

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum* NA CULTURA DA SOJA E OTIMIZAÇÃO DE  
MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ASCÓSPOROS VIA  
qPCR**

Autora: Eide Pulcena de Souza  
Orientador: Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine  
Coorientador: Prof. Dr. Eugenio Miranda Sperandio  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Castro

RIO VERDE – GO  
Outubro - 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIENCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS AGRARIAS-AGRONOMIA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* NA CULTURA DA SOJA E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ASCÓSPOROS VIA qPCR**

Autora: Eide Pulcena de Souza

Orientador: Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine

Coorientador: Prof. Dr. Eugenio Miranda Sperandio

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Castro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS AGRÁRIAS/AGRONOMIA do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde- Área de Tecnologias Sustentáveis em sistemas de produção e uso do solo e água.

RIO VERDE – GO

Outubro – 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

SS0729 Souza, Eide Pulcena  
a Aspectos epidemiológicos de Sclerotinia sclerotiorum na cultura da soja e otimização de método para detecção de ascósporos via qPCR / Eide Pulcena Souza; orientador Alaerson Maia Geraldine; co-orientador Eugenio Miranda Sperandio. -- Rio Verde, 2020.  
58 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. epidemias. 2. mofo-branco. 3. burkard. 4. qPCR. I. Geraldine, Alaerson Maia , orient. II. Sperandio, Eugenio Miranda , co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 52/2020 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

### **ATA Nº/181**

#### **BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos vinte e seis do mês de outubro do ano de dois mil e vinte, às 08:00h (oito horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine (Orientador), Prof. Dr. Fernando Higino de Lima e Silva (Avaliador interno) e Dr. Murillo Lobo Junior (Avaliador externo), sob a presidência do(a) primeiro(a), em sessão pública realizada por vídeo conferência do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **EIDE PULCENA DE SOUZA** discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a (o) autor (a) da Dissertação para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o (a) examinado (a), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**, na área de concentração Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCA-AGRO da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Vanilda Maria Campos, secretaria do PPGCA-AGRO, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em duas vias de igual teor.

Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine (Presidente)

Dr. Murillo Lobo Junior (Membro externo)

Prof. Dr. Fernando Higino de Lima e Silva (Membro interno)

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |                                                                      |                                                         |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tese                                        | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação                      | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização                 | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação                             | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |                                                         |

Nome Completo do Autor: Eide Pulcena de Souza

Matrícula: 2019102310140023

Título do Trabalho: Aspectos epidemiológicos de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja e otimização de método para detecção de ascósporos via qPCR

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: \_\_/\_\_/\_\_

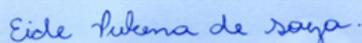
O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não  
O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 26 /12 /2020.  
Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

## DEDICATÓRIA

Às mulheres mais fortes, encorajadoras e perseverantes que Deus me apresentou,  
minhas mães Celiana e Joelma, e minha avó Maria Divina (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que graciosamente me ilumina e me enche com sua luz, me concede sabedoria e amor a cada manhã, e que me dá forças para atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Nilton e Celiana, e meus irmãos, Clesir e Vinicius, pela motivação, amor, carinho e força em todos os momentos. As minhas jóias raras, Pedro e Isabela, por serem fonte de motivação. À Molly, Dayanne, Simone e Wesley, por serem parte importante da minha vida, pela paciência, incentivo e ânimo para continuar. À minha segunda família, Joelma e Silvio, que sempre me deram entusiasmo, amor e exemplos suficientes para não desistir dos sonhos que Deus coloca em nosso coração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para o mestrado. Ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, e ao seu Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (PPGCA - AGRO) pela estrutura em ensino e pesquisa durante a graduação e o mestrado.

A meu orientador, Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine, que desde a iniciação científica foi meu grande incentivador em trabalhar com pesquisa, pelo exemplo e ajuda para minha aprovação no curso de doutorado em Fitopatologia. Ao Dr. Eugenio Sperandio pelo auxílio durante o mestrado e por todos os ensinamentos sobre biologia molecular. A Dra. Priscila Goulart pelos ensinamentos sobre escrita científica e tutela durante todo o processo seletivo do doutorado, mas principalmente por me ensinar com seu exemplo que a cada passo de fé, Deus nos capacita.

Aos meus amigos Carla e Art, por todo carinho e encorajamento. Aos meus melhores amigos Iara e Hélder, que são fontes de força, risadas, trabalho duro e principalmente, pela irmandade. A meu amigo Jaliston Júlio, pela amizade e parceria em todos os momentos.

Aos amigos da equipe do laboratório de Fitopatologia: Adeliane, Jefte, Suellen, Francielly, Amanda, Ednalva, João Gabriel, Leandro, Lorena, Lucas, Pedro Paulo, Priscila Batista, Rômulo, Gabriel Castoldi, Gabriel Jesus, Corina e Francisco.

A todos os meus amigos, colegas e professores, que contribuíram de forma significativa em cada parte da minha formação, crescimento pessoal e/ou profissional.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

EIDE PULCENA DE SOUZA, filha de Celiana Vieira de Souza e Nilton Vicente de Souza, nasceu no dia 19 de abril de 1996, na cidade de Rio Verde-GO.

Em março de 2014, ingressou no curso de Bacharel em Agronomia pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Goiás, graduando se em fevereiro de 2019.

Em março de 2019, iniciou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob orientação do Professor Alaerson Maia Geraldine.

## SUMÁRIO

Introdução .....	15
Revisão bibliográfica .....	16
2.1 Cultura da Soja.....	16
2.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	17
2.3 Manejo integrado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	18
2.4 Modelos de previsão de risco de ocorrência de <i>S. sclerotiorum</i> .....	19
2.5 Uso de técnicas moleculares para detecção do patógeno .....	21
Objetivo.....	21
Referências bibliográficas .....	23
CAPÍTULO 1 .....	28
Introdução .....	30
Material e métodos.....	31
Resultados e discussão .....	35
Conclusões .....	42
Referências bibliográficas .....	43
CAPÍTULO 2 .....	44
Introdução .....	46
Material e Métodos .....	47
Resultados .....	52
Discussão.....	55
Conclusões .....	56
Referências bibliográficas .....	57

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Símbolo	Descrição
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
AACPI	Área abaixo da curva de progresso da incidência
AACPS	Área abaixo da curva de progresso da severidade
ACS	Área coberta por sintomas
C	Controle negativo
cm	Centímetro
CP	Curva padrão
Ct	Cycle Threshold
DAP	Dias após o plantio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
GO	Goiás
h	Horas
ha	Hectare
I	Incidência
I <sub>max</sub>	Incidência máxima observada
I <sub>min</sub>	Incidência mínima não nula observada
Islope	Inclinação da curva de incidência
kg	Quilogramas
m	Metros
ml	Mililitro
ng	Nanograma
p.	Páginas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
cor	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (ou quantitativa)
R <sup>2</sup>	R-quadrado (Coeficiente de determinação)
rpm	Rotação por minuto
S	Severidade
s	Segundo
S <sub>max</sub>	Severidade máxima observada
S <sub>min</sub>	Severidade mínima observada
Sslope	Inclinação da curva de severidade
v.	Volume
Infec	Infecção secundária

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Funções discriminantes canônicas padronizadas por variações internas. Usando Infecção secundária (Infec), Incidência mínima (Imin) e Inclinação da curva de incidência (Islope).....39

**Tabela 2.** Matriz de classificação Jackknifed de análise discriminante realizada com 52 epidemias de mofo branco de soja usando as seguintes variáveis experimentais: Infecção secundária (Infec), Incidência mínima (Imin) e Inclinação da curva de incidência (Islope).....39

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Quantificação de DNA (ng/μl) pelo espectrofotômetro NanoDrop.....48

**Tabela 2.** Quantificação de ascósporos em relação a quantidade de DNA amplificado.....51

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Primeira análise hierárquica de cluster para agrupamento de cinquenta e duas epidemias de mofo-branco. Cluster gerado utilizando os dados de três últimas avaliações de incidência e severidade da doença ( $I_3$ ,  $I_4$ ,  $I_5$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  e  $S_5$ ), Incidência e severidade mínima e máxima ( $I_{min}$ ,  $I_{max}$ ,  $S_{min}$  e  $S_{max}$ ) e inclinação da reta de incidência e severidade da doença ( $I_{slope}$  e  $S_{slope}$ ) para formação dos grupos de epidemia.....38
- Figura 2.** Segunda análise hierárquica de cluster para agrupamento de cinquenta e duas epidemias de mofo-branco. Cluster gerado utilizando os dados de três últimas avaliações de incidência e severidade da doença ( $I_3$ ,  $I_4$ ,  $I_5$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  e  $S_5$ ) para formação dos grupos de epidemia.....38
- Figura 3.** Gráficos de barras das variáveis da curva de progresso da doença em função dos grupos epidêmico (A, B e C) gerados a partir da análise de agrupamento hierárquico das cinquenta e duas epidemias de mofo branco. a: inclinação da curva de incidência, b: inclinação da curva da severidade, c: incidência mínima, d: incidência máxima, e: severidade mínima e f: severidade máxima. Representação gráfica utilizando o erro padrão.....39
- Figura 4.** Curvas de progresso da doença resumidas pela média de cada grupo epidêmico agrupado na análise de cluster com as 52 epidemias de mofo-branco. As figuras A, B e C representam os grupos epidêmicos A, B e C, respectivamente.....40
- Figura 5.** Análise discriminante das variáveis experimentais em função de grupos gerados a partir da análise de agrupamento hierárquico de 52 epidemias de mofo-branco. As funções discriminantes foram determinadas em função da Infecção secundária, Incidência mínima ( $I_{min}$ ) e inclinação da curva de incidência ( $I_{slope}$ ).....40
- Figura 1.** Relação entre Cycle Threshold (Ct) e a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras da Curva Padrão.....53
- Figura 2.** Relação entre Cycle Threshold (Ct) e a quantificação do DNA de cada uma das amostras coletadas de *Sclerotinia sclerotiorum* com  $R^2 = 0,94$ .....54

## Resumo geral

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, outubro de 2020. Aspectos epidemiológicos de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja e otimização de método de detecção de ascósporos via PCR em tempo real. Orientador: Dr. Alaerson Maia Geraldine, Coorientador: Dr. Leonardo de Castro Santos, Coorientador: Dr. Eugenio Miranda Sperandio

A doença mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) encontra-se presente na maioria das regiões produtoras de soja do Brasil. Por se tratar de uma doença de difícil controle devido a suas estruturas de resistência, aliado ao fato da ausência de cultivares resistentes e fungicidas que atuem diretamente no controle dos escleródios no solo, o uso de modelos ou sistemas de previsão de doenças para *S. sclerotiorum* auxiliam na determinação do risco de ocorrência da doença. O patógeno possui quatro tipos de propágulos: escleródios, apotécios e ascósporos, pétalas infectadas (os ascósporos atingem a flor, a mesma é abortada e cai em um tecido sadio da planta, inicia a infecção da doença) e hifas infecciosas. Porém, a principal via de infecção é pelos ascósporos nos tecidos florais, que ocorre depois da formação do apotécio, onde os ascósporos são ejetados e atingem a flor da cultura. Este trabalho fornece informações e um banco de dados para complementar e auxiliar em modelos de previsão de ocorrência da doença mofo-branco. Assim, no primeiro capítulo, foi realizado o estudo do desenvolvimento de epidemias de *S. sclerotiorum* na cultura da soja. Cinquenta e duas epidemias foram estudadas e representaram uma grande variação nas curvas de progresso da doença. As epidemias foram analisadas por diferentes técnicas estatísticas e foram separadas de acordo com a similaridade utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e distância euclidiana no desenvolvimento da doença em três grupos (A, B e C). O grupo A é composto por epidemias de lento estabelecimento e com baixa taxa de desenvolvimento, ocasionando em epidemias com baixa incidência e severidade da doença. Enquanto o grupo B e C, é composto por epidemias de incidência e severidade intermediária e alta, respectivamente. Considerando a importância do estudo do patógeno em populações e necessidade de detecção rápida e eficiente de ascósporos de *S. sclerotiorum*, no campo no segundo capítulo foi avaliado três métodos de extração de DNA de ascósporos de *S. sclerotiorum* para otimização da detecção via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa (qPCR). A curva padrão foi determinada a partir de amostras de ascósporos coletadas no laboratório. O método de extração de Kurtgma & Fell (1998) e Reader & Broda(1985) foi o mais eficiente na extração de DNA de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de ascósporos. A otimização da detecção e quantificação de ascósporos por meio da qPCR são práticas úteis para detecção precoce e orientar medidas preventivas e no manejo do mofo branco da soja, além de auxiliar no desenvolvimento modelos de previsão de doença.

Palavras-chave: epidemias, mofo-branco, burkard, qPCR

## General abstract

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, October, 2020. Epidemiological aspects of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean culture and optimization of real-time PCR ascospore detection method. Advisor: Alaerson Maia Geraldine, Advisor: Leonardo de Castro Santos, Co-advisor: Eugenio Miranda Sperandio

The white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) is present in most of the soy producing regions of Brazil. It is a disease that is difficult to control due to its resistance structures, and as there are no resistant varieties and fungicides that act directly in the control of sclerotia in the soil, models or systems for predicting diseases for *S. sclerotiorum* help to determine the risk of the occurrence of disease. The pathogen has 4 types of propagules: sclerotia, apothecium and ascospores, infected petals and infectious hyphae. However, the main route of infection is by ascospores in floral tissues. In the first chapter, the study of the development of *S. sclerotiorum* epidemics in soybean was carried out. Fifty-two epidemics were studied and represented a wide variation in disease progress curves. Epidemics were analyzed using different statistical techniques and were separated according to the similarity in the development of the disease in three groups (A, B and C). Group A is composed of epidemics of slow establishment and with a low rate of development, causing epidemics with low incidence and severity of the disease. While group B and C, it is composed of intermediate and high epidemics, respectively. Considering the importance of studying the pathogen in the population and the fast and efficient detection of *S. sclerotiorum* ascospores in the field in the second chapter, three methods of DNA extraction from *S. sclerotiorum* ascospores were evaluated to optimize detection via PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative (qPCR). Ascospores were obtained with the aid of an automatic spore collector (Burkard) in the 2016/17 harvest in a commercial soybean crop infested with *S. sclerotiorum* sclerotia. For the choice and optimization of the methodology, the DNA of each sample was extracted and its quantity was measured via qPCR. The standard curve was determined from samples of ascospores collected in the laboratory. The Kurtgma & Fell (1998) and Reader & Broda (1985) extraction method was the most efficient in extracting DNA from *Sclerotinia sclerotiorum* from ascospores. Optimizing the detection and quantification of ascospores using qPCR are useful practices to guide preventive measures and the management of white soybean mold, as well as assist in the development of disease prediction models.

Key words: epidemics, white mold, burkard, qPCR

## Introdução

A cultura da soja (*Glycine max*) é o principal produto da agricultura brasileira, e o país o segundo maior produtor de soja do mundo. Corresponde a 35,822 milhões de hectares de área plantada em grãos no País, com produção de 114,843 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (CONAB, 2020). A soja prevalece como a principal *commodity*. Entretanto, muitos patógenos como fungos, bactérias, vírus e nematoides podem ocasionar grandes perdas de produtividade ou até mesmo inviabilizar a produção do grão. Um patógeno que vem causando grandes perdas econômicas na cultura da soja é o agente causal da doença mofo-branco.

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo ascomiceto cosmopolita que pode infectar mais de 400 espécies de plantas (PURDY, 1979). O mofo-branco, é também conhecido como podridão-de-esclerotinia, é uma das doenças mais destrutivas na cultura da soja, com perdas de até 70% de produtividade (MEYER, 2014).

As reduções de rendimento são causadas pela redução do número e peso das sementes resultante do anelamento das hastes e ruptura do xilema e do floema. Na cultura da soja, a fase mais vulnerável à infecção acontece da floração plena (R2) ao início da formação dos grãos (R5) (DANIELSON; NELSON; HELMS, 2004). Em condições de alta umidade, o fungo pode colonizar os tecidos saudáveis entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. Em tempo seco, o progresso da doença pode ser retardado ou paralisado, mas é retomado em condições de alta umidade. O micélio pode permanecer viável em flores infectadas por até 144 horas em condições desfavoráveis de umidade e temperatura (HARIKRISHNAN; DEL RÍO, 2006).

As flores infectadas disseminam o fungo para toda a planta ao caírem nas folhas e caule. Inicialmente a planta infectada apresenta a formação de uma lesão pálida ou marrom escuro que evolui e forma um micélio branco e cotonoso (mofo branco). O desenvolvimento desse micélio dá origem aos escleródios, que são estruturas de resistência formadas a partir de um aglomerado de hifas. Inicialmente, os escleródios possuem coloração branca e, com o seu desenvolvimento, escurecem e se tornam pretos (AGRIOS, 2002). Essas estruturas podem permanecer viáveis no solo durante um longo período de tempo, mesmo sob condições desfavoráveis de umidade e temperatura, auxiliando na sobrevivência do patógeno na área (BOLTON, 2006).

Os escleródios do patógeno podem germinar de forma miceliogênica (a partir do crescimento micelial) ou carpogênica (a partir da produção de apotécios) (PURDY, 1979). Os apotécios formam os esporos do fungo, denominados de ascósporos, que por

são produzidos dentro de ascos. Quando maduros os ascósporos são ejetados dos ascos e liberados no ar. A liberação de ascósporos ocorre por mais de 10 dias no campo, a uma taxa de 1.600 esporos h<sup>-1</sup> e estes são cobertos por uma mucilagem pegajosa, que ajuda na adesão ao hospedeiro (CLARKSON, 2002). Quando os escleródios germinam miceliogenicamente são formadas hifas que infectam diretamente o tecido da planta (BARDIN, 2001).

A utilização de um único método de controle não tem sido eficiente no manejo de *S. sclerotiorum*. Assim, o manejo integrado tem sido utilizado com uma combinação de práticas de controle cultural, químico e biológico. As práticas como rotação com plantas não hospedeiras, cultivo, controle de ervas daninhas e plantas de cobertura (PELTIER, 2012) podem servir para reduzir o inóculo.

Cada vez mais tem se estudado modelagem epidemiológica para melhorar as estratégias no controle desse patógeno. Foi determinado um modelo que reduziu o número de aplicações de fungicida, obtendo resultados satisfatórios quando comparado a aplicações baseada em calendário em um estudo de campo (FOSTER, 2011).

A geração e o armazenamento de dados e fatores ambientais comparados às características do patógeno pode auxiliar na busca de informações para subsidiar modelos de previsão de doença. Os modelos gerados usando dados disponíveis publicamente permitem que o modelo seja acessível e funcional em praticamente qualquer local de cultivo (MARGAREY, 2001).

## **Revisão bibliográfica**

### **2.1 Cultura da Soja**

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) possui um importante papel no agronegócio brasileiro. A crescente demanda mundial por alimentos mantém a soja como umas das principais fontes de proteína vegetal. Componente essencial na fabricação de rações animais e de importância cada vez maior na alimentação humana, a oleaginosa é a cultura agrícola que mais cresceu no Brasil. A soja é um dos produtos mais destacados da agricultura nacional e na balança comercial. Esta vem crescendo como fonte alternativa de biocombustível, é utilizada na indústria química, indústria de alimentos e na agroindústria para produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal (COSTA, 2000).

No Centro-Oeste, a área plantada aumentou 2,9% na safra 18/19, em relação à safra anterior e a produção foi de 52 milhões de toneladas, com variação de +2,4% ao exercício anterior. A soja inclusive vem mantendo a tendência de crescimento na área cultivada e aponta para crescimento de 1,9%, com 120,4 milhões de toneladas (CONAB, 2020).

Pertencente à família Fabaceae, a soja tem sua origem no continente Asiático, atual China. A soja chegou ao ocidente e na América no século XV e XVI, e foi cultivada inicialmente nos Estados Unidos como planta não só produtora de grãos, mas como forrageira. Em 1882 chegou à Bahia, Brasil trazida dos EUA e se espalhou em São Paulo e Rio Grande do Sul, com maior desenvolvimento no Centro Oeste brasileiro (PAIVA, 2006). Um dos grandes gargalos da sojicultura é o manejo de doenças que podem promover perdas de até 75% na produtividade das lavouras (JUHÁSZ et al., 2013).

## **2.2 *Sclerotinia sclerotiorum***

*Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia* (SCHUMACHER; KOHN, 1979). É um fungo necrotrófico, possui hifas hialinas, septadas, multinucleadas, ramificadas e produz estruturas de resistência (escleródios) que permanecem viáveis por muitos anos (AGRIOS, 2002).

Muitas das hospedeiras de *S. sclerotiorum* (Lib.) são de grande interesse econômico, como alface, tomate, algodão, soja, feijão, alfafa, girassol, canola, morango, cenoura e batata (DERBYSHIRE, 2017), conhecido podridão branca de esclerotínia ou mofo-branco, é um patógeno que vem pode perdas na produtividade das culturas podendo chegar a 100% sob condições favoráveis (PURDY, 1979).

Na cultura da soja, a fase mais vulnerável à infecção acontece da floração plena (R2) ao início da formação dos grãos (R5) (DANIELSON; NELSON; HELMS, 2004). Em condições de alta umidade, o fungo pode colonizar os tecidos sadios entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. Em tempo seco, o progresso da doença pode ser retardado ou paralisado, mas é retomado em condições de alta umidade. O micélio pode permanecer viável em flores infectadas por até 144 horas em condições desfavoráveis de umidade e temperatura (HARIKRISHNAN; DEL RÍO, 2006).

A infecção é iniciada a partir dos ascósporos que atingem a flor; a planta com mecanismos de defesa aborta a flor e está cai em um tecido sadio da planta, dando início a infecção da doença mofo-brando na cultura da soja. Assim, as flores infectadas disseminam o fungo para toda a planta ao caírem nas folhas e caule. Inicialmente a planta infectada apresenta a formação de uma lesão pálida ou marrom escuro que evolui e forma um micélio branco e cotonoso (mofo branco). O desenvolvimento desse micélio dá origem aos escleródios, que são estruturas de resistência formadas a partir de um aglomerado de hifas. Inicialmente, os escleródios possuem coloração branca e, com o seu desenvolvimento, escurecem e se tornam pretos (AGRIOS, 2002). Os escleródios podem permanecer viáveis durante longo período, mesmo sob condições desfavoráveis de umidade e temperatura, auxiliando na sobrevivência do patógeno na área (BOLTON, 2006). A germinação carpogênica dos escleródios forma os apotécios. Cada apotécio pode liberar cerca de 10 milhões ascósporos (esporos), que são transportados pelo vento, sendo assim responsáveis pela disseminação do patógeno a longas distâncias. Os ascósporos são também responsáveis pela infecção que ocorre no período de floração. A flor é um tecido frágil quando comparado aos outros tecidos do hospedeiro, sendo por isso mais suscetível a infecção, servindo como fonte de nutriente para o desenvolvimento do fungo na planta (HARTMAN, 1999), após a formação do apotécio, os ascósporos são liberados e ao atingirem a flor da se início ao processo de infecção da doença.

Para a germinação carpogênica ocorrer, os escleródios devem receber luz e temperatura entre 10 a 20°C e umidade a capacidade de campo; caso contrário, não havendo a presença de luz e temperatura entre 10 a 20°C, é mais provável que a germinação miceliogênica (crescimento de hifas hialinas a partir do escleródio) ocorra (SILVA et al., 2011). Esse tipo de germinação possui um potencial epidêmico muito reduzido quando comparado com a germinação carpogênica (PHILLIPS, 1986). Altas populações de plantas, espaçamentos estreitos entre linhas, períodos prolongados de precipitação, elevada umidade relativa e temperaturas amenas são condições favoráveis à incidência do mofo-branco (PURDY, 1979).

### **2.3 Manejo integrado de *Sclerotinia sclerotiorum***

O manejo integrado para o controle de *S. sclerotiorum* utiliza uma combinação de práticas de controle cultural, químico e biológico (PELTIER, 2012). A rotação de culturas e o plantio direto de soja combinado com rotação com culturas não hospedeira do patógeno se mostraram mais eficientes em reduzir o inóculo primário

(por exemplo, apotécio) em campos de soja infestados de *S. sclerotiorum* (GARZA et al., 2002).

A utilização de cultivares resistentes modificando o dossel da soja por meio da taxa de semeadura e espaçamento entre linhas maior e arquitetura mais eretas de plantas influencia no microclima formado no dossel da cultura manipulam o ambiente do patógeno para ser desfavorável ao desenvolvimento da doença (GRAU, 1984; HOFFMAN et al., 2002; NAPOLEÃO et al., 2006).

O controle da doença é limitado pela falta de cultivares com resistência completa, no entanto, vários genótipos de soja parcialmente resistentes foram identificados (BOLAND, 1987) e atualmente o controle dessa doença é realizado por controle químico e biológico. Como nenhuma resistência completa está disponível em cultivares comerciais, o manejo depende muito do controle químico direcionado a proteger as flores da infecção por ascósporos de *S. sclerotiorum* (PELTIER, 2012). Alguns estudos mostraram que benomil, tiofanato metílico e vinclozolina demonstraram redução de *S. sclerotiorum* aos sintomas na folha. A maioria dos fungicidas usados no controle de *S. sclerotiorum* são classificados como carbamatos de metil benzimidazol ( por exemplo, tiofanato-metil), inibidores de succinato desidrogenase ( por exemplo, boscalid), inibidores de desmetilação ( por exemplo , flutriafol, protriocanazol, tetraconazol) e inibidores de quinina externa (QoI) ( por exemplo , fluoxastrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina) (ARMANDO Q, , 2018; DI et al., 2016; HUZAR-NOVAKOWISKI; PAUL; DORRANCE, 2017; LIANG et al., 2015; PELTIER, 2012).

Um método de controle muito eficiente na redução de escleródios no solo é o controle biológico, pois diversos microrganismos como o *Coniothyrium minutans*, *Streptomyces lydicus*, várias cepas de *Trichoderma spp.* (como *T. asperellum* e *T. harzianum*) e algumas bactérias (*Bacillus pumilus*, entre outras) tem sua eficiência demonstrada em controlar escleródios de *S. sclerotiorum* (HADDAD et al., 2017; HUANG; HOES, 1976; MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, 2019; ZENG et al., 2012).

#### **2.4 Modelos de previsão de risco de ocorrência de *S. sclerotiorum***

Um sistema de previsão de doença de planta é aquele que prevê o aparecimento ou um aumento na intensidade de uma doença baseado em informação sobre o ambiente, a cultura e/ou o patógeno. Os modelos estão relacionados com uma

previsão por estação de cultivo, e são úteis quando é importante prever o inóculo inicial ou o nível inicial da doença, e o seu desenvolvimento geralmente requer observações de vários anos e ou locais. Há modelos que envolvem múltiplas previsões, são úteis para saber quando a doença pode aumentar rapidamente durante a estação de crescimento, ou quando o valor econômico da cultura justifica várias intervenções de controle. (CAMPBELL, C. L.; MADDEN, 1990).

As condições ambientais são muito importantes para o desenvolvimento do patógeno e incremento na incidência e na severidade de epidemias de *S. sclerotiorum*, são necessárias a quantificação e a interação entre os fatores ambientais que afetam o ciclo de vida do patógeno, para suportar o desenvolvimento de sistemas de previsão da doença (SUN; YANG, 2000).

Devido às amplas condições de fatores favoráveis ao patógeno e a dificuldade de controle do patógeno vários trabalhos têm mostrado a eficiência de se usar aplicação de fungicidas no momento certo e não uso de aplicações por calendário (na maioria das vezes com aplicações desnecessárias) (MUELLER et al., 2004). A recomendação de fungicida no início da floração e, se as condições climáticas continuarem favoráveis à doença, outras aplicações se fazem necessárias (VIEIRA et al., 2012). A utilização racional de fungicidas também pode ser balizada em modelos de previsão de risco de ocorrência de mofo-branco.

Diversas ferramentas são utilizadas para facilitar a coleta de material biológico (estruturas dos fungos) para a posterior realização de técnicas moleculares de detecção e confirmação do patógeno. Como dispositivos de amostragem de ar, como a armadilha volumétrica de 7 dias Burkard (tipo Hirst), ou amostrador de braço giratório. Os coletores do tipo Burkard são utilizados para as coletas dos esporos ou material biológico usado para a detecção da presença e quantificação dos ascósporos.

Dados meteorológicos associados a informações de fenologia da planta, parâmetros do dossel da cultura da soja e espaçamento entre linhas foram combinados para determinar um modelo de previsão de risco de presença de apotécio durante o período de floração da soja (FALL et al., 2018), auxiliando o produtor na tomada de decisão das aplicações de fungicidas e outras medidas de controle do patógeno.

## 2.5 Uso de técnicas moleculares para detecção do patógeno

Métodos moleculares baseados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida) têm sido estudados para a detecção de diferentes patógenos. Diversos trabalhos mostram uso de PCR para detecção de *Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* em sementes de alface (GLYNN; EDWARDS, 2010; MBOFUNG; PRYOR, 2010). O PCR é eficiente para detectar a presença de *S. sclerotiorum* em sementes infectadas com pelo menos 1% de incidência (BOTELHO et al., 2015).

As técnicas de PCR têm potencial suficiente para detectar vários patógenos de plantas de maneira altamente específica e sensível (OJAGHIAN et al., 2016). Técnicas para detecção de ascósporos de *S. sclerotiorum* foram desenvolvidos com uso de PCR em tempo real para detecção dos esporos transportados pelo ar (ROGERS; ATKINS; WEST, 2009a). As principais vantagens da utilização de técnicas moleculares, é por serem rápidas, enquadrando-se perfeitamente em modelos de previsão (PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014).

Sabe-se que o risco de ocorrência de mofo-branco está relacionado à concentração de ascósporos transmitidos pelo ar ou à porcentagem de infestação de pétalas no início do florescimento (ROGERS; ATKINS; WEST, 2009b; TURKINGTON; MORRALL; GUGEL, 1991) e a utilização de armadilhas de esporos (como Burkard) são comumente utilizadas para a coleta de ar juntamente com ascósporos (OJAGHIAN et al., 2016).

O monitoramento de ascósporos disseminados pelo ar é utilizado como uma abordagem direta para medida de risco de ocorrência da doença. As concentrações de ascósporos transportados pelo ar foram relacionadas a subsequente desenvolvimento da doença no girassol (FREEMAN et al., 2002) auxiliando em estudos epidemiológicos e na determinação de modelos de previsão. A PCR em tempo real tornou-se uma ferramenta de diagnóstico útil em várias áreas das ciências biológicas, incluindo a ecologia microbiana. Além disso, a abundância relativa de diferentes grupos taxonômicos foi quantificada com conjuntos de primers específicos (KIM; KNUDSEN, 2008).

### Objetivo

Objetivou-se realizar o estudo do desenvolvimento de epidemias de *S. sclerotiorum* em três áreas distintas no estado de Goiás com cultivo de soja e determinar o desenvolvimento das epidemias agrupadas em grupos de similaridade.

E validar uma metodologia para extração de DNA de *S. sclerotiorum* a partir das amostras coletas nas áreas experimentais.

## Referências bibliográficas

- ADAMS, P. B. **Ecology of Sclerotinia Species Phytopathology**, 1979.
- AGRIOS. **Plant Pathology Mycological Research**, 2002.
- ARMANDO Q, ARMENTA A, MONDACA EC, ÁNGEL M, SÁNCHEZ A, LEÓN VM, ESCOBOZA FA, M. C. Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, n. 11, p. 2149, 18 jan. 2018.
- BARDIN, S. D. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada1. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88–98, 2001.
- BOLAND, G. J. Evaluating Soybean Cultivars for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v. 71, n. 10, p. 934, 1987.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Numbers and distribution of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to white mold of white bean ( *Phaseolus vulgaris* ). **Canadian Journal of Botany**, v. 66, n. 2, p. 247–252, 1 fev. 1988.
- BOLTON, M. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BOTELHO, L. DA S. et al. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 1, p. 55–62, 10 mar. 2015.
- CAMPBELL, C. L. ; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990.
- CLARKSON, J. P. **Some applications of generalized srivastava-attiya operator to the bi-concave functions** **Miskolc Mathematical Notes**, 2002.
- CLARKSON, J. P. et al. Forecasting *Sclerotinia* Disease on Lettuce: A Predictive Model for Carpogenic Germination of *Sclerotinia sclerotiorum* Sclerotia. **Phytopathology®**, v. 97, n. 5, p. 621–631, maio 2007.
- CLARKSON, J. P. et al. A Model for *Sclerotinia sclerotiorum* Infection and Disease Development in Lettuce, Based on the Effects of Temperature, Relative Humidity and Ascospore Density. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94049, 15 abr. 2014.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. p. 66, 2020.
- COSTA. Soja. **Química nova**, p. 7, 2000.
- DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, n. 3, p. 297–

300, 2004.

DI, Y.-L. et al. Baseline sensitivity and efficacy of trifloxystrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Protection**, v. 87, p. 31–36, set. 2016.

FALL, M. L. et al. Case Study of an Epidemiological Approach Dissecting Historical Soybean *Sclerotinia* Stem Rot Observations and Identifying Environmental Predictors of Epidemics and Yield Loss. **Phytopathology**®, v. 108, n. 4, p. 469–478, abr. 2018.

FOSTER, A. J. Development and validation of a disease forecast model for *Sclerotinia* rot of carrot. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 187–201, 2011.

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

GARZA, J. A. G. et al. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 2, p. 137–143, jun. 2002.

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**, v. 108, n. 1, p. 81–87, jan. 2010.

GRAU, C. R. Effects of Cultivars and Cultural Practices on *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. **Plant Disease**, v. 68, n. 1, p. 56, 1984.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, dez. 2017.

HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 946–950, 2006.

HARTMAN, GL, SINCLAIR, JB, RUPE, J. **COMPÊNDIO DE DOENÇAS DA SOJA**. 5th edn ed. [s.l.] The American Phytopathological Society, 1999.

HOFFMAN, D. D. et al. Selected Soybean Plant Introductions with Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 971–980, set. 2002.

HUANG, H. C.; HOES, J. A. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 5–6, p. 406–410, 1 mar. 1976.

HUZAR-NOVAKOWISKI, J.; PAUL, P. A.; DORRANCE, A. E. Host Resistance and Chemical Control for Management of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean in Ohio.

**Phytopathology**®, v. 107, n. 8, p. 937–949, ago. 2017.

JUHÁSZ, A. C. P. et al. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, v. 34, p. 66–75, 2013.

KIM, T. G.; KNUDSEN, G. R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 100–108, set. 2008.

LARSEN, H. H. et al. A Prospective, Blinded Study of Quantitative Touch-Down Polymerase Chain Reaction Using Oral-Wash Samples for Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Infected Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1679–1683, maio 2004.

LIANG, H.-J. et al. Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 4, p. 691–699, 28 ago. 2015.

MARGAREY, R. Site-specific weather information without on-site sensors. **Plant Disease**, v. 85, 2001.

MARK DERBYSHIRE, MATTHEW DENTON-GILES, DWAYNE HEGEDUS, 2 SHIRIN SEIFBARGHI, JEFFREY ROLLINS, J. VAN; KAN, MICHAEL F. SEIDL, LUIGI FAINO, MALICK MBENGUE, OLIVIER NAVAUD, SYLVAIN RAFFAELE, KIM HAMMONDKOSACK, STEPHANIE HEARD, AND R. O. The Complete Genome Sequence of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* Reveals Insights into the Genome Architecture of Broad Host Range Pathogens. **Genome Biology**, v. 9, p. 26, 2017.

MBOFUNG, G. C. Y.; PRYOR, B. M. A PCR-Based Assay for Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Lettuce Seed. **Plant Disease**, v. 94, n. 7, p. 860–866, jul. 2010.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. DA. Mofo-branco em soja - ensaios cooperativos. In: **Trichoderma: Uso na agricultura**. Brasília: [s.n.]. p. 417–432.

MEYER, M. C. **Ensaio cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja.pdf**, [s.d.].

MUELLER, D. S. et al. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 983–988, out. 2004.

NAPOLEÃO, R. et al. Efeito do espaçamento e da cultivar de feijoeiro sobre a intensidade do mofo-branco e a sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 63–

66, mar. 2006.

OJAGHIAN, M. R. et al. Early detection of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in potato fields using real-time PCR. **Mycological Progress**, v. 15, n. 9, p. 959–965, 2016.

PAIVA, B. M. DE; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. Aspectos socioeconômico da soja. **Informe Agropecuário, Embrapa**, v. 27, p. 7–14, 2006.

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Evaluation of air sampling and detection methods to quantify airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 32–42, 2014.

PELTIER, A. J. **Biology, yield loss and control of sclerotinia stem rot of soybean** *Journal of Integrated Pest Management*, 2012.

PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic Germination of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* after Periods of Conditioning in Soil. **Journal of Phytopathology**, v. 116, n. 3, p. 247–258, jul. 1986.

PURDY, L. H. **Sclerotinia sclerotiorum History, Diseases and Symptomatology** *purdy.pdf*, 1979.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 324–331, 2009a.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 324–331, abr. 2009b.

SCHUMACHER, T.; KOHN, L. M. A monographic revision of the genus *Myriosclerotinia*. **Mycotaxon**, v. 9, n. 9, 1979.

SILVA, F. P. M. DA et al. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 131–136, set. 2011.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287–1293, dez. 2000.

TURKINGTON, T. K.; MORRALL, R. A. A.; GUGEL, R. K. Use of petal infestation to forecast sclerotinia stem rot of canola: Evaluation of early bloom sampling, 1985-90. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 13, n. 1, p. 50–59, 29 mar. 1991.

VIEIRA, R. et al. Management of white mold in type III common bean with plant spacing

and fungicide. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 91–101, 1 abr. 2012.

ZENG, W. et al. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 225–232, fev. 2012.

## CAPÍTULO 1

### Resumo

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, outubro de 2020. Aspectos epidemiológicos de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. Orientador: Dr. Alaerson Maia Geraldine, Coorientador: Leonardo de Castro Santos, Coorientador: Dr. Eugenio Miranda Sperandio

*Sclerotinia sclerotiorum* é o agente causador de mofo-branco, uma doença de grande importância na cultura da soja. O patógeno possui escleródios, apotécios e ascósporos, e hifas infecciosas, como propágulos. Porém, a principal via de infecção é pelos ascósporos nos tecidos florais. Esta é uma doença de difícil controle devido a suas estruturas de resistência, e ainda não existem fungicidas que atuam diretamente no controle dos escleródios no solo. O conhecimento sobre os propágulos do patógeno e a forma de desenvolvimento da doença é necessário para o desenvolvimento de modelos e /ou sistemas de previsão do risco de ocorrência de epidemias de mofo-branco. Diante disto, objetivou-se realizar o monitoramento de epidemias de *S. sclerotiorum* na cultura da soja. O trabalho foi realizado em três áreas distintas e nenhum método de controle foi adotado. Cinquenta e duas epidemias foram estudadas e representaram uma grande variação nas curvas de progresso da doença. As epidemias foram analisadas por diferentes técnicas estatísticas e foram separadas de acordo com a similaridade utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e distância euclidiana no desenvolvimento da doença em três grupos (A, B e C). O grupo A é composto por epidemias de lento estabelecimento e com baixa taxa de desenvolvimento, ocasionando epidemias com baixa incidência e severidade da doença. Enquanto o grupo B e C, é composto por epidemias de intermediário e alto desenvolvimento e estabelecimento, respectivamente.

Palavras-Chave: epidemias, mofo-branco, ascósporos, infecção secundária

## Abstract

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, February, 2020. Epidemiological aspects of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Advisor: Alaerson Maia Geraldine, Advisor: Leonardo de Castro Santos, Co-advisor: Eugenio Miranda Sperandio

*Sclerotinia sclerotiorum* is the causative agent of white mold, a disease of great importance in soybean culture. The pathogen has 4 types of propagules: sclerotia, apothecium and ascospores, infected petals and infectious hyphae. However, the main route of infection is by ascospores in floral tissues. This is a disease that is difficult to control due to its resistance structures, and there are still no fungicides that act directly to control sclerotia in the soil. Knowledge about the propagules of the pathogen and how the disease develops helps in models and/or systems for predicting the risk of occurrence of white mold epidemics. Given this, the objective was to carry out the study of the development of *S. sclerotiorum* epidemics in soybean culture. The work was carried out in three different areas and no control method was adopted aiming at the development of epidemics. Fifty-two epidemics were studied and represented a wide variation in disease progress curves. Epidemics were analyzed using different statistical techniques and were separated according to the similarity in the disease progress curve and secondary infection (contact between sick plant and healthy plant) in three groups (A, B and C). Group A is composed of epidemics of slow establishment and with a low rate of development, causing epidemics with low incidence and severity of the disease. While group B and C, it is composed of intermediate and high development and establishment epidemics, respectively.

Keywords: epidemics, white-mold, ascospores, secondary infection

## **Introdução**

O mofo branco, causado pelo fungo ascomiceto necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*. O fungo infecta mais de 400 espécies de plantas, incluindo algodão, tomate, girassol, feijão e soja (BOLAND; HALL, 1994).

Atualmente é uma das doenças mais destrutivas na cultura da soja, podendo causar perdas de até 70% de produtividade (MEYER et al., 2014). Na cultura da soja, a fase mais vulnerável à infecção acontece da floração plena ao início da formação dos grãos (R5) (DANIELSON et al., 2004). Em condições de alta umidade, o fungo pode colonizar os tecidos saudáveis entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. Em tempo seco, o progresso da doença pode ser retardado ou paralisado, mas é retomado em condições de alta umidade. O micélio pode permanecer viável em flores infectadas por até 144 horas em condições desfavoráveis de umidade e temperatura (HARIKRISHNAN & DEL RÍO, 2006).

As flores infectadas disseminam o fungo para toda a planta ao caírem nas folhas e caule. Inicialmente a planta infectada apresenta a formação de uma lesão pálida ou marrom escuro que evolui e forma um micélio branco e cotonoso (mofo-branco). O desenvolvimento desse micélio dá origem aos escleródios, que são estruturas de resistência formadas a partir de um aglomerado de hifas. Inicialmente, os escleródios possuem coloração branca e, com o seu desenvolvimento, escurecem e se tornam pretos (AGRIOS, 2005).

Os escleródios podem permanecer viáveis durante longo período, mesmo sob condições desfavoráveis de umidade e temperatura, auxiliando na sobrevivência do patógeno na área (BOLTON et al., 2006). A germinação dos escleródios forma os apotécios. Cada apotécio pode liberar cerca de 10 milhões ascósporos (esporos), e podem ser transportados pelo vento, sendo assim responsáveis pela disseminação a longas distâncias. Os ascósporos são responsáveis pelas infecções que ocorre no período de floração. A flor é um tecido frágil quando comparado aos outros tecidos do hospedeiro, sendo por isso mais suscetível a infecção, servindo como fonte de nutriente para o desenvolvimento do fungo na planta.

Para a germinação carpogênica ocorrer, os escleródios devem receber luz e temperatura entre 10 a 20°C e umidade; caso contrário, não havendo a presença de luz e temperatura entre 10 a 20°C, é mais provável que a germinação miceliogênica (crescimento de hifas hialinas a partir do escleródio) ocorra. Esse tipo de germinação

possui um potencial epidêmico muito reduzido quando comparado com a germinação carpogênica (PHILLIPS,1987).

Outra forma de infecção e incremento na curva de progresso da doença é a infecção de contato entre tecido doente e tecido sadio (infecção secundária). Algumas cultivares podem não ser infectadas mesmo quando o patógeno está presente e as condições ambientais são favoráveis, esse fenômeno é chamado de escape.

O escape ocorre quando o hospedeiro suscetível consegue se manter sadio em virtude da separação, no espaço ou no tempo, de seus tecidos suscetíveis aos propágulos infectivos do patógeno (GASPAROTTO et al., 2010).

## **Material e métodos**

### **Área experimental**

Os experimentos foram conduzidos em três locais distintos, descritos a seguir, com resultados analisados no laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO.

#### **- Área 1**

O experimento 1 foi instalado na área experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em Goianira, GO (16°43'33"S, 49°38'33"W), em área infestada artificialmente com escleródios de *S. sclerotiorum*. A instalação do experimento ocorreu em janeiro de 2014 (dados de epidemias proveniente do banco de dados, Geraldine 2014). Nenhum método de controle foi empregado objetivando promover uma série de epidemias de mofo-branco. Foram avaliadas 15 epidemias distribuídas aleatoriamente, com 1 m de bordadura.

#### **- Áreas 2 e 3**

Os experimentos 2 e 3 foram instalados na Fazenda 2J1, município de Montividiu, GO (17°28'52.8"S, 51°15'16.0"W), em talhões (locais) distantes geograficamente por 1 km. Foram realizados em área infestada naturalmente com escleródios de *S. sclerotiorum*. As instalações dos experimentos ocorreram em novembro de 2016 e a cultivar de soja implantada na área 2 foi a Monsoy 7739 e na área 3 foi 2737 coodetec. Nenhum método de controle foi empregado objetivando promover uma série de epidemias de

mofa-branco. Foram avaliadas 18 epidemias no experimento 2 e 19 epidemias no experimento 3, em parcelas de 64m<sup>2</sup> (8x8m) distribuídas aleatoriamente, com 1 m de bordadura.

### **Densidade de escleródio nas áreas experimentais**

A infestação da área foi determinada pela metodologia de Jaccoud-Filho et al. (2010) descrita a seguir, onde foram realizadas quatro coletas de solo com aproximadamente 5cm de profundidade utilizando um gabarito 0,25m<sup>2</sup> (50x50cm), e a média dessa amostragem estimou o número de escleródios/metro<sup>2</sup>. As amostras foram processadas no laboratório de Fitopatologia, onde foi determinada os níveis de infestação da área. A viabilidade inicial dos escleródios obtidos na amostragem de infestação da área e foi determinada em meio de cultura Neon (meio de cultura específico para *S. sclerotiorum*). Esta amostragem não foi necessária para a área 1, onde a presença de escleródio foi confirmada por ser uma área infestada naturalmente com escleródios.

### **Avaliações de Incidência, Severidade e Infecção secundária**

As avaliações de incidência (*i*) e severidade (*s*) da doença foram realizadas no início da floração. Foram realizadas com 66, 79, 86, 90 e 107 dias após o plantio (DAP), avaliação 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Foi realizada uma marcação com uma bandeirinha no centro de cada parcela e uma marcação com um barbante na planta primeira planta a ser avaliada para garantir maior segurança para realizar as avaliações sempre nas mesmas plantas, determinando assim desenvolvimento de cada epidemia.

Em cada parcela foram avaliadas 40 plantas em duas linhas centrais, sendo 20 plantas por linha. As plantas foram consideradas doentes quando apresentaram micélio cotonoso na superfície da planta e ou lesões necróticas com micélio branco. Para estimar a severidade de *S. sclerotiorum* utilizou-se escala de notas de Geraldine et al. (2010);

- 1 a 7 (1: todas as plantas sadias);
- 2: 1 a 5% de área coberta por sintomas (ACS);
- 3: 6 a 20% ACS;
- 4: 21 a 50% ACS;
- 5: 51 a 70% ACS;
- 6: 71 a 90% ACS; e
- 7: 91 a 100% ACS).

O número de infecções secundária (Infec) foi estimado em 1 m linear, em todas as parcelas experimentais. A quantificação de infecção secundária foi realizada pela visualização do contato entre uma parte doente da planta e outra planta. Esta variável foi determinada em número de infecção por contato entre planta sadia e planta doente por parcela.

### **Design estatístico e experimental das epidemias**

As epidemias de cada experimento (1, 2 e 3) foram analisadas separadamente, onde cada epidemia foi considerada independente. As variáveis foram determinadas sempre de 40 plantas centrais de cada ponto avaliado (parcela), e estes foram determinados de maneira aleatória no talhão de cada área experimental.

Para maior uniformidade dos dados foi excluída a sexta avaliação, pois a área 1 só foram coletados dados de cinco avaliações de incidência e severidade. As variáveis mensuradas foram determinadas de acordo com os dados coletados sempre no mesmo parcela em todas as avaliações, cada parcela foi marcada com uma bandeirinha e a primeira planta a iniciar a avaliação de incidência e severidade foi marcada com um barbante, garantindo assim que as avaliações ocorressem sempre nas mesmas plantas.

### **Análises das epidemias de mofo-branco**

#### **Processamento dos dados**

Todos os resultados das 52 epidemias (15 epidemias da área 1, 18 epidemias da área 2 e 19 epidemias da área 3) foram analisados estatisticamente e o progresso da doença foi determinado individualmente para cada epidemia.

#### **Análise Temporal das curvas de progresso da doença**

Foram construídas as curvas de progresso da doença das cinco avaliações de incidência e severidade da doença entre 66 e 107 DAP. Algumas outras variáveis (Geraldine, 2014) foram estimadas para incidência:

*Menor valor não nulo (zero) de incidência da doença ( $I_{min}$ );*

*Incidência máxima observada ( $I_{max}$ );*

*Inclinação máxima da curva de progresso da incidência ( $I_{slope}$ );*

*Área abaixo a curva de progresso de incidência (AACPI);*

Foram calculadas as seguintes variáveis a partir da curva de progresso da severidade:

*Menor valor não nulo (zero) de severidade da doença ( $S_{min}$ );*

*Severidade máxima observada ( $S_{max}$ );*

*Inclinação máxima da curva de progresso da severidade ( $S_{slope}$ );*

*Área abaixo a curva de progresso de severidade (AACPS);*

Foram determinadas equações com parâmetros de modelos lineares e estimado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para cada epidemia. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram estimados para cada modelo de curva de progresso individualmente nas epidemias de mofo branco utilizando o Microsoft Excel. O método (retângulo) de Euler (CAMPBELL, C. L.; MADDEN, 1990) foi utilizado para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença, para as variáveis incidência e severidade das 52 epidemias.

### **Análises de dispersão e regressão**

A análise de dispersão é uma representação gráfica que analisa a relação entre duas variáveis quantitativas — uma de causa e uma de efeito. Assim, gráficos de dispersão foram feitos e as análises de regressão foram construídas para visualizar e analisar o comportamento e a velocidade de ocorrência de cada epidemia.

### **Análise de Cluster**

Foi realizado o método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e distância euclidiana pela análise de cluster para classificar as epidemias de mofo-branco em grupos. Preliminarmente foi realizada uma análise com todas as variáveis relacionadas a curva de progresso da doença (Avaliações de incidência 3, 4 e 5,  $I_{min}$ ,  $I_{max}$ ,  $I_{slope}$ , AACPI, Avaliações de severidade 3, 4 e 5,  $S_{min}$ ,  $S_{max}$ ,  $S_{slope}$  e AACPS) (Figura 1). Uma segunda análise de cluster foi feita para gerar grupos de similaridade semelhante a primeira análise, porém com um número reduzido de variáveis. Nesta, foram utilizados os dados das avaliações das três últimas avaliações de incidência e severidade ( $I_3, I_4, I_5, S_3, S_4$  e  $S_5$ ) (Figura 2). Foi utilizado o software PAST®, Versão 1.0.0.0 (Paleontological Statistics). Esta redução de variáveis foi realizada para determinar se o resultado seria o mesmo para as duas análises

### **Análise Discriminante**

A análise discriminante teve como objetivo identificar as principais variáveis que caracterizaram os grupos epidêmicos separados pela análise de cluster hierárquica. E determinar a porcentagem de correção em que cada epidemia foi alocada pela análise de cluster.

Uma análise discriminante envolvendo as variáveis que caracterizam as 52 epidemias foi realizada para verificar se as epidemias pertencem aos grupos epidêmicos alocadas pela análise de Cluster, considerando a classificação Jackknifed, e valores de Lambda de Wilk. Foi utilizado as variáveis da segunda análise de Cluster na análise discriminante realizada no software SYSTAT-versão13.2.

## **Resultados e discussão**

### **Densidade de escleródio nas áreas experimentais**

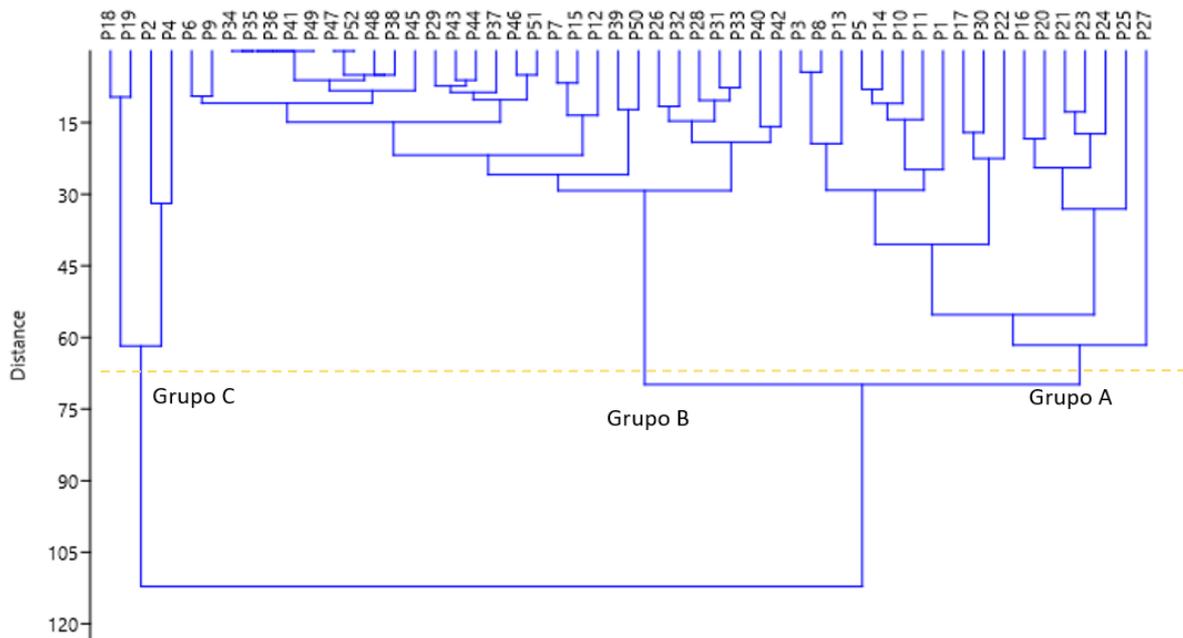
A presença de escleródios foi confirmada nas três áreas. Nas áreas 2 e 3 foi quantificado 54 escleródios/m<sup>2</sup>. Com a confirmação da presença dos escleródios nas áreas foi possível o início da implantação do experimento e demarcação das epidemias na lavoura de soja. Na área 1 não foi realizada quantificação por ser uma área infestada artificialmente.

### **Análise de Cluster das Epidemias de mofo-branco**

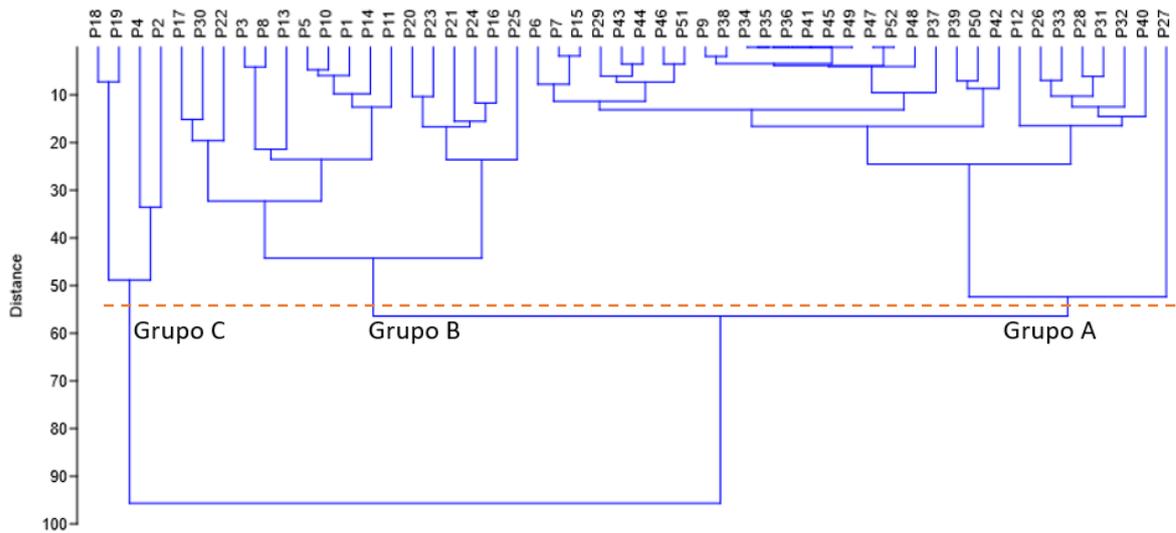
A análise pelo método hierárquico de cluster utilizando os dados de incidência e severidade (I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub>, I<sub>5</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> e S<sub>5</sub>) classificou em três grupos (A, B e C) distintos as 52 epidemias de mofo-branco (Figura 2) através do ponto de corte pelo método de Mojema.

Os grupos de epidemia A, B e C foram separados pela análise de cluster de acordo com a similaridade dos grupos, com 30, 18 e 4 epidemias, respectivamente para a segunda análise de cluster. Enquanto na primeira análise de cluster (Figura 1) utilizando as variáveis de avaliações de incidência 3, 4 e 5, I<sub>min</sub>, I<sub>max</sub>, I<sub>slope</sub>, AACPI, avaliações de severidade 3, 4 e 5, S<sub>min</sub>, S<sub>max</sub>, S<sub>slope</sub> e AACPS, o número de epidemias foi idêntico aos grupos formados na segunda análise de Cluster (utilizando um número reduzido de variáveis). A separação das epidemias na análise com todas as variáveis e na análise com número de variáveis reduzidas teve similaridade de 100%.

Assim, possibilitando a análise ser realizada com número reduzido de variáveis e obtendo o mesmo resultado. O coeficiente de correlação cofenético mede o grau de distorção da distância resultante do agrupamento em relação às distâncias originais, para as análises de cluster o coeficiente foi de 0,839. Em um estudo similar com os propágulos e agrupamento de epidemias de mofo-branco na cultura do feijão, Geraldine (2015) obteve um resultado de 87% de similaridade entre análise de cluster utilizando os dois tipos de análise (uma com número maior de variáveis e uma análise com número de variáveis reduzidas).



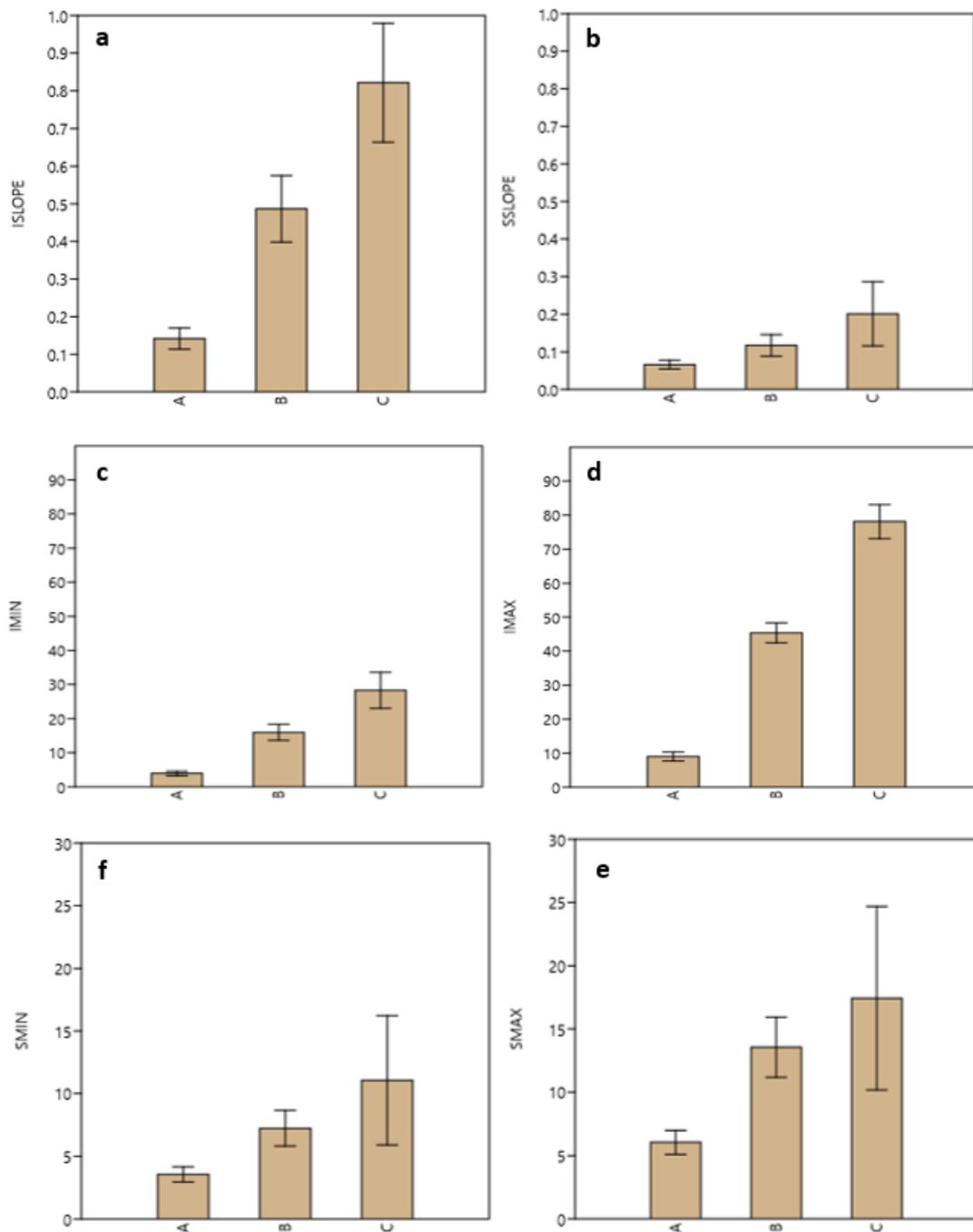
**Figura 1.** Primeira análise hierárquica de cluster para agrupamento de 52 epidemias de mofo-branco. Cluster gerado utilizando os dados de três últimas avaliações de incidência e severidade da doença ( $I_3, I_4, I_5, S_3, S_4$  e  $S_5$ ), incidência e severidade mínima e máxima ( $I_{min}, I_{max}, S_{min}$  e  $S_{max}$ ) e inclinação da reta de incidência e severidade da doença ( $I_{slope}$  e  $S_{slope}$ ) para formação dos grupos de epidemia.



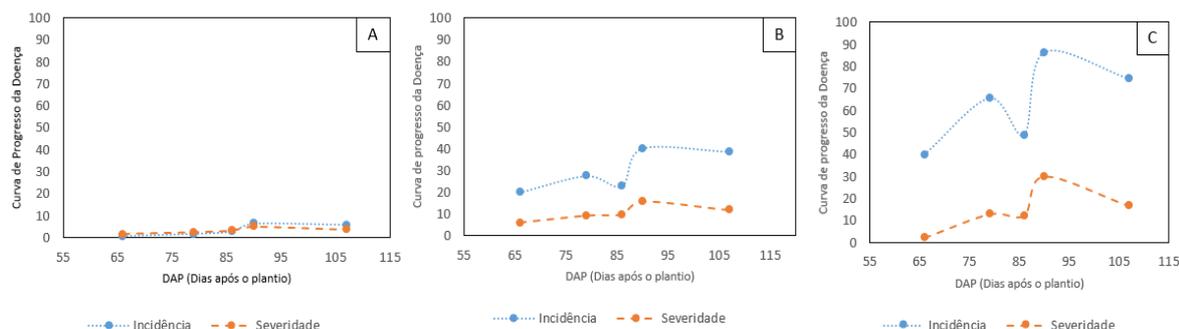
**Figura 2.** Segunda análise hierárquica de cluster para agrupamento de cinquenta e duas epidemias de mofo-branco. Cluster gerado utilizando os dados de três últimas avaliações de incidência e severidade da doença ( $I_3$ ,  $I_4$ ,  $I_5$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  e  $S_5$ ) para formação dos grupos de epidemia.

### Características dos grupos epidêmicos formados

O grupo epidêmico A foi caracterizado por curvas de progresso de incidência e severidade com início da doença a partir de 66 dias após o plantio da soja e uma inclinação da curva de progresso baixa e constante. A incidência média e as curvas de progresso da severidade média aumentam muito pouco quando comparado aos grupos B e C (Figura 4. A). A equação que demonstra a inclinação da curva para esse grupo epidêmico é  $y = 0,1471x - 9,2487$  e  $y = 0,0614x - 2,11$ . E possui um  $R^2=0,73$  e  $R^2=0,473$  para incidência e severidade, respectivamente.



**Figura 3.** Diferenças entre variáveis da curva de progresso do mofo branco da soja em função dos grupos epidêmico (A, B e C) gerados a partir da análise de agrupamento hierárquico das cinquenta e duas epidemias. a: inclinação da curva de incidência, b: inclinação da curva da severidade, c: incidência mínima, d: incidência máxima, e: severidade mínima e f: severidade máxima. Representação gráfica utilizando o erro padrão.



**Figura 4.** Curvas de progresso da doença resumidas pela média de cada grupo epidêmico agrupado na análise de cluster com as 52 epidemias de mofo-branco. As figuras A, B e C representam os grupos epidêmicos A, B e C, respectivamente.

O grupo A também é caracterizado por um valor máximo de incidência ( $I_{max}$ ) de 0,08 ou 8% e por um valor não nulo de incidência mínima ( $I_{min}$ ) de 3% plantas doentes por parcela (Figura 3d e c). A inclinação máxima mais baixa da curva de progresso de incidência entre os grupos foi ( $I_{slope} = 0,14$ ) no grupo A (Figura 3a). Este grupo também apresentou o menor valor médio de severidade não nula ( $S_{min}$ ) de 3% e um valor médio de  $S_{max}$  de 0,06 ou 6% de folhagem doente por parcela (Figura 3f, e).

Boland (1987) considerou que algumas infecções secundárias podem se desenvolver pela disseminação do micélio de tecidos doentes para tecidos saudáveis, mas foi considerado no trabalho que o processo de infecção secundária é responsável pela menor porção da dinâmica de mofo-branco. Com isto, este trabalho mostrou que os três grupos (A, B e C) apresentaram este tipo de infecção, porém, as epidemias do grupo de taxa de desenvolvimento lento (grupo A) apresentou as menores taxas de infecção secundária. Enquanto o grupo C (taxa de alto desenvolvimento da doença) apresentou a maiores incidências da doença e conseqüentemente o maior número de infecção secundária. Geraldine (2015) concluiu que infecções secundárias raramente ocorrem em grupos de epidemia com baixa/lenta taxa de desenvolvimento, para a doença mofo-branco na cultura do feijão.

A curva de progresso da doença para grupo epidêmico B mostrou um aumento regular desde o início da incidência da doença até a incidência da última avaliação (66 a 107 DAP), exceto por redução na incidência em 86 DAP, que pode ser explicada devido a perda de material vegetativo doente das plantas avaliadas nesse período, o que não influenciou no acréscimo no progresso da doença em 90 e 107 DAP. Não foi verificada diferença significativa pelo teste t para a médias avaliadas de incidência entre 79 e 86

DAP (Figura 4B). O grupo B é caracterizado por uma inclinação da curva de progresso de incidência e severidade intermediária (Figura 3a, b) quando comparado ao grupo A e C.

A inclinação da curva de progresso da doença do grupo epidêmico B é demonstrado nas equações  $y = 0,4886x - 12,118$  e  $y = 0,1659x - 3,7985$ , com  $R^2=0,63$  e  $R^2=0,45$  para incidência e severidade, respectivamente (Figura 3a, b).

O grupo B possui um valor máximo de incidência ( $I_{max}$ ) de 0,45 ou 45% e um valor não nulo de incidência mínima ( $I_{min}$ ) de 0,15 ou 15% de plantas doentes por parcela (Figura 3d, c). Este grupo quando associado ao grupo C apresentou a menor severidade não nula ( $S_{min} = 0,07$  ou 7%) e valor médio de  $S_{max}$  de 0,13 ou 13% de planta doente por parcela (Figura 3f, e).

O agrupamento C foi gerado pela análise de cluster com o menor número de epidemias (composto por quatro epidemias). Neste grupo foi observado os maiores valores de inclinação da curva do progresso da doença e indicou o grupo com a maior velocidade de desenvolvimento da doença, seguido pelo grupo B (com velocidade de desenvolvimento moderado) e o grupo A (com velocidade de desenvolvimento baixa) (Figura 3a, b).

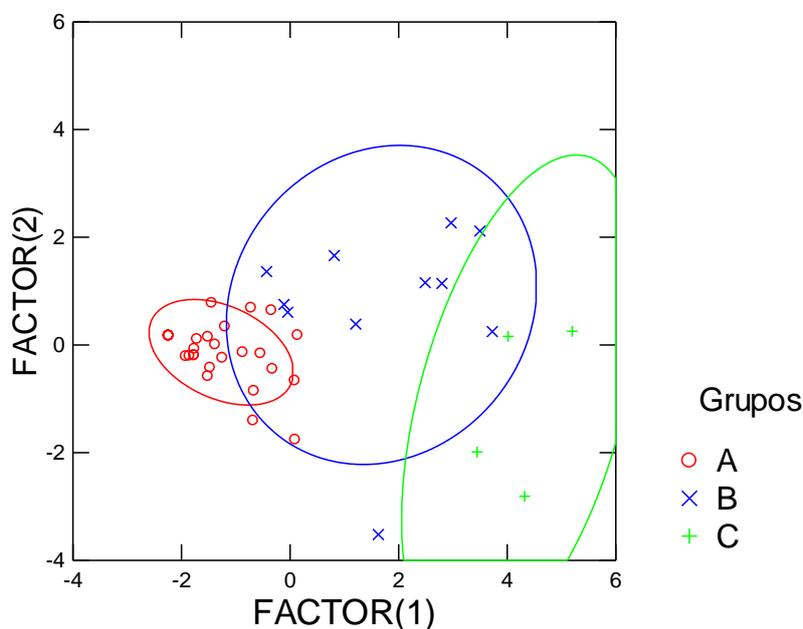
A incidência final no grupo C é a mais alta entre todos os grupos, com epidemias atingindo até 87% das plantas infectadas. A análise da função discriminante revelou que a inclinação da curva de progresso de incidência ( $I_{slope}$ ) foi o parâmetro mais importante para categorizar os grupos epidêmicos, que possui valor 0,85 na função discriminante 1 (F1) (Figura 5) (Tabela 2). Este grupo apresentou os maiores valores de incidência mínima não nula e incidência máxima ( $I_{min} = 0,28$  ou 28% e  $I_{max} = 0,78$  ou 78%) quando comparado aos grupos A e B (Figura 3c, d).

Ao considerar a área abaixo da curva de progresso da doença, o grupo A foi o que obteve a menor valor (169,76); seguido dos valores 1156,94 e 2303,24 para os grupos B e C, respectivamente.

### **Análise discriminante**

Ao considerar a classificação Jackknifed das três variáveis utilizadas na análise discriminante: Infecção secundária (contato planta-planta), incidência mínima ( $I_{min}$ ) e Inclinação da curva de progresso de incidência ( $I_{slope}$ ) foi caracterizado o percentual correto em que cada epidemia foi alocada na análise de cluster das epidemias em cada grupo.

No grupo A (de 28 epidemias agrupadas) a análise discriminante determinou que 27 epidemias foram alocadas corretamente (96% correto), no grupo B (de 18 epidemias agrupadas) a análise discriminante determinou que 6 epidemias foram alocadas corretamente (o modelo está correto em 55% neste grupo) e no grupo C de 4 epidemias alocadas pelo Cluster, 3 epidemias foram alocadas no grupo certo, mostrando que o modelo está correto em 75% (Figura 5) (Tabela 2). As epidemias com dados faltantes (por perda de parcela ou informação) foram desconsideradas pelo software para maior confiabilidade da análise discriminante, por isso o resultado da análise mostra 28, 11 e 4 epidemias para os grupos A, B e C, respectivamente e não foi demonstrado de acordo com as epidemias total da análise de cluster, sendo 30, 18 e 4 epidemias, para os grupos A, B e C.



$$F_Z = 0,85 I_{slope} + 0,844 I_{min} + 0,086 I_{fec}$$

$$F_X = 0,097 I_{slope} - 1,047 I_{min} + 1,207 I_{fec}$$

**Figura 5.** Análise discriminante das variáveis experimentais em função de grupos gerados a partir da análise de agrupamento hierárquico de 52 epidemias de mofo-branco. As funções discriminantes foram determinadas em função da Infecção secundária, Incidência mínima ( $I_{min}$ ) e inclinação da curva de incidência ( $I_{slope}$ ).

A estatística Lambda de Wilk foi usada para o teste multivariado de dispersão entre todos os grupos em todas as variáveis. Lambda varia de 0 a 1, com 0 significando que as médias do grupo diferem, e 1 significando que todas as médias do grupo são iguais. Um valor Lambda de 0,165 foi encontrado, indicando que as médias dos grupos se diferem ( $P < 0,01$ ) na função discriminante (Figura 5).

**Tabela 1.** Funções discriminantes canônicas padronizadas por variações internas. Usando Infecção secundária (Infec), Incidência mínima (Imin) e Inclinação da curva de incidência (Islope).

Fatores	Função discriminante	
	F1	F2
Infec	0,086	1,207
Imin	0,844	-1,047
Islope	0,85	0,097

**Tabela 2.** Matriz de classificação Jackknifed de análise discriminante realizada com 52 epidemias de mofo branco de soja usando as seguintes variáveis experimentais: Infecção secundária (Infec), Incidência mínima (Imin) e Inclinação da curva de incidência (Islope).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	% correto
Grupo A	27	1	0	96
Grupo B	3	6	2	55
Grupo C	0	1	3	75
<b>Total</b>	30	8	5	84

\*Os grupos A, B e C indicam grupos de epidemia de baixa, moderada e alta intensidade, respectivamente

## Conclusões

Os propágulos do patógeno e as características de desenvolvimento da epidemia influenciam no manejo da doença. Assim, características no desenvolvimento, como velocidade de ocorrência aumenta ou reduz a taxa de incidência e severidade.

Neste trabalho foram de epidemia (grupo A, B e C). O grupo em que as epidemias possuem a menor velocidade de desenvolvimento foi grupo A, e neste foram agrupadas 30 epidemias. No grupo C foram agrupadas epidemias de desenvolvimento rápido, composto por 18 epidemias. O modelo se ajustou em 96% corretamente para epidemias alocadas no grupo A, 55% para epidemias acopladas no grupo B e 75% para epidemias acopladas no grupo C.

## Referências bibliográficas

- AGRIOS, N.G. **Plant Pathology**. 5 th ed. Florida: Elsevier, 2005. p.546-550
- BOLAND, G. J. Evaluating Soybean Cultivars for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v. 71, n. 10, p. 934, 1987.
- BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, British, v.7, n.1, p.1-16, 2006.
- DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, n. 3, p. 297–300, 2004.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; CARES, J. E., ARAÚJO, J.C.A. de; ANGELO, P.C. da S. Glossário de fitopatologia. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 431p.
- HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 946–950, 2006.
- MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. Ensaios cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja. Londrina: EMBRAPA, 2014. 100 p.
- PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic Germination of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* after Periods of Conditioning in Soil. *Journal of Phytopathology*, v. 116, n. 3, p. 247–258, jul. 1987.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 16, n. 2, p. 93–108, jun. 1994.
- GERALDINE, A. M. Modelling propagule effects in bean white mould epidemics. Brasília: Universidade de Brasília, 6 nov. 2015.

## CAPÍTULO 2

### Resumo

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, outubro de 2020. Otimização de métodos de extração de DNA de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja para detecção via qPCR. Orientador: Dr. Alaerson Maia Geraldine, Coorientador: Dr. Leonardo de Castro Santos, Coorientador: Dr. Eugenio Miranda Sperandio

O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) encontra-se presente na maioria das regiões produtoras de soja do Brasil e a principal via de infecção são pelos ascósporos do nos tecidos florais. Considerando a importância da detecção rápida e eficiente de ascósporos de *S. sclerotiorum* no campo, este estudo avaliou três métodos de extração de DNA de ascósporos de *S. sclerotiorum* para otimização da detecção via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa (qPCR). Os ascósporos foram obtidos com auxílio de coletor de esporos automático (Burkard) na safra 2016/17 em lavoura comercial de soja infestada com escleródios de *S. sclerotiorum*. Para a escolha e otimização da metodologia, o DNA de cada amostra foi extraído e aferida a sua quantidade via qPCR. A curva padrão foi determinada a partir de amostras de ascósporos coletadas no laboratório. O método de extração de Kurtgma & Fell (1998) e Reader & Broda(1985) foi o mais eficiente na extração de DNA de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de ascósporos. A otimização da detecção e quantificação de ascósporos por meio da qPCR são práticas úteis para orientar medidas preventivas e no manejo do mofo branco da soja, além de auxiliar no desenvolvimento modelos de previsão de doença.

**Palavras-chave:** Mofo branco, *Glycine max*, bioaerossol, inóculo, detecção molecular, qPCR.

### Abstract

SOUZA, EIDE P. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, October, 2020. Optimization of real-time PCR ascospore detection method. Advisor: Alaerson Maia Geraldine, Advisor: Leonardo de Castro Santos, Co-advisor: Eugenio Miranda Sperandio

White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) is present in most of the soy producing regions of Brazil and the main route of infection is through the ascospores of our floral tissues. Considering the importance of rapid and efficient detection of *S. sclerotiorum* ascospores in the field, this study evaluated four methods of extracting DNA from *S. sclerotiorum* ascospores to optimize quantitative detection via PCR (Polymerase Chain Reaction) (qPCR). The ascospores were obtained with the aid of an automatic spore collector (Burkard) in the 2016/17 harvest in a commercial soybean crop infested with *S. sclerotiorum* sclerotia. Four methods of DNA extraction were tested. For the choice and optimization of the methodology, the DNA of each sample was extracted and its quantity was measured via qPCR. The standard curve was determined from samples of ascospores collected in the laboratory. The Kurtgma & Fell (1998) and Reader & Broda (1985) extraction method was the most efficient in extracting DNA from *Sclerotinia sclerotiorum* from ascospores. Optimizing the detection and quantification of ascospores using qPCR are useful practices to guide preventive measures and the management of soybean white mold, as well as assist in the development of disease prediction models.

**Key words:** white-mold, *glycine max*, bioaerosol, inoculum, molecular detection, qPCR.

## Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causal da doença conhecida como mofo-branco, podridão da esclerotínia ou murcha da esclerotínia. Na cultura da soja (*Glycine max*), o patógeno pode reduzir drasticamente o rendimento de grãos quando encontra condições ambientais favoráveis. No Brasil o mofo branco é considerado a segunda doença fúngica mais importante da cultura da soja (WRATHER et al., 2001; WRATHER & KOONING 2006), com estimativas de perdas anuais de até US\$ 1,47 bilhão (LEHNER et al., 2016). Na safra 2018/2019, a área cultivada de soja brasileira infestada com *S. sclerotiorum* foi estimada em 28% ou mais de 10 milhões de hectares (MEYER et al., 2019).

O patógeno produz escleródios, estruturas de resistência que podem se manter viáveis no solo por muitos anos e, ao encontrarem condições favoráveis de umidade e temperatura, germinam carpogenicamente produzindo os apotécios (BOLTON et al., 2006). Cada escleródio pode produzir mais de um apotécio, que por sua vez dão origem a cerca de dois milhões ascósporos, que são ejetados e se dispersam pelo vento (SCHWARTZ & STEADMAN 1978; STEADMAN 1983; CLARKSON et al. 2003).

O estágio mais vulnerável da soja à infecção por *S. sclerotiorum* acontece da floração plena (R2) ao início da formação dos grãos (R5) (DANIELSON et al., 2004). Neste período, os ascósporos ao serem lançados e disseminados pelo vento, encontram pétalas de soja, se aderem, germinam e penetram no tecido da pétala, iniciando a infecção. Após instalada no campo a doença é espalhada por meio da senescência e queda destas flores infectadas em folhas, caules e vagens de soja (PURDY 1979; JAMAUX et al. 1995; CLARKSON et al. 2003).

Como estratégias de manejo integrado do mofo branco em soja têm se recomendado a integração da rotação com plantas não hospedeiras, fungicidas químicos e biológicos e outras práticas culturais (KURLE et al. 2001; GÖRGEN et al. 2009; PELTIER et al. 2012; GERALDINE et al. 2013). Para um controle químico eficiente, a aplicação deve ser preventiva e capaz de atingir as flores durante o período de florescimento da cultura da soja, coincidindo com a liberação de ascósporos pelo patógeno. Por esse motivo, a detecção precoce da presença de ascósporos na área é de extrema importância na tomada de decisão preventiva para o controle da doença, haja vista que a erradicação do fungo é muito difícil uma vez estabelecida a infecção e posterior produção de escleródios.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa, conhecida como qPCR, é amplamente utilizada na detecção e quantificação de fitopatógenos (ROGERS et al. 2009; JONES et al., 2015). Com a vantagem de ser um método específico e de grande repetibilidade, a qPCR detecta rapidamente ascósporos de *S. sclerotiorum* do bioaerosol, reduzindo o tempo para confirmação da presença de inóculo (PARKER et al., 2012). A técnica de PCR quantitativa é mais sensível em relação ao PCR convencional, além de ter a vantagem de fornecer dados sobre presença e quantidade do DNA nas amostras (ZIESMAN et al., 2015). Neste contexto, detectar a presença de ascósporos, antes ou durante o florescimento da soja, de uma forma rápida, pode ser uma ferramenta eficaz para o monitoramento e direcionamento das aplicações dos agroquímicos visando o manejo de *S. sclerotiorum*. Visando a utilização da técnica de qPCR para detecção de ascósporos de *S. sclerotiorum* do bioaerosol nas condições do Centro-Sul brasileiro. Objetivou-se neste estudo comparar três métodos de extração de DNA de ascósporos de *S. sclerotiorum* do bioaerosol de lavouras de soja para otimização da detecção do fungo via qPCR.

## **Material e Métodos**

### *Área experimental*

As coletas das amostras de ascósporos para extração do DNA foram realizadas em área comercial de soja naturalmente infestada por escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, localizada no município de Montividiu, Goiás, Brasil (17°28'52.8"S, 51°15'16.0"W). A área possui histórico de sucessão soja/milho. A infestação inicial da área foi determinada pela metodologia descrita por Jaccoud-Filho et al. (2010) (descrito no capítulo 1) com uma média de 55.5 escleródios.m<sup>-2</sup>.

### *Coletas de amostras de ascósporos em lavoura de soja*

As coletas das amostras de ascósporos foram realizadas no ano safra 2016/2017, com o auxílio de um coletor de esporos automático Multi-Vial Cyclone Sampler (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, United Kingdom) (disponibilizado pelo professor Dr. Café Filho, A.C da Universidade Federal de Brasília). O coletor de esporos foi instalado em área comercial de produção de soja no período que coincidiu com o período reprodutivo (início do florescimento R1/R2). O coletor Burkard é um amostrador volumétrico de ar contínuo com orientação do vento usando um único ciclone em

miniatura de fluxo reverso. Neste dispositivo o bioaerosol é coletado diretamente em microtubo de Eppendorf 1.5 ml. A alimentação do sistema é realizada por um painel solar acoplado ao coletor e ao painel de controle. Foram realizadas coletadas semanais, sendo ao final de três semanas um total de 45 amostras (tubos) coletados. Os tubos coletados foram logo em seguida armazenados em freezer a -20°C, até o momento da extração do DNA. Este método foi utilizado para testar os reagentes de extração e de Qpcr, utilizando material biológico (micélio de apotécio de *S. sclerotiorum*) produzidos no laboratório.

#### *Método Dellaport, 1993 (modificado)*

Este método foi utilizado para testar os reagentes de extração e de Qpcr, utilizando material biológico (escleródio e apotécio de *S. sclerotiorum*) produzidos no laboratório.

Este método foi utilizado devido a sua facilidade para extração de DNA de diversos fungos. Assim, os apotécios e escleródios de *S. sclerotiorum* foram macerados em cadinho com auxílio de pistilo e uso de nitrogênio líquido. Os materiais foram transferidos para diferentes microtubos de 2 ml. Foi adicionado 500 µl do tampão de extração Dellaport (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50mM, NaCl 500mM com pH ajustado para 8). Os microtubos foram agitados em vórtex por 2 min, e adicionou se 30 µl de CTAB 20%, agitando novamente por 2 min em vórtex. Os microtubos foram incubados a 65°C por 30 min em banho maria, agitando-os a cada 10 min. As amostras foram retiradas do banho-maria e secos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 150 µl de acetato de potássio (5M) e agitou-se em vórtex por 2 min. Foram centrifugadas a 14000 rpm, a 25°C, por 10 min. O sobrenadante foi retirado (~400 µl) e transferido para um novo microtubo. Foi então adicionado 300 µl de isopropanol e os microtubos invertidos suavemente 50 vezes para homogeneizar. As amostras foram levadas para centrifuga a 14000 rpm a 25°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 500 µl de etanol 70% e os microtubos centrifugados por 30 s entre as lavagens. Esse procedimento foi realizado por duas vezes. Após, adicionou se 250 µl de álcool absoluto e centrifugado por 5 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram secos a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspendidas em 50 µl de água ultra pura e armazenada em freezer -20 °C.

O DNA das amostras utilizadas para testar os protocolos foram extraídos diretamente dos microtubos retirados do coletor de esporos. Foram testados três métodos de extração de DNA dos ascósporos. O método que apresentasse melhor qualidade e

quantidade de DNA extraído, se tornaria o protocolo padrão a ser utilizado na extração de todas as amostras. A pureza do DNA extraído foi analisada em um NanoDrop Espectrofotômetro (Thermo Scientific) ajustando os valores de rendimento em  $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e razão de absorbância A260/A280. A integridade foi determinada com base na visualização através de gel de agarose a 1,2% eletroforese em tampão TBE, em que foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  de RNA (acima de 10  $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) em água Milli-Q.

### *Métodos de Extração do DNA*

Para verificar qual método seria aplicado para extração de DNA total das amostras de ascósporos, três métodos foram inicialmente testados. Os métodos testados foram:

#### *Método 1 - PowerSoil DNA Isolation Kit*

Este kit é destinado a extração de amostras de solo. E foi utilizado pois as amostras coletadas em campo continham alta quantidade de solo aderidos a amostra de ascósporos.

Inicialmente adicionou-se 60 $\mu\text{L}$  da solução C1, misturado com auxílio de vórtex em velocidade máxima por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 30s. O DNA retido no sobrenadante foi transferido cuidadosamente para microtubos de 2mL onde adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  da solução C2 e agitou-se por 5s em vórtex. Em seguida as amostras foram incubadas a 4°C por 5 min, seguido de centrifugação por 1 min a 10.000g. Evitando-se o *pellet*, 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2 mL. Após a adição de 200  $\mu\text{L}$  da solução C3, as amostras foram ligeiramente misturadas com auxílio do vórtex e incubadas a 4°C por 5 minutos em geladeira e posteriormente centrifugadas a 10.000g por 1 min. Após, transferiu-se 750  $\mu\text{L}$  do sobrenadante em um microtubo de 2 mL para agitação e posteriormente adicionado 1200  $\mu\text{L}$  da solução C4 ao sobrenadante, seguido por agitação no vórtex por 5 seg. Aproximadamente 650  $\mu\text{L}$  foi adicionado ao filtro de rotação (Spin Filter) e centrifugado por 1 min a 10.000 g. O fluxo foi descartado e o restante do sobrenadante foi adicionado no Spin filter e centrifugado novamente por 1 min a 10.000g. Esta etapa foi repetida por três vezes. Foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução C5 e foi centrifugado por 30 seg à 10.000 g. Após descartado o fluxo, foi centrifugado novamente por 1 min. Cuidadosamente o Spin Filter foi colocado em um novo tubo, evitando derramar a solução C5 no filtro. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução C6 no centro da membrana do filtro branco, e então foi centrifugado por 30 seg à 10.000 g.

O Spin filter foi descartado e o DNA extraído armazenado em freezer (-20° a -80°C) até utilização.

*Método 2 - Extração de DNA de Leveduras (Kurtgma & Fell, 1998; Reader & Broda, 1985)*

Adicionou-se aos microtubos retirados do coletor 200 µl de tampão de extração (2% CTAB, Tris-HCL 100 mM (pH 8), NaCl 1.4 mM e 20 mM EDTA) e agitado em vórtex. Em seguida adicionou-se aproximadamente 5mg de beads de vidro e homogeneizado em alta velocidade no vórtex. Os microtubos foram incubados em banho-maria para incubar a 65°C por 30 minutos, onde a cada 10 minutos as amostras eram homogeneizadas em vórtex. Foi adicionado 400 µl de clorofórmio:álcool isoamilico (24:1) e agitado no vórtex até homogeneizar. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 1300rpm durante 15 min. O sobrenadante foi retirado tombando levemente os microtubos em novos microtubos autoclavados. Foi acrescentado 400 µl de isopropanol, e com auxílio do vórtex, homogeneizado em baixa velocidade, levando-os ao freezer por 1 h. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm por 7 min. O isopropanol foi descartado inclinando os microtubos levemente preservando o pellet, posteriormente deixando-os abertos para secar por aproximadamente 10 min. Adicionou-se em seguida 400 µl de etanol 70% e centrifugou-se por 7 min a 13000 rpm. O etanol foi descartado, deixando novamente apenas o pellet, e foi pipetado 30 µl de água ultra pura autoclavada. O DNA extraído foi armazenado em freezer -20°C até o momento de sua utilização.

*Método 3 - Adaptado de Reader & Broda, 1985*

Foi adicionado 150 µl de tampão de extração (TE) aos microtubos contendo as amostras de ascósporos e em seguida homogeneizada. Adicionou-se 350 µl de fenol, sendo levemente homogeneizado. Foi acrescentado 150 µl de clorofórmio homogeneizando a solução levemente a solução até apresentar aspecto turvo. As amostras foram centrifugadas a 11800 rpm a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante (até 750 µl) foi transferido para outro tubo de 1,5mL, incubou-se a 37°C por 15 minutos. Foi adicionado 10 unidades de clorofórmio e homogeneizado completamente. Foi centrifugado a 1300 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo de 1,5mL. O DNA foi precipitado com 54 µl do volume do isopropanol e homogeneizado. Por 2 minutos foi homogeneizado em velocidade total na centrífuga. Colocou-se 200 µl de

etanol 70% gelado e centrifugou se novamente. O etanol foi descartado, deixou se apenas o pellet de DNA; este passo foi realizado novamente. Secou-se totalmente o pellet a temperatura ambiente. O pellet foi ressuscitado em 50 µl de água e armazenado em freezer -20°C.

#### *Preparo de reagentes para qPCR*

A qPCR foi realizada utilizando o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen™). Inicialmente foram preparados dois mix de reação: 1° Mix - foi adicionado em um tubo de 1.5mL: 5,2 µl de corante fluorescente SYBR green, 0,2 µl de primer forward, 0,2 µl de primer reverse; 2° Mix – Em um microtubo de 1.5mL foi pipetado adicionado 3.4 µl de água ultra pura autoclavada e 1 µl do DNA extraído. Os primers utilizados na qPCR foram Mit(i)\_Ss-F (5'-CGAAAGGCTATACGTGGCTGAAGT-3') e Mit(i)\_Ss-R (5'-TCCGCGATAATCCATTTCTCTTTC-3') (Parker, 2012). Com uma pipeta multicanal foi adicionado 5,6 µl do 1° Mix e 4,4 µl do 2° mix em cada poço da placa (96 poços) de qPCR. Como controle foi adicionado 4,4 µl de água ultra pura em três poços (sem DNA). O volume final de cada poço foi de 10 µl. Ao final da pipetagem, a placa de 96 poços MicroAmp® (Applied Biosystems) foi vedada com o adesivo transparente e fixado com auxílio de uma espátula. Foi utilizado o termociclador (7500 Fast, Applied Biosystems) para as reações de amplificação. As condições de amplificação e quantificação foram: desnaturação inicial a 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 1 s e anelamento por 30 s à 60°C. Os resultados da amplificação, quantidade de DNA e de ascósporos foram obtidos a partir do software Step one. A partir da curva padrão, obtida através de uma amostra de DNA com concentração conhecida, foi possível a quantificação absoluta de DNA das amostras.

#### *Suspensão de ascósporos e curva padrão de qPCR*

Foram realizadas duas extrações de DNA a partir de ascósporos de *S. sclerotiorum* na concentração de  $5 \cdot 10^4$ . Esses ascósporos foram coletados a partir de apotécios produzidos em laboratório sob condições controladas (fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25°C e umidade a capacidade de campo 60%). Após a extração, foi realizada a diluição seriada dos ascósporos com fator de diluição 1:10, em quatro diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). A coleta foi realizada com auxílio de uma bomba e um funil adaptado à uma bomba a vácuo, onde o ar, juntamente com os ascósporos que foram liberados a partir dos apotécios, foram coletados. A primeira extração foi realizada usando o Kit Mobio e a segunda extração foi realizada com o Protocolo de Extração de DNA de

Leveduras (Kurtzman & Fell, 1998; Reader & Broda, 1985). Para cada uma das concentrações, inclusive o tubo sem diluição ( $10^1$ ), foram pipetados três poços na placa de reação.

A diluição da curva padrão, foi estimado que: DNA sem diluição ( $10^1$ ) possui 50.000 ascósporos, a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) possui 5.000 ascósporos, a segunda diluição ( $10^{-2}$ ) possui 500 ascósporos, a terceira diluição ( $10^{-3}$ ) possui 50 ascósporos, e a quarta diluição ( $10^{-4}$ ) possui 5 ascósporos de *S. sclerotiorum*. Com a quantidade determinada de ascósporo da curva padrão foi possível se ter um valor conhecido do DNA e da quantidade de ascósporos das amostras de campo coletadas com coletor.

## Resultados

Dos três métodos testados, aquele que apresentou os melhores resultados foi escolhido para teste em outras 15 amostras de ascósporos coletados do bioaerossol de soja

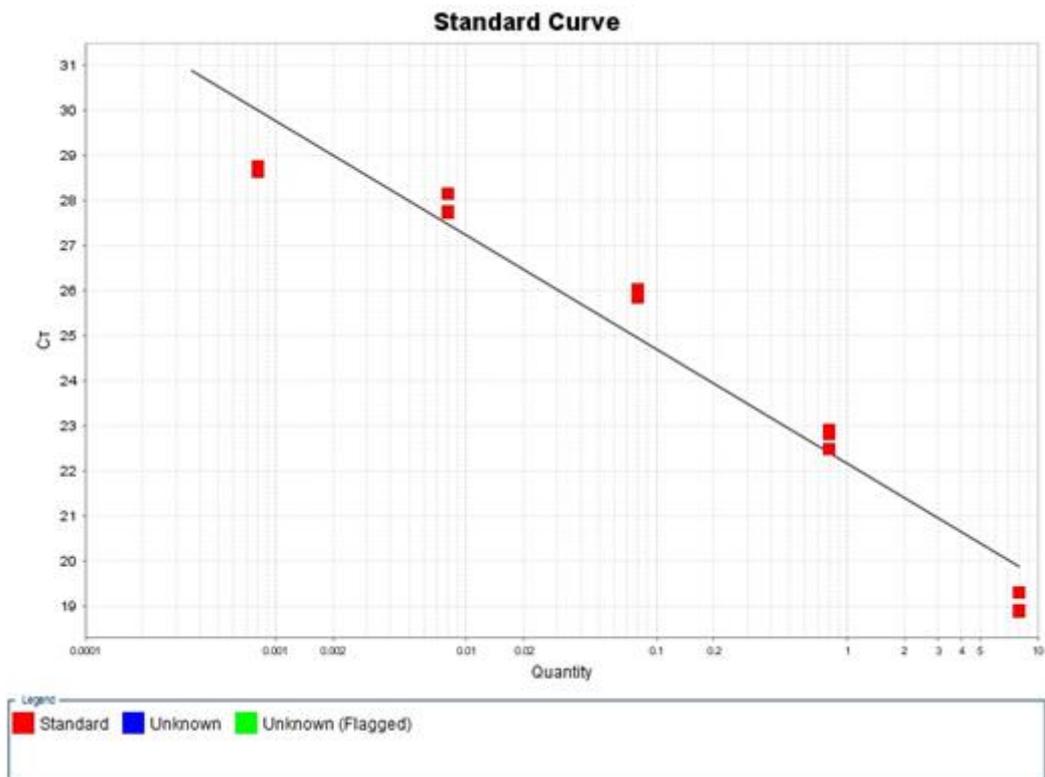
A concentração da suspensão de ascósporos produzidos em laboratório para a realização das extrações do DNA, foi ajustada para  $5 \times 10^4$  ascósporos.  $\text{mL}^{-1}$ . Em relação a quantificação do DNA realizada no equipamento NanoDrop, o mesmo apresentou baixas quantidades de DNA (como 2,4 ng/  $\mu\text{l}$  de DNA) (Tabela 1), o que indicava que provavelmente o método de extração do DNA não era um protocolo adequado para extração de DNA de ascósporos de *S. sclerotiorum*, devido a baixa quantidade de DNA extraído por estes protocolos e a contaminação no que foi extraído.

**Tabela 1.** Quantificação de DNA (ng/ $\mu\text{l}$ ) pelo espectrofotômetro NanoDrop.

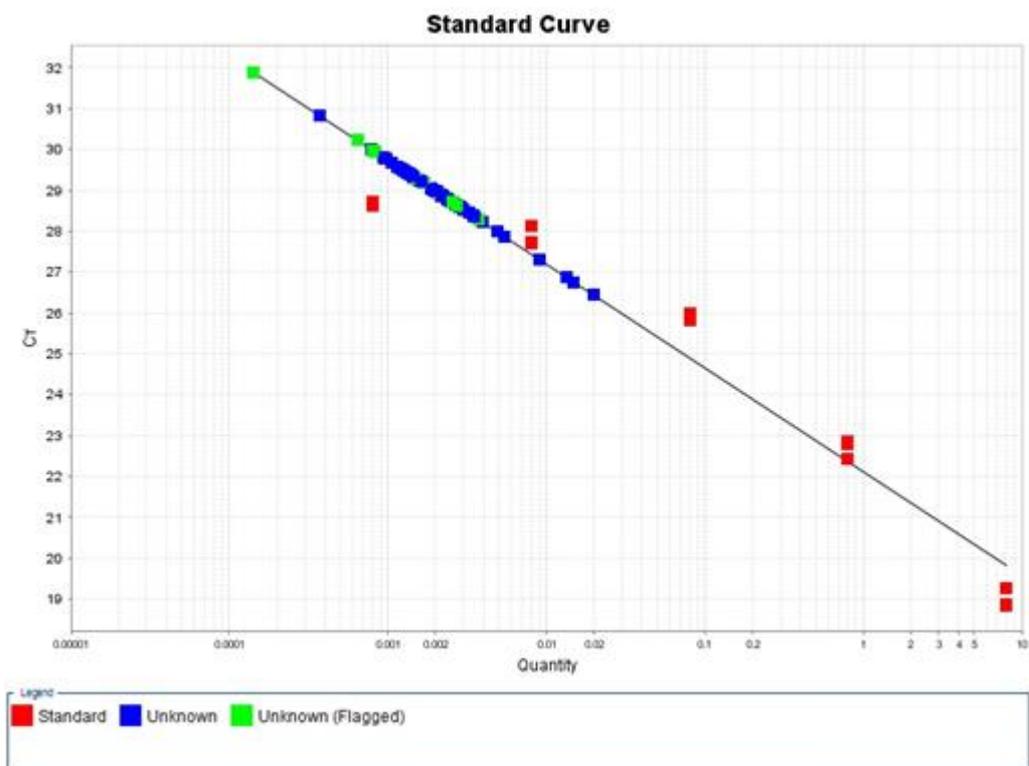
Métodos	ng/ $\mu\text{l}$	A260/A280	A260/A230
1	0,3	0,29	5,68
2	0,2	1,03	-0,11
3	2,6	1,04	0,37

Na primeira extração (com uso do Kit Mobio), a amostra A e B estavam na concentração  $5 \times 10^4$ , e amostra C  $6 \times 10^3$ . E as mesmas obtiveram 5 ng/ $\mu$ l de DNA. A segunda foi realizada com o Protocolo de Extração de DNA de Leveduras (Kurtgma & Fell, 1998; Reader & Broda, 1985) amostra D, a quantidade de DNA apresentada por este método de extração foi maior do que a do Kit Mobio, (8ng/  $\mu$ l de DNA). O que levou a utilização do DNA extraído pelo Protocolo Extração de DNA de Leveduras (Kurtgma & Fell, 1998; Reader & Broda, 1985) para a obtenção da curva de calibração.

Durante a amplificação, o software construiu em tempo real um gráfico relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo. A partir deste gráfico foi traçado uma linha paralela ao eixo referente ao número de ciclos, na altura em que foi iniciada a fase exponencial da amplificação (início da elevação exponencial na emissão da fluorescência). Este parâmetro representou o número mínimo de ciclos para amplificação, denominado “threshold” pelo software utilizado. O ponto em que o “threshold” cruzou com a linha de amplificação da amostra, permitiu determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra. Este valor é denominado Ct (Cycle Threshold) e permitiu a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras (Figura 1). Devido a comparação com os valores de DNA conhecidos da curva, foi obtido o coeficiente de determinação,  $R^2=0.94$  como mostra na Figura 2, onde esse valor foi proveniente da amplificação das reações correspondentes a curva padrão com os cinco pontos de diluição.



**Figura 1.** Relação entre Cycle Threshold (Ct) e a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras da Curva Padrão.



**Figura 2.** Relação entre Cycle Threshold (Ct) e a quantificação do DNA de cada uma das amostras coletadas de *Sclerotinia sclerotiorum* com  $R^2 = 0,94$

A quantidade de DNA apresentada inicialmente pelo equipamento nanodrop pelo protocolo de extração escolhido foi 8 ng/μl de DNA, e a partir deste e da quantidade de DNA na amplificação foi calculado a quantidade de ascósporos das amostras (Tabela 2).

**Tabela 2.** Estimativa de ascósporos em relação a quantidade de DNA amplificado.

Amostra	Concentração de DNA (ng/ μl)	Quantidade de Ascósporos
1	0,000445166	2,8
2	0,000663851	4,1
3	0,002818624	17,6
4	0,000540135	3,3
5	0,000425195	2,6
6	0,00049773	3,1
7	0,000420788	2,6
8	0,000427454	2,7
9	0,000579045	3,6
10	0,000282919	1,8
11	0,000204036	1,3
12	0,000368248	2,3
13	0,000554342	3,5

## Discussão

Este estudo avaliou três métodos de extração de DNA de ascósporos de *S. Sclerotiorum* do bioaerosol de lavouras de soja para otimização da detecção do fungo via

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa (qPCR). O ensaio mostrou que o protocolo para a extração de outros microrganismos pode ser utilizado com eficiência para extração de DNA de *S. sclerotiorum*.

Parker (2012) mostrou que foi possível a detecção de ascósporos de *S. sclerotiorum* especificamente de amostras coletadas do ar e analisadas por qPCR. Assim, com a determinação da quantificação dos ascósporos de *S. sclerotiorum* será possível a detecção da presença do fungo antes da instalação da doença nas plantas em campo, evitando gastos com fungicidas e reduzindo perdas de produtividade. Levando em consideração que é um patógeno de difícil controle, medidas preventivas de manejo e controle da doença podem ser eficientes para evitar redução na produtividade da cultura.

Foi possível nesse estudo, desenvolver análises de qPCR para identificação rápida e específica dos ascósporos de *S. sclerotiorum*. Já que o método atual de detecção de ascósporos do modelo de previsão de *S. sclerotiorum* baseia-se no teste de placa azul (utilizando um meio de cultura Neon, que altera sua cor na presença de *S. sclerotiorum*), que é eficaz, mas requer 3 dias para confirmar a presença do patógeno. O uso da qPCR e de amostrador de coleta burkard, melhora ainda mais a eficácia do modelo de previsão de *S. sclerotiorum*, já que este tem se um resultado em aproximadamente 5 horas. Foi possível a detecção e quantificação de ascósporos por meio da qPCR, e juntamente com outros dados, pode servir de ferramenta na orientação de tomada de medidas preventivas e desenvolver modelos de previsão de doença.

Qandah e Del Rio Mendoza (2012) detectaram um forte linear associação entre as concentrações de ascósporos viáveis, aerotransportados, de *S. sclerotiorum* e incidência de doenças em campos de canola.

## **Conclusões**

Neste estudo o método de extração de DNA de Leveduras foi eficiente na extração do DNA dos ascósporos de *S. sclerotiorum*.

A concentração limite para detecção de ascósporos de  $5 \times 10^4$  do DNA obteve quantidade suficiente de DNA para amplificação via qPCR em relação a outras diluições. Assim, foi possível a detecção e quantificação de ascósporos por meio da qPCR, e juntamente com outros dados, pode ser usado para orientar medidas preventivas e desenvolver modelos de previsão de doença.

## Referências bibliográficas

- AGRIOS, N.G. **Plant Pathology**. 5 th ed. Florida: Elsevier, 2005. p.546-550
- BOLAND, G. J. Evaluating Soybean Cultivars for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v. 71, n. 10, p. 934, 1987.
- BOLTON, M. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- CLARKSON, J. P. et al. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 107, n. 2, p. 213–222, 2003.
- DANIELSON, G.A.; NELSON, B.D.; HELMS, T.C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v.88, p.297-300, 2004.
- GERALDINE, A. M. Modelling propagule effects in bean white mould epidemics. Brasília: Universidade de Brasília, 6 nov. 2015.
- GORGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, dez. 2009.
- HOFFMAN, D. D. et al. Selected Soybean Plant Introductions with Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 971–980, set. 2002.
- JAMAUX I, GELIE B, LAMARQUE C, 1995. Early stages of infection of rapeseed petals as leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. **Plant Pathology** 44, 22–30.
- JONES EE, RABEENDRAN N, STEWART A (2015) Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of cabbage by *Coniothyrium minutans* and *Trichoderma* spp. **Biocontrol Sci Tech** 24:1363–1382
- KURLE JE, GRAU CR, OPLINGER ES, MENGISTU A (2001) Tillage, crop sequence, and cultivar effect on *sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. **Agronomy Journal** 93(5):973-982
- LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modelling of the incidence-yield and incidence-sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 460–468, abr. 2017.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. DA. Mofo-branco em soja - ensaios cooperativos. In: *Trichoderma: Uso na agricultura*. Brasília: [s.n.]. p. 417–432.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 324–331, 2009a.

STEADMAN, J. R. 1983. White mold- a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease Report**, 67 (4):346-350

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Evaluation of air sampling and detection methods to quantify airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 32–42, 2014.

PELTIER, A. J. Biology, yield loss and control of sclerotinia stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, 2012.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* History, **Diseases and Symptomatology purdy.pdf**, 1979.

ZIESMAN, B. R. et al. A quantitative PCR system for measuring *Sclerotinia sclerotiorum* in Canola (*Brassica napus*). **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 984–990, 2016.

WRATHER, J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 2, p. 115–121, jun. 2001.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L.; ESCOBAR, R.; GUPTA, K. G.; MA, Z.; MOREL, W.; PLOPER, D.; TENUITA, A. Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. Online. **Plant Health Progress**, 2010.