crescimento radial das colônias do fungo.

Desse modo, a inoculação de sementes por meio desta técnica mostra-se eficiente e bastante promissora para diversos patossistemas já estudados. A metodologia consiste na exposição das sementes ao fungo desenvolvido em meio de cultura contendo um restritor hídrico, por diferentes períodos de tempo. Essa técnica permite a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo (COSTA et al., 2003; MACHADO et al., 2004).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de aumentar a eficiência da inoculação de *Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* em sementes de soja, visando obter um método de inoculação com o máximo de incidência possível dos patógenos nas sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola (LFN) da Universidade Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Sementes de soja foram inicialmente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e secas envolvidas por papel de filtro em condições de laboratório durante dois dias.

Os isolados fúngicos utilizados no presente trabalho, foram obtidos a partir de sementes de soja infectadas, provenientes de diferentes localidades (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação, gênero ou espécie, local de origem e data do isolamento dos isolados fúngicos de soja

Identificação	Gênero/espécie	Local de origem	Data de isolamento
Pho 3	<i>Phomopsis</i> sp.	Matão - SP	2014
Cory 3	<i>Corynespora cassiicola</i>	Itararé - SP	2011
Ss4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Água Doce - SC	2013
Col 2	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Matão - SP	2013

O meio de cultura utilizado para o experimento foi o batata dextrose ágar (BDA) Difco®, ao qual foi adicionado o soluto manitol nos potenciais hídricos 0,0; -0,6 e -0,8 Mpa. O cálculo para a obtenção da quantidade de manitol necessária para atingir cada nível de potencial hídrico, foi obtido por meio da fórmula de Van't Hoff: $P_o = -CiRT$, onde: P_o = Potencial osmótico (MPa); i = Constante de ionização; R = constante geral dos gases ($0,00831 \times \text{Kg} \times \text{MPa} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$); T = Temperatura absoluta ($^{\circ}\text{C} + 273$); C = Concentração (moles/kg de água) (SALISBURY; ROSS, 1991). Como testemunha, foi utilizado o meio BDA Difco® puro, sem os fungos.

O meio contendo o manitol nos diferentes potenciais hídricos foi autoclavado e vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo dez placas por tratamento. Discos de micélio de seis milímetros de diâmetro, provenientes das bordas de colônias de cada isolado representado na Tabela 1, foram depositados sobre o meio de cultura em sua posição central. As placas foram vedadas e distribuídas em câmara incubadora do tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12h (luz fluorescente branca) a $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

À medida que os bordos da colônia de cada isolado fúngico atingiam todo o diâmetro da placa de pelo menos um dos tratamentos (diferentes potenciais hídricos), foi feita a avaliação dos diâmetros da colônia com auxílio de régua milimetrada. Foram obtidas as médias dos diâmetros perpendiculares de dez placas de cada tratamento e submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância.

Quando cada fungo atingia os bordos das colônias para todos os tratamentos, foi feita a distribuição das sementes de soja em camada única em cada placa. Após esse procedimento, as placas foram levadas novamente para a câmara incubadora e permaneceram sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo durante 24 e 48h. As sementes foram removidas das placas e colocadas para secar sobre papel de filtro durante três dias em sob temperatura ambiente. Após esse período, as sementes foram colocadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria até o momento da avaliação.

As sementes inoculadas foram semeadas em placas de Petri contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas, embebidas em água destilada. Foram dispostas de forma equidistante, em número de 10 por placa para aquelas inoculadas com *Phomopsis* sp, *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum* e em número de cinco por placa para *Sclerotinia sclerotiorum*. Em seguida, os recipientes contendo as sementes foram incubados em ambiente controlado, com temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob regime de 12 h de luz (branca fluorescente). O objetivo da utilização da luz foi estimular a esporulação da maioria dos fungos. Após um período de incubação de sete dias, as sementes foram examinadas, uma a

uma, sob microscópio estereoscópico e os micro-organismos foram identificados e registrados. A identificação foi feita com base na esporulação dos fungos e ou, na presença de estruturas reprodutivas típicas de cada espécie em estudo. Para cada tratamento, foram utilizadas 120 sementes tomadas ao acaso (sendo quatro repetições de 30 sementes). O resultado do teste foi expresso em percentagem de cada fungo detectado (BRASIL, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A restrição hídrica pelo meio manitol, tanto a -0,6 Mpa quanto a -0,8 Mpa, afetou o crescimento de cada um dos fungos, apresentando um efeito estimulante ao crescimento micelial desses organismos quando comparado ao meio sem restrição hídrica (0,0 Mpa) (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias dos diâmetros das colônias de *Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* em diferentes condições de potenciais osmóticos

Isolado/ Espécie	Potencial osmótico com o restritor			CV (%)
	hídrico manitol			
	0,0 MPa	-0,6 Mpa	-0,8 Mpa	
Pho 3 / <i>Phomopsis</i> sp.	67,40 b	86.25 a	87,00 a	5,51
Cory 3 / <i>Corynespora cassiicola</i>	76,75 b	85,90 a	87,00 a	1,35
Ss4 / <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	70,4 b	84,75 a	87,00 a	5,83
Col 2 / <i>Colletotrichum truncatum</i>	75,15 b	85,00 a	83,70 a	4,45

Nota- As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si com base no Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Com os dados da Tabela 2, pode-se observar que no meio sem restrição hídrica, o diâmetro das colônias dos fungos foram menores do que quando comparados aos meios adicionados de manitol. Tanto os meios com potenciais hídricos de -0,6 Mpa como de -0,8 Mpa proporcionaram um crescimento micelial mais acelerado, não apresentando diferença estatística entre estes dois tratamentos quanto ao diâmetro das colônias. Resultados semelhantes puderam ser observados por Costa et al. (2003) ao avaliar *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em meios contendo diferentes restritores hídricos com potenciais osmóticos de -0,8 Mpa e -1,0 Mpa. Machado et al. (2001b) também observou resultados semelhantes no

crescimento micelial dos fungos *C. truncatum*, *P. sojae* e *S. sclerotiorum* em meio BDA com manitol, que apresentou efeito estimulante ao crescimento micelial desses organismos quando comparado ao meio sem restrição hídrica (0,0Mpa).

Este comportamento também foi verificado por Machado et al. (2004) em *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporoides* para os potenciais osmóticos de -0,4 Mpa e -0,6 Mpa de meios contendo manitol.

Pelos resultados dos testes de sanidade, não houve diferença de níveis de infecção para todos os fungos estudados. Todos os isolados apresentaram 100% de incidência nas sementes ao sétimo dia de avaliação pelo método do papel de filtro, tanto para os diferentes potenciais hídricos (-0,6 e -0,8 Mpa) como para os diferentes tempos de exposição (24 e 48h) dessas sementes aos patógenos.

4. CONCLUSÃO

A restrição hídrica pela adição de manitol ao meio BDA estimulou o crescimento micelial *in vitro* de *Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*. Não houve diferença na incidência dos fungos avaliados em sementes inoculadas artificialmente com uso de restritor hídrico manitol em potenciais osmóticos de 0,0Mpa, -0,6Mpa e -0,8 Mpa. Portanto, todos os tratamentos testados podem ser considerados eficientes na inoculação de todos os patógenos estudados, pois apresentaram o máximo de incidência.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009. 200 p.
- BOTELHO, L.S. **Deteção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- CARVALHO, M.C. Relação do tamanho das sementes de milho e doses de fungicida no controle de *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 389-393, 2004.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

_____. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001a.

_____. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001b.

_____. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682 p.