

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Diaporthe phaseolorum* VAR.
meridionalis EM SEMENTES DE SOJA POR PCR**

MARTA HELENA VECHIATO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Setembro - 2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Diaporthe phaseolorum* VAR.
meridionalis EM SEMENTES DE SOJA POR PCR**

**MARTA HELENA VECHIATO
Engenheira Agrônoma**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Co-orientadora: Dra. Elza Maria Frias Martins

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Setembro – 2002

Ao meu esposo

Pedro

Aos meus filhos

Guilherme e Gustavo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pela concessão de auxílio ao projeto de pesquisa - Processo 99/08490-8.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela orientação, apoio na realização da tese, sugestões para o aprimoramento do trabalho e amizade.

À Dra. Elza Maria Frias Martins, pesquisadora do Instituto Biológico, pela co-orientação nos trabalhos de biologia molecular, coordenação do projeto de pesquisa junto à FAPESP, incentivo, generosidade e amizade.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pelo seqüenciamento de alguns isolados de *Diaporthe* spp.

À Pesquisadora Científica Célia de Campos Lasca, pela formação científica, exemplo de seriedade, honestidade, ensinamentos e amizade.

À Pesquisadora Científica Victória Rossetti, Servidora Emérita do Estado de São Paulo, pela formação científica e apoio no início de minha carreira.

À Assistente Técnica de Pesquisa Elizabete Yuriko Kohara, pela amizade, paciência e colaboração na execução deste trabalho.

Ao Dr José Tadashi Yorinori da EMBRAPA-Soja e Dra. Margarida Fumiko Ito do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento dos isolados de *Diaporthe*.

Ao Sr. Walter Graeber, da Biblioteca do Instituto Biológico, pela atenção e apoio.

Aos professores, colegas do Curso de Pós-Graduação, funcionários do Departamento de Produção Vegetal, da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação da F.C.A, pelo apoio que nunca nos faltou.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1.. Complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i>	11
2.2.. Detecção e identificação de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	16
2.3.. Técnicas moleculares.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Obtenção dos isolados de <i>Diaporthe</i> spp.....	23
3.2. Culturas monospóricas e preservação de <i>Diaporthe</i> spp.....	26
3.3. Estudos micológicos sobre <i>Diaporthe</i> spp.....	26
3.3.1. Características dos conídios.....	27
3.3.2. Coloração e crescimento das colônias.....	27

3.4. Patogenicidade de isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> e <i>Diaporthe</i> sp.....	28
3.5. Técnicas moleculares.....	29
3.5.1. Extração de DNA dos isolados pelo método da trituração do micélio em nitrogênio líquido.....	29
3.5.2. Extração de DNA de isolados utilizando-se resina de sílica gel Wizard (Promega).....	30
3.5.3. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso–RAPD.....	31
3.5.4. Clonagem dos fragmentos diferenciadores dos DNAs dos isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	32
3.5.5. Seqüenciamento do fragmento inserido no vetor PGEM-T.....	34
3.5.6. Projeção do par de iniciadores para diagnóstico de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	35
3.5.7. Otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores projetados.....	36
3.5.8. Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados.....	36
3.5.9. Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos	

de Restrição-RFLP.....	37
3.5.10. Sequenciamento dos fragmentos DNAs amplificados com os iniciadores ITS ₄ E ITS ₅	39
3.6.Detecção do fungo <i>Diaporthe phaseolorum</i> var <i>meridionalis</i> em sementes de soja por PCR.....	40
3.6.1 Inoculação de sementes de soja da cultivar. IAS 5.....	40
3.6.2. Método de extração do DNA de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> das sementes.....	40
3.6.2.1. Método com e sem incubação das sementes sob trituração com nitrogênio líquido.....	40
3.6.2.2. Método de extração do DNA de <i>Deporte</i> <i>phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> em sementes incubadas e sensibilidade do PCR	41
3.7 Avaliação de metodologia para detecção de <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> em amostras comerciais de sementes de soja.....	44
3.7.1. Método papel de filtro modificado com 2,4D.....	44
3.7.2. Método do plaqueamento em meio Czapeck.....	45
3.7.3. Método de incubação com papel de filtro-modificado com 2,4 D seguido de PCR.....	45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Estudos micológicos de <i>Diaporthe phaseolorum</i> spp.....	49
4.1.1. Características morfológicas dos conídios.....	49
4.1.2. Coloração das colônias.....	51
4.1.3 .Crescimento micelial.....	59
4.2. Patogenicidade com isolados de <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> var . <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> e <i>Diaporthe</i> spp.....	62
4.3. Técnicas moleculares.....	65
4.3.1. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso –RAPD.....	65
4.3.2. Seqüenciamento do fragmento clonado.....	67
4.3.3. Par de iniciadores (<i>primers</i>) para diagnóstico de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	70
4.3.4. Otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores projetados Dphri e Dphle.....	72
4.3.5. Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados.....	72

4.3.6. Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição-RFLP.....	77
4.3.7. Seqüenciamento dos fragmentos DNAs amplificados com os iniciadores ITS4 e ITS5	80
4.3.8. Extração e amplificação do DNA de <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> var <i>meridionalis</i> em amostras de sementes, utilizando-se PCR.....	83
4.4. Avaliação de metodologia para detecção de <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> em amostras comerciais de sementes de soja.....	93
5. CONCLUSÕES.....	10
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
01 Isolados de fungos provenientes de sementes e de plantas de soja, utilizados nos experimentos.....	24
02 Incidência (%) de Dphm em amostras de sementes da cultivar IAS5, analisada para sanidade pelo método do papel de filtro.....	42
03 Proporção de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp., em amostras de sementes comerciais de diferentes cultivares, analisadas para sanidade pelo método do papel de filtro modificado com 2,4D, utilizadas na detecção do patógeno associado à técnica de PCR.....	46
04 Incidência (%) de fungos em amostras de sementes de soja das cultivares FT Estrela e Cristalina, analisadas para sanidade pelo método do papel de filtro modificado com 2,4D utilizadas em método de incubação de sementes e PCR, para detecção <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	46
05 Tipos de conídios de diferentes isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp., isolados de sementes e de plantas com sintomas de cancro	

da haste, em meio BDA.....	50
06 Agrupamento de isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp., segundo características de miceliais e coloração em meio de cultura batata ágar dextrose e Czapeck.....	52
07 Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp., incubados à temperatura de 25° C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 3 e 7 dias de incubação.....	60
08 Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp., incubados à temperatura de 25 °C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 7 dias de incubação.....	61
09 Teste de patogenicidade do fungo <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> e <i>Diaporthe</i> sp. em plantas de soja da cultivar IAC 14.....	63
10 Mapa de restrição dos fragmentos amplificados com os iniciadores ITS ₄ e ITS ₅ a partir de DNAs isolados de micélio dos isolados 2, 3, 5, 8, 30 e 47, pelo programa Sequencer.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 Agrupamento de isolados de <i>Diaporthe</i> spp. e <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , segundo características de tipo e coloração de micélio, em meio BDA.....	53
02 Agrupamento de isolados de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , e <i>Diaporthe</i> spp., segundo características de micélio e coloração em meio o em meio Czapeck.....	55
03 Teste de patogenicidade de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> e <i>Diaporthe</i> spp. em plantas de soja da cultivar IAC 14.....	64
04 Sintomas em plantas de soja da cultivar IAC 14 inoculadas com os isolados 6-Dphm-01/96-IB, 7-Dphm -01/96-IB e testemunha (T).....	64
05 Gel agarose, 2%, do RAPD com o iniciador 425 de DNAs de micélio dos isolados listados no Quadro 1, extraídos com STE sob agitação e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C ⁺ - (controle positivo)= DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8). Br – (branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR, com H ₂ O destilada estéril no lugar de DNA. Pd-(Padrão) = ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) <i>marker</i> 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.....	66

- 06 Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores projetados DphLe e DphRi, em diferentes temperaturas de anelamento. O DNA utilizado foi extraído de micélio do isolado 2 (Dphm- CH8) com STE, sob agitação e purificado em resina de sílica gel da Wizard-Promega. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp. **Br** – (Branco)=todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA..... 73
- 07 Gel agarose, 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de micélio de isolados de Dphm e Dph, listados Quadro 1, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega.C+ - (controle positivo)= DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8) Br –(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA.. Pd-(Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp..... 75
- 08 Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de micélio de 96 Dph spp., isolados de sementes, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+ -(controle positivo) = DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8). Br – (branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353,

1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.....	76
09 Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores ITS4 e ITS5 e DNAs de Dphm, e Dphs, mencionados no Quadro 1 e de Dph spp, isolados de sementes, extraídos de micélio com STE sob agitação e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. A =sem enzima AluI e B = com enzima de restrição Alu1 . Br – (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H ₂ O destilada estéril no lugar de DNA. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) <i>marker</i> 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.....	78
10 Alinhamento das seqüências dos fragmentos de DNA da região do ITS do grupo 1 isolados, 5 (Dph-49/98), 8 (Dphs-36/94), 30 (Dph-96/97) e grupo 2 isolados 2 (Dphm-CH8), 3 (Dphm-03/99) e 47 (Dphm-8505), utilizando o programa CLUSTAL X e o GeneDoc.....	81
11 Eletroforese de gel de agarose 2% de produtos de PCR utilizando-se o primer DphLe e DphRi, com temperatura anelamento 54° C, em amostras de S.I.; linhas de 1 a 4, com 60,0% incidência de Dphm., sem incubação e trituradas sob N ₂ . Pd – (Padrão)= 100 pb DNA Ladder, Life Technologies. C+ - (controle positivo) isolado Dphm-CH8; e Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H ₂ O destilada estéril no lugar de DNA, Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder (Life Technologies).....	85

- 12 Eletroforese de gel de agarose a 2%, de produtos de PCR de Dphm, utilizando-se o primer DphLe e DphRi, com temperatura de anelamento 54° C, em amostras de S.I.Inc. aos 7 dias, com 60,0% incidência de Dphm, trituradas sob N₂, linhas de 2 a 5 Dphm e SS- = semente sem patógeno, 1C+ isolado CH8, Pd- (Padrão) = 100 pb DNA Ladder (Life Technologies) e Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA..... 85
- 13 Eletroforese de gel de agarose 2%, de produtos de PCR de Dphm, utilizando-se o primer DphLe e DphRi, temperatura de anelamento 54° C, extraídos de amostra com 9 S.S. e uma S.I. Inc., 3 dias, linhas de 1 a 5 sementes com 10,0% de incidência de Dphm, C+ = (controle positivo)= isolado Dphm-CH8, Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA., Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder , Life Technologies..... 87
- 14 Amplificação de fragmentos de micélio de DNA de Dphm, em gel de agarose a 2%, extraídos de amostra de S.S e S.I.Inc aos 3, 5 e 7 dias apresentando 1,0 , 5,0, e 10% de incidência, trituradas sob nitrogênio líquido. 1. = controle positivo Dphm,, linhas 2 a 6 –1,0 % de incidência, 7 a 11 –5,0%, 12 a 16–10,0%, Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA, Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder(Life Technologies)..... 88

- 15 Amplificação de fragmentos de 418 pb de DNA de Dphm, em gel de agarose a 2%, extraídos de amostra de S.S e S.I.Inc aos 3, 5 e 7 dias apresentando 0, 1,0, 5,0 e 10% de incidência, liofilizadas e trituradas sob nitrogênio, linhas 1 a 5 – 1,0%, 6 a 10- 5,0%, 11 a 15 –10,0%, 16 a 20 –0,0% incidência, em gel de agarose a 2%, Br- (Branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA, Pd-(Padrão) 100pbDNA Ladder (Life Technologies)..... 90
- 16 Gel agarose, 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostra de S.S e S.I.Inc.por 5dias, apresentando 0,00 (0 SS.:400 SS); 0,25 (1 S.I.Inc.: 400 SS); 0,50 (1 S.I.Inc.: 200 SS); 1,00 (1 S.I.Inc.: 100 SS), 2,00 (1 S.I.Inc.: 50 S.S) e10% (1 S.I.Inc.: 10 SS) de incidência de Dphm e submetidas a agitação,C+ (controle positivo) DhM-CH8, Br- (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA, Pd-(Padrão) 100pbDNA Ladder (Life Technologies)..... 91
- 17 Gel agarose, 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostra de sementes de soja, apresentando 1,00 (1 S.I.Inc.7dias : 100 SS), 0,50 (1 S.I.Inc.7dias : 200 SS) e 0,25 % (1 S.I.Inc.7dias : 400 S.S) de incidência de Dphm, com os iniciadores DphLe e DphRi. As sementes foram submersas em STE (0,5 mL / semente) sob agitação de 100 rpm, por 20 minutos e o DNA foi purificado em resina de sílica gel da Wizard(Promega), C+ -

(controle positivo) isolado 2 (Dphm- CH8); Br – (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H ₂ O destilada estéril no lugar de DNA; Pd – (Padrão)= ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) <i>marker</i> 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.....	91
18 Semente colonizada por de <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , no centro da placa, e por outras espécies de <i>Diaporthe</i> , detectadas pelo método do papel de filtro modificado-2,4D.....	95
19 Sementes de soja da cultivar IAS5, colonizadas por <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionali</i> , com formação de picnídios (1) e sem picnídio (2), após período de 7 dias de incubação.....	95
20 Coloração e tipos de micélio de <i>Diaporthe</i> spp. e <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , no centro da placa , colonizando sementes de soja, utilizando-se o método do plaqueamento em meio Czapeck.....	96
21 Diferentes crescimentos miceliais de <i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> , em sementes de soja detectadas pelo método do plaqueamento em agar, em meio Czapeck.....	96
22 Gel agarose, 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de amostras comerciais de SS e S.I.Inc.com Dphm, listadas na Quadro 3, extraídos	

com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard (Promega). C+ -(controle positivo) = DNA de Dphm- CH8, Br –(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA.

Pd - Padrão = ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9

(MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp. Linhas apresentam 4 repetições de cada amostra, sendo 2 sem Dphm S.S e 2 com 1 S.I.Inc.

Linhas 1 a 4 – **A1**; 5 a 8 - **A5**; 9 a 12 - **A6**, 13 a 16 - **A7**; 17 a 20 –

A8; 21 a 24 – **A2**; 25 a 28 – **A3** e 29 a 32 –**A4**.....

RESUMO

A semente desempenha papel muito importante na disseminação do fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* F.A. Fernández, agente causal do cancro da haste da soja, pois além de disseminar, introduz o patógeno em áreas isentas.

Entre os meios mais efetivos no controle da doença estão a utilização de sementes livres do fungo e uso de cultivares resistentes. A utilização de métodos eficientes para detecção de patógenos, empregados em análise de sanidade de sementes contribui para a obtenção e comercialização de sementes de boa qualidade sanitária

O presente trabalho teve como objetivos a) desenvolver um método eficiente, rápido e de fácil aplicação na detecção e na identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm), em sementes de soja

utilizando-se a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR); b) comparar PCR com os métodos rotineiros de patologia de sementes

Nos experimentos de PCR-RAPD, utilizando o iniciador 425, foram feitas extrações e amplificações do DNAs genômicos de isolados obtidos de amostras de sementes e de plantas de soja, apresentando sintomas de cancro da haste e de outros fungos comumente presentes em sementes como: *Colletotrichum dematium*, *Phoma* sp. e *Cercospora* sp. A análise eletroforética, em gel de agarose a 2%, do produto de amplificação com um iniciador de dez pares de bases, revelou a presença de um fragmento de aproximadamente 400 pb comum a todos os isolados da variedade *meridionalis*. Estes fragmentos inseridos em pGEM-T foram clonados em *E. coli* e seqüenciados. A partir das seqüências obtidas, foi desenhado um par de iniciadores de 20 pb: DphLe (TCG GCC TTG GAA GTA GAA AG) e DphRi (ACT GAA TGC GTT GCG ATT CT). Utilizando esses iniciadores, foi possível detectar a presença de Dphm em sementes de soja, pela reação de PCR, na proporção de uma semente infectada em amostras de 400 sementes (0,25% de incidência). Para tanto, foi necessário primeiro incubar as sementes por três a sete dias e em seguida submetê-las à lavagem em tampão de extração de DNA, por 20 min.

Quanto aos estudos micológicos foi verificado que: a) todos os isolados de Dphm desenvolveram conídios somente do tipo α . Entretanto, em vários isolados de *Diaporthe* spp (Dph), sobretudo no isolado 8 *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs), também foi observada somente a presença de

conídios tipo α . Estes resultados sugerem que pode haver uma identificação equivocada, quando se utiliza este parâmetro na diferenciação do agente causal do cancro da haste da soja, com outras espécies de *Diaporthe* presentes em sementes; b) pela coloração das colônias nos meios de cultura BDA e Czapeck, os isolados de Dphm e Dph foram agrupados em 9 classes. Em meio Czapeck, todas as colônias identificadas como Dphm, foram agrupadas nas classes 8 e 9, apresentando um padrão micelial lanoso (tipo feltro), exceto o isolado 46; c) pelo crescimento micelial não foi possível distinguir Dphm de Dph. Comparando-se os métodos do papel de filtro modificado com 2,4D, plaqueamento em BDA e sementes em papel de filtro com 2,4D, associado a PCR, para detecção e identificação de Dphm, visando distinguí-lo de outras espécies presentes nas sementes, conclui-se que o método mais confiável foi o de incubação das sementes em papel de filtro com 2,4D associado a PCR. Em relação ao melhor método de extração de DNA, em sementes colonizadas por Dph., foi o da lavagem das sementes com STE e purificação do DNA com a resina de sílica gel da Wizard (Promega).

USING PCR FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* IN SOYBEAN SEEDS. Botucatu, 2002. 115 p.
tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARTA HELENA VECHIATO

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

Co-adviser: ELZA MARIA FRIAS MARTINS

SUMMARY

The seed plays an important role in the dissemination of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* F.A. Fernández, causal agent of the soybean stem canker. This pathogen, besides introducing the disease in free areas, spreads it in these areas. The use of seeds free of this pathogen is considered one of best disease control strategies. Accurate methods for pathogen detection used in analysis of seeds for health, contributes for the attainment and commercialization of good sanitary quality seeds. The objective of this research was to develop, an easy, quick and efficient method for detection and identification of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm), in soybean seeds, using the polimerase chain reaction (PCR) technique and methods routinely used in seed pathology. PCR based technique of random amplified polymorphic DNA(RAPD) was performed with total genomic DNAs from

fungus isolates obtained from seeds and plants with symptoms of stem canker and isolates from soybean seedborne fungi, commonly detected in soybean seeds such as: *Colletotrichum dematium*, *Phoma* sp. and *Cercospora* sp. PCR-RAPD amplification with primer 425 revealed a fragment of approximately 400 pb, common to all the isolates of the variety *meridionalis*. These fragments were cloned in *E. coli* and sequenced. From the sequences obtained, that presented 100% of identity between the isolates, a pair of specific primers of 20 pb was designed: DphLe (TCG GCC TTG GAA GTA GAA GAC) and DphRi (ACT GAA TGC GTT GCG ATT CT). PCR analysis using these primers allowed the detection of Dphm in soybean seeds, in the ratio of one infected seed in samples of 400 seeds (0.25% of incidence). For this, it was necessary, to incubate of the seeds for 3 to 7 days, and after that submit them to washing with extraction buffer, STE (1% of SDS, 10mM of TRIS/HCL and 25mM of EDTA) for 20 min. Mycological studies showed that: a) all Dphm isolates only produced conidia of the type α , although some Dph isolates, especially the isolate 8, identified as *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs), also produced only conidia type α . These results suggest that there can be a mistake when using this parameter to distinguish the causal agent of the stem canker from other species of *Diaporthe*; b) color of the colonies in PDA and Czapeck medium, Dphm and the of *Diaporthe* spp. (Dph) isolates were grouped in 9 classes. In Czapeck medium, all isolates identified as Dphm, were grouped in classes 8 and 9, showing woolled micelial pattern

(like felt), except isolate 46; c) based on the micelial growth it was not possible to distinguish Dphm from Dph. For detection and identification of Dphm of other Dph species in the seeds, the most reliable method was the modified blotter test with 2,4D associated with PCR. In Dph colonized seeds, the best method of DNA extraction was seed washing with STE and DNA purification using Wizard (Promega) silica gel resin.

Keywords: identification, detection, soybean seed, PCR, methods

1. INTRODUÇÃO

O Brasil participa com um percentual ao redor de 20% da produção mundial de soja. Entretanto, a produtividade brasileira média é considerada baixa com 1800 kg/ha, quando comparada com a dos E.U.A, de 2448 Kg/ha (BOLETIM AGROPECUÁRIO, 2001).

Entre os fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos da soja estão, sem dúvida, os de caráter fitossanitários, nos quais estão incluídas as doenças, que têm aumentado com a expansão da soja para novas áreas de cultivo.

No Brasil, já foram constatadas cerca de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, sendo que a maioria dos patógenos identificados está associado às sementes. Os fungos *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Phomopsis* spp., *Cercospora kikuchii*, *Cercospora*

sojina e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) são os exemplos mais evidentes de patógenos disseminados pelas sementes de soja (EMBRAPA, 1994).

O cancro da haste e da vagem da soja, causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* é considerada uma das doenças mais importante que ocorre em soja, até o momento. Esta doença foi constatada em áreas restritas de cultivo da soja em 1988/89, disseminando-se em todas as regiões produtoras (YORINORI, 1996).

Com o desenvolvimento de variedades resistentes, até o momento, o cancro da haste e da vagem da soja está sob controle, entretanto, se houver quebra de resistência, a escassez de informações na literatura sobre Dphm, no que se refere à morfologia e fisiologia, métodos de detecção e transmissão do patógeno em sementes, pode dificultar o seu controle, facilitando sua disseminação com conseqüentes perdas à cultura da soja.

Vale ressaltar que a diferenciação desta forma especializada com espécies de *Diaporthe* comumente detectadas em sementes de soja é muito difícil, visto que não existem estudos detalhados sobre a morfologia e fisiologia entre estas espécies e da variedade *meridionalis*.

Considerando a importância da semente como agente de introdução e disseminação do patógeno, o desenvolvimento de uma metodologia para detecção e diferenciação de Dphm em sementes permitirá a diagnose de rotina em laboratórios de análise, bem como em programa de certificação de sementes, no que se refere à sanidade, resultando na comercialização de

sementes em boas condições fitossanitárias, com reflexos no controle da doença e na produção de grãos ou de sementes de soja.

A semente desempenha um papel muito importante na disseminação de Dphm, pois além de disseminar o patógeno a longas distâncias, pode introduzi-lo em áreas isentas, bem como pode aumentar o inóculo em regiões onde a doença já está estabelecida, através do plantio consecutivo de sementes infectadas.

Com relação à metodologia para a detecção e identificação de Dphm em sementes de soja, não existe até o momento uma metodologia específica, devido à dificuldade na diferenciação da variedade *meridionalis*, quando aparecem outras espécies de *Diaporthe*, comprometendo a confiabilidade dos métodos usuais disponíveis em patologia de sementes. A diferenciação desta variedade de *Diaporthe phaseolorum*, pelas características morfológicas é muito difícil, quando se utiliza método rotineiro de patologia de sementes como papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros (ISTA, 1966; NEERGAARD, 1977).

YORINORI (1991) relata que os estudos por ele realizados, sobre as características diferenciadoras entre *Phomopsis* do cancro e *Phomopsis* da semente, principalmente no que se refere à morfologia, coloração das colônias e picnídios, são considerados preliminares, uma vez que há também grande variabilidade entre as colônias de *Phomopsis* da semente, no método do papel de filtro e nenhum estudo intensivo e detalhado foi realizado no Brasil com esses patógenos.

Apesar disso, as características morfológicas têm sido freqüentemente utilizadas subjetivamente para distinguir variedades de *D. phaseolorum*. FERNÁNDEZ ; HANLIN (1996) questionam a confiabilidade da identificação quando se utilizam estas características visto que, elas não têm sido estudadas e descritas em detalhes.

A taxonomia do complexo *Diaporthe/Phomopsis* é controversa e tem sido centrada na decisão de quais características, morfológicas ou fisiológicas, poderão ser usadas com o objetivo de estabelecer a nomenclatura apropriada.

Com os recentes avanços na área de biologia molecular torna-se possível determinar diferenças, mesmo entre dois organismos bem próximos ao nível molecular (BRUN, et al.1991). A utilização de técnicas moleculares pode ser bastante promissora para solucionar os problemas metodológicos na detecção e diferenciação de *Dphm* em semente de soja, em análises de rotina

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos a) desenvolver um método eficiente, rápido e de fácil aplicação na detecção e na identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, em sementes de soja utilizando-se: a) a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR); b) comparar PCR com os métodos rotineiros de patologia de sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Complexo *Diaporthe/Phomopsis*

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é originária do continente asiático, mais especificamente da China, onde era conhecida por volta de 2000/1500 A.C. No final do século XIX foi introduzida nos Estados Unidos da América e somente por volta de 1930, através de um trabalho conjunto de pesquisadores dos EUA e Canadá, variedades de soja foram desenvolvidas com melhores rendimentos e teor de óleos, intensificando-se assim o cultivo da soja, tornando os EUA maiores produtores mundiais desta leguminosa. No Brasil, somente na segunda metade do século XX iniciou-se o plantio no Estado do Rio Grande do Sul, expandindo para Santa Catarina, Paraná e São Paulo seguindo para o Centro-Oeste do país (CARUSO, R. sd).

Atualmente, o Brasil mostra uma tendência de safra de 28,5 a 30 milhões de toneladas, sendo responsável por três bilhões de dólares anuais de divisas ao país (BOLETIM AGROPECUÁRIO, 2001).

Com a expansão da cultura, problemas de caráter fitossanitário foram surgindo e se agravando, havendo necessidade da pesquisa gerar conhecimentos para solucionar estes problemas.

Entre os fatores que afetam a produtividade da soja, as doenças denominadas podridão de sementes, queima da haste e da vagem e o cancro da haste são consideradas as mais importantes, causadas por espécies de fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (PLOFFER, 1989).

A podridão de sementes é causada por diversas espécies do gênero *Phomopsis*. As espécies *phaseoli* e *longicolla* foram classificadas recentemente como duas entidades fúngicas distintas, como agentes causais da podridão de sementes de soja.

A queima da haste e da vagem e o cancro da haste da soja são doenças causadas respectivamente por *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* var *meridionalis*, respectivamente que também podem causar podridão de sementes (HOBBS ; PHILLIPS, 1985; MORGAN-JONES, 1989 e PLOFFER, 1989).

A queima da haste e da vagem é causada pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke.) Ell. var. *sojae* (Lehman) Wehm, na sua fase teleomórfica e *Phomopsis sojae* (Lehman), na sua fase anamórfica. Esta doença ocorre em todas as regiões produtoras de soja, sendo considerada como uma doença de

final de ciclo e apresenta aumento de severidade quando ocorrem chuvas por ocasião da colheita (SINCLAIR; BACKMAN 1989).

O agente causal do cancro da haste é o fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke & Ell. Sacc.) var. *meridionalis* Morgan-Jones, fase teleomórfica, e *Phomopsis phaseoli* (Cke & Ell.) Sacc. var. *meridionalis* Morgan-Jones, fase anamórfica. Este foi classificado inicialmente por ATHOW & CARDELL (1954), baseando-se em trabalhos de WELCH ; GILMAN (1948) e revisão de WEHMEYER (1933), como *Diaporthe phaseolorum* (Cke & Ell.) Sacc. var. *batatais* (Harter & Field) Wehmeyer, como patógenos às plantas de soja e de batata-doce.

WELCH ; GILMAN (1948) constataram que, em estudos micológicos, *D. phaseolorum* var. *sojae* possuía dois tipos de peritécios, cespitosos e individuais, provenientes de linhagens homotáticas e heterotáticas, respectivamente, e que provocavam sintomas distintos em plantas de soja, propondo trinômios *D. phaseolorum* var. *sojae* para a forma heterotática, como agente do cancro da haste da soja e *D. phaseolorum* var. *batatatis*, para a forma homotática, como agente da doença em batata-doce.

O cancro da haste da soja era considerado como sintoma de queima da haste e da vagem, entretanto, em 1954, ATHOW ; CARDELL demonstraram diferenças consistentes no que se refere à morfologia, características culturais e patogenicidade entre os isolados, sugerindo *D. phaseolorum* var. *sojae* Athow & Cardell, para o da soja e *D. phaseolorum* var. *batatatis* para o de batata.

Esta classificação não foi aceita por THREINN et al. (1959), que constataram mutantes da var. *caulivora*, produzidos em laboratório, provocando sintomas idênticos aos da var *sojae* em plantas de soja.

O cancro da haste da soja, inicialmente teve duas denominações: cancro da haste da soja do sul “southern stem cancker” e do norte “northern stem cancker” dos EUA e tinham como agente causal *D. phaseolorum* var. *caulivora*. Em 1989, novas propostas de nomenclatura foram feitas por MORGAN-JONES, que contestou a classificação das entidades fúngicas ao nível de variedade, após observar grande variabilidade nas relações patógeno-hospedeiro e características morfológicas e fisiológicas.

Este autor propôs, dentro de *Diaporthe phaseolorum*, entidades fúngicas distintas, denominanda de forma speciales (f.sp.) o que anteriormente era variedade (var.). O agente causal do cancro da haste da soja do sul dos EUA passou a ser denominada f.sp. *meridionalis* e do norte f.sp. *caulivora*.

Características morfológicas, fisiológicas e de patogenicidade do cancro da haste vêm sendo estudadas por muitos pesquisadores ao longo destes anos, visando à obtenção de novas informações que possam dar subsídios para identificação correta do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, contribuindo para a definição das estratégias de controle da doença.

Em estudos sobre a influência da temperatura no crescimento micelial e na patogenicidade de isolados, provenientes das regiões norte e sul dos E.U.A., KEELING (1988) constatou que o crescimento micelial *in vitro* dos isolados provenientes do norte foi inibido a 30°C, enquanto que os do sul

apresentaram a mesma taxa de crescimento. A patogenicidade dos isolados também apresentaram diferenças, os do norte foram não patogênicos quando inoculados em plantas de soja, mantidos a 30°C e os do sul mantiveram a patogenicidade nestas mesmas condições.

Em relação às características morfológicas, McGEE ; BIDDLE (1987) constataram que os isolados do norte apresentaram micélio branco, clamidósporos com estromas circulares, distribuídos ao acaso sobre a colônia e nunca fundidos, enquanto que os isolados do sul apresentaram micélio branco, clamidósporos castanhos com estromas regulares ocasionalmente fundidos.

Alguns pesquisadores têm dado ênfase especial na especificidade de hospedeiros e consideram que *caulivora* e *meridionalis* podem ser consideradas como forma especiais (KULIK, 1984; MORGAN-JONES, 1989). Entretanto, LUTTRELL (1947) cita que a forma especiais não é apropriada, desde que tem se demonstrado que a var. *sojae* possui ampla gama de hospedeiros. Características morfológicas têm sido freqüentemente utilizadas subjetivamente para distinguir variedades de *D. phaseolorum*.

FERNÁNDEZ ; HANLIN (1996) questionam a confiabilidade da identificação quando se utilizam estas características, visto que elas não têm sido estudadas e descritas em detalhes. Estes autores, estudando características morfológicas e culturais, complementadas com técnicas de biologia molecular do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, verificaram diferenças

morfológicas entre os isolados de *caulivora* e *meridionalis*, propondo assim mudança na nomenclatura de forma especiais *meridionalis* para variedade *meridionalis*. Esta nomenclatura parece ter sido aceita visto que, trabalhos mais recentes têm citado o fungo *D. phaseolorum* var. *meridionalis* como um dos agentes causais do cancro da haste da soja.

No Brasil, o cancro da haste foi identificado pela primeira vez em 1989, nos municípios de Ponta Grossa, Palmeiras, Castro e Tibagi/PR e Rondonópolis/MT, atualmente esse patógeno encontra-se disseminado por todas as regiões produtoras de soja no país, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul (YORINORI, 1990).

Segundo YORINORI (1996), colheitas foram inviabilizadas pela doença atingindo perdas de 80 a 100% e, apesar da severidade atingir 100%, o nível de incidência do patógeno nas sementes é baixo; dificilmente detecta-se o patógeno em análise sanitárias de sementes, empregando-se os métodos usuais.

2.2. Detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*

A taxonomia do complexo *Diaporthe* é controversa e tem sido centrada na decisão de quais características, morfológicas ou fisiológicas, poderão ser usadas com o objetivo de estabelecer a nomenclatura apropriada dentro do grupo *D. phaseolorum*.

Com relação à detecção e identificação de *D. phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes não existe no momento um método que possa ser utilizado em laboratórios de rotina, visto que os métodos rotineiros recomendados para detecção de fungos em sementes de soja, como o do papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros (NEERGAARD, 1977; ISTA, 1966), não permitem a diferenciação da variedade *meridionalis* de outras espécies de *Diaporthe*. Considerando que nestes métodos a identificação é baseada na morfologia dos fungos que colonizam as sementes e que a incidência do patógeno nas sementes é muito baixa, ao redor de 2% (SINCLAR; BACKMAN, 1989), a utilização dos métodos atualmente disponíveis podem não ser confiáveis.

Com o objetivo de diferenciar *D. phaseolorum* f.sp. *caulivora* e *D. phaseolorum* f.sp. *sojae* que ocorrem em plantas e sementes, PHILLIPS (1984) em estudos preliminares, desenvolveu um meio de cultura seletivo contendo quatro fungicidas, que inibiram totalmente o crescimento da forma especial *sojae* e permitiu o crescimento da f.sp. *caulivora*.

Com relação à detecção e identificação da variedade *meridionalis* em sementes, YORINORI (1991) relatou que as características diferenciadoras entre *Phomopsis*, do cancro, e *Phomopsis*, da semente, principalmente no que se refere à morfologia, coloração das colônias e picnídios, são consideradas preliminares, uma vez que há também grande variabilidade entre as colônias de *Phomopsis* spp. de semente, quando utiliza-se o método do papel de filtro e

nenhum estudo intensivo e detalhado foi realizado no Brasil com os dois tipos de *Phomopsis*.

2.3. Técnicas moleculares

A classificação de bactérias e fungos, especialmente o segundo, é baseada na observação das características de suas estruturas vegetativas e reprodutivas (STAKMAN ; HARRAR, 1957).

O comportamento biológico do patógeno em relação ao seu hospedeiro passou a ser utilizado como subsídio nos estudos taxonômicos. Mais recentemente, utilizando-se dessas técnicas muitos conhecimentos foram obtidos em estudos de taxonomia, que permitiram uma identificação correta de patovares, no caso de bactérias e forma especiais quando se trata de fungos fitopatogênicos.

Com os recentes avanços na área de biologia molecular, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de estudar taxonomia, variabilidade genética e detectar fungos fitopatogênicos, empregando-se técnicas moleculares como reação de polimerase em cadeia (PCR), amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), bem como os métodos imunológicos e enzimáticos (BATISTA, 1993).

A análise eletroforética de proteínas solúveis e de isoenzimas é uma técnica que possui inúmeras aplicações, abrangendo diversas áreas do conhecimento. É usada na taxonomia de fungos, quando os parâmetros morfológicos não são suficientes para a diferenciação entre os isolados, na

detecção de raças e no estudo da variabilidade genética (JENG et al., 1988; BONDE et al, 1991).

A análise de RFLP vem sendo empregada para investigar relações filogenéticas entre fungos fitopatogênicos em vários níveis taxonômicos (NICHOLSON et. al. 1993; SREENIVASAPRASAD et al. 1993; CISAR et al. 1996; FREEMAN et al., 1996). Entretanto, o uso do RFLP requer pessoal habilitado à manipulação de DNA e instalações adequadas ao manuseio de material radioativo. Além disso, é uma técnica muito cara e demorada para ser utilizada rotineiramente em laboratórios de fitopatologia (BATISTA, 1993; FERREIRA ; GRATTAPAGLIA, 1995).

A amplificação de DNA, usando PCR, surgiu com uma técnica alternativa ao uso de radioisótopos. Este método, segundo FERREIRA ; GRATTAPAGLIA (1995), tem como vantagens a facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade e como desvantagem a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que delimitam o fragmento de DNA de interesse, para construção dos iniciadores utilizados na amplificação de PCR.

A técnica de PCR começou a ser utilizada em fitopatologia na década de 90 e tem sido uma ferramenta importante em estudos de taxonomia e de variabilidade genética de fungos fitopatogênicos. Esta técnica consiste na amplificação de fragmentos específicos de DNA, franqueados por dois iniciadores, oligonucleotídicos complementares às fitas opostas do DNA, sendo que toda reação ocorre em presença da enzima Taq polimerase. É um

processo cíclico consistindo de três etapas: desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento dos iniciadores à sequência complementar de cada fita simples do DNA desnaturado e extensão dos iniciadores pela Taq polimerase ao longo de ambas as fitas em oposição, com conseqüente duplicação da sequência do DNA almejado. As novas fitas reproduzidas servem como moldes para reações sucessivas (FERREIRA ; GRATTAPAGLIA, 1995).

WILLIAM et al. (1990) e WELSH ; MACLELLAND (1990) desenvolveram simultaneamente uma variação da técnica de PCR, as quais foram denominadas RAPD e AP-PCR, respectivamente.

O RAPD consiste na amplificação simultânea de várias regiões do genoma, utilizando um iniciador de sequência arbitrária, contendo nove ou dez nucleotídeos e tendo composição G (guanina) + C (citosina) igual ou superior a 50%. Por ser uma técnica simples e rápida, tem sido bastante utilizada na caracterização genética de agentes fitopatogênicos como bactérias (FERREIRA et. al, 1997) e fungos (JOHANSON et al., 1994; KOIKE et al, 1996; STANOSZ et al, 1996).

A técnica de RAPD tem sido empregada como ferramenta complementar para elucidar aspectos problemáticos na taxonomia do complexo *Diaporthe* (BLAKEMORE et al., 1994; FERNANDEZ; HANLIN, 1996).

Considerando todas as técnicas mencionadas, a técnica PCR é considerada a mais adequada para a diagnose por sua especificidade, tendo em vista que as técnicas imunológicas e enzimáticas apresentam limitações quanto a sua confiabilidade e precisão, pois podem ser afetadas por diversos

fatores como: amostras que contenham altos níveis de proteínas, variações em função do estágio do microrganismo e tipo de tecido utilizado e variações ambientais (NEALE, 1992; SCHILLING et al. 1996).

Em relação às sementes, alguns trabalhos foram realizados visando projetar iniciadores específicos para diagnose de *Tilletia indica*, *Alternaria radicina* e *Phomopsis longicolla*, utilizando a técnica de PCR, nas culturas do trigo, cenoura e soja, respectivamente (SMITH et al.1996; ZHANG et al. 1997; PRYOR ; GILBERTSON, 2001).

No que se refere à detecção e identificação de *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae* e *Phomopsis longicolla*, em sementes de soja, ZHANG et. al (1999) desenvolveram um método de extração e diferenciação destes patógenos, associando incubação das sementes em meio BDA a duas técnicas moleculares. O procedimento utilizado para extração de fragmentos de DNA, da casca/tegumento de cada semente colonizada pelo fungo, foi através do rompimento das células, usando um processador ultrassônico para liberação do DNA submetendo-o, posteriormente, às técnicas de RFLP-PCR e TaqMan.

Apesar dos resultados terem mostrado que os métodos foram sensíveis e confiáveis na diferenciação dos patógenos mencionados, o procedimento de extração desenvolvido é um fator limitante para ser usado em teste de diagnose em laboratório de rotina de sementes, visto que há necessidade de uma reação para cada semente. Considerando-se que numa amostra de 400 sementes, constata-se uma incidência de 75% de *Diaporthe* spp., deverão ser

analisadas 300 sementes individualizadas, conseqüentemente 300 reações deverão ser efetuadas, tornando-se um método caro e laborioso.

Os dados moleculares têm corroborado nas conclusões baseadas na morfologia, em virtude do fato inexorável de que, uma grande fração do genoma dos microrganismos é responsável pela definição da forma dos mesmos (DIANESE, 1997) e tem sido muito útil na elucidação em casos em que a caracterização morfológica dos microrganismos é insuficiente, como no caso das raças fisiológicas, forma especiais e patovores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos isolados de *Diaporthe* spp.

Os isolados listados no Quadro 1, de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs) foram identificados e cedidos pelo Dr. José Tadashi Yorinori, EMBRAPA-SOJA e pela Dra. Margarida F. Ito, do Instituto Agronômico de Campinas. Os demais isolados foram obtidos de plantas de soja com sintomas de cancro da haste e de sementes.

Para o isolamento de Dphm em plantas, fragmentos das áreas limítrofes entre o tecido lesionado e o sadio foram retirados e submetidos á desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 1%. O material desinfestado foi colocado em placas de Petri contendo ágar-água. Após crescimento, pequenas

Quadro 1. Isolados de fungos provenientes de sementes e plantas de soja, utilizados nos experimentos.

Número	Isolado	Procedência
1	Dphm/6093 EMBRAPA (haste)	Londrina-PR
2	Dphm/CH8-EMBRAPA (haste)	Brasil
3	Dphm-03/99-EMBRAPA (haste)	Bolívia
4	Dphm-45/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel-PR
5	Dph-49/98-EMBRAPA (haste)	Argentina
6	Dphm-01/96-(IB semente)	Goiás
7	Dphm-01/96-IB (haste)	Orlândia-SP
8	Dphs-36/94-EMBRAPA (haste)	Uruçui-PI
9	Dph -03/96-IB (haste)	Avaré-SP
10	Dphm-04/97-IB (haste)	Avaré-SP
11	Dphm-05-IB/97-(haste)	Guairá –SP
12	Dph –06/96-IB- (semente)	Formosa-GO
13	Dph –07/96-IB (semente)	Formosa-GO
14	Dph –08/96-IB (semente)	Formosa-GO
15	Dph –09/96-IB (semente)	Goiás
16	Dph –10/96-IB (semente)	Goiás
17	Dph –11/96-IB (semente)	Goiás
18	Dph –12/96-IB (semente)	Goiás
19	Dph –13/96-IB (semente)	Goiás
20	Dph –14/96-IB (semente)	Goiás
21	Dph –15/96-IB (semente)	Goiás
22	Dph –16/96-IB (semente)	Goiás
23	Dph –17/96-IB (semente)	Goiás
24	Dph –18/96-IB (semente)	Goiás
25	Dph –19/96-IB (semente)	Goiás
26	Dph –20/96-IB (semente)	Goiás
27	Dphm-83/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
28	Dph. 99/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
29	Dphm-42/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel-PR
30	Dph.-96/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
31	Dphm-44/95-EMBRAPA (haste)	Guarapuava-PR

Continuação do Quadro 1

32	Dphm-109/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
33	Dphm-47/95-EMBRAPA (haste)	Ponta Grossa-PR
34	Dphm-59/97-EMRAPA (haste)	Brasil
35	Dphm-60/97-EMBRAPA (haste)	Brasil
36	Dphm-65/97-EMBRAPA (haste)	Luiziana-GO
37	Dph -21/97-IB (semente)	Formosa-GO
38	Dph -22//97-IB (semente)	Formosa-GO
39	Dph -23/97-IB (semente)	Goiás
40	Cerc.-23 /99-IB (semente)	Goiás
41	Ph-24/99- IB (semente)	Formosa-GO
42	Colld-25/99-IB(semente)	Formosa-GO
43	Dphm/8498-IAC	Colômbia-SP
44	Dphm-8493-IAC	Colômbia-SP
45	Dphm-8497-IAC	Colômbia-SP
46	Dphm -8496-IAC	Fazenda Mundo Novo
47	Dphm-8505-IAC	Frutal-MG
48	Dphm-8509-IAC	Ipauçu-SP
49	Dphm-9093-IAC	Tarumã-SP
50	Dphm-9983-IAC	Assis-SP
51	Dphm-10057-IAC	Mococa -SP
52	Dph-89/99-IB (semente)	Dourados-MS
53	Dph-90/99-IB (semente)	Dourados-MS
54	Dph-91/99-IB (semente)	Formosa-GO
55	Dph-92/99-IB (semente)	Formosa-GO

Dphm-*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* identificados e enviados pelo Dr José Tadashi Yorinori EMBRAPA-Soja e Dra. Margarida F. Ito do Instituto Agronômico de Campinas.

*Dphs- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*

*Dph- *Diaporthe* spp.

*Cerc-*Cercospora* sp.

*Ph- *Phoma* sp.

*Colld – *Colletotrichum dematium*.

porções de micélio e ágar foram retiradas das bordas das colônias e transferidas para placas contendo meio batata-dextrose-ágar-(BDA).

O isolamento a partir das sementes, previamente incubadas oito dias, foi feito retirando-se fragmentos de micélio ou conídios, com auxílio de microscópio estereoscópico e uma agulha, transferindo-os para placas de Petri contendo meio BDA.

3.2. Culturas monospóricas e preservação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*.

Após os isolamentos, foram obtidas culturas monospóricas de Dphm, Dphs e Dph, espalhando-se uma suspensão diluída de conídios sobre superfície de meio de ágar-água, em placas de Petri. Após 24 horas de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram examinadas ao microscópio óptico e os esporos individuais foram transferidos para placas contendo BDA.

Após a obtenção da cultura monospórica, os isolados foram preservados a 10⁰ C, em tubos de ensaio contendo BDA e em água destilada e esterilizada pelo método de Castellani, modificado (FIGUEIREDO, 1967).

3.3. Estudos micológicos de *Diaporthe phaseolorum* spp.

Para os estudos das características conidiais e coloração e crescimento micelial, *in vitro*, dos isolados de Dphm, Dphs e. Dph, foram utilizados

culturas em meios de BDA, Czapeck (TUIITE, 1969) e de soja (farelo de soja-60 g, ágar-20 g e água destilada – 1 L).

Nos experimentos de características conidiais e crescimento micelial foram utilizados os isolados de números 1 a 39. Para os experimentos de coloração micelial, em meio Czapeck, foram acrescentados nove isolados de Dphm (43 a 51), listados no Quadro1.

3.3.1. Características dos conídios

Discos de micélio de 9 mm de diâmetro, provenientes das culturas monospóricas dos isolados, foram repicados para meios BDA, Czapeck e soja, contidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, colocando-se um disco de cada isolado no centro da placa e incubados à temperatura de 25°C. As avaliações foram feitas aos 10, 20 e 30 dias, observando-se ao microscópio óptico a presença dos conídios dos tipos alfa e beta.

3.3.2 Coloração e crescimento das colônias

Para os estudos de coloração e crescimento micelial utilizou-se o mesmo procedimento do item 3.3.1. Foram avaliadas quatro colônias de cada isolado, nos três meios. Em relação ao crescimento foram efetuadas avaliações, aos 3 e 7 dias de incubação.

Nos estudos de coloração, as avaliações foram feitas aos 10, 20 e 30 dias de incubação, agrupando-as de acordo com tipo e coloração do micélio. O

crescimento linear foi avaliado aferindo-se o diâmetro médio de cada colônia, com auxílio de uma régua milimetrada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 3x39 (3 meios e 39 isolados).

3.4. Patogenicidade de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe* sp.

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Centro de Sanidade Vegetal, do Instituto Biológico. Inicialmente, preparou-se vaso com capacidade de 7 litros, contendo terra vegetal autoclavada, semeando-se em cada vaso 15 sementes de soja, cultivar IAC14. Antes da inoculação, foi efetuado desbaste, deixando dez plantas por vaso. Foram utilizados dois vasos para cada isolado, totalizando 20 plantas por isolado.

O inoculo, previamente preparado em meio BDA, foi produzido em palitos de dente colonizado com os isolados listados no Quadro 8, segundo técnica descrita por KEELING (1982), modificada por YORINORI (1991). As plantas foram inoculadas no estágio V1 (COSTA & MARQUEZAN, 1982), cerca de dez dias após semeadura. As inoculações foram feitas inserindo-se o palito colonizado pelo micélio do fungo a 1cm abaixo das folhas cotiledonares das plantas, evitando a perfuração do caule, descartando a possibilidade que a perfuração fosse responsável pela morte das plantas, mascarando os sintomas induzidos pelo patógeno.

As plantas, após inoculação, foram cobertas com sacos plásticos transparentes, e mantidas em câmara úmida por 72 horas, permanecendo em bancadas de casa de vegetação até a data da avaliação, com duas regas diárias por aspersão durante 3 minutos, com oscilação de temperatura de 18° C a 35 ° C

Foram feitas três avaliações aos 20, 30 e 60 dias após inoculação, observando-se os sintomas da doença nas plantas inoculadas.

3.5. TÉCNICAS MOLECULARES

3.5.1. Extração de DNA dos isolados de fungos pelo método da trituração do micélio em nitrogênio líquido.

Micélio de culturas monospóricas de isolados de Dphm, Dphs e Dph, bem como de outros fungos citados no Quadro 1 foram transferidos para placas de Petri descartáveis, de 3 cm de diâmetro contendo 5mL de meio líquido de batata dextrose, onde permaneceram durante três dias, a 25° C para o desenvolvimento do micélio. Após este período, o micélio foi coletado em um tubo de micro-centrífuga de 1,5 mL e sedimentado por centrifugação (17000 rcf/10 min). Após duas lavagens com 0,5 mL de água bi-destilada e 0,5 mL de acetona, o micélio foi liofilizado por 24 horas. Em seguida, o micélio liofilizado foi triturado sob nitrogênio líquido (N₂) e adicionado 350 µL de STE (1% de SDS, 10mM de Tris HCL e 25mM de EDTA). Após 15 min à

temperatura ambiente, foram adicionados 150 μ L de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e a mistura submetida à centrifugação (17000 rcf/ 10 min). Ao sobrenadante, transferido para novo microtubo, foram adicionados 1000 μ L de etanol absoluto. Após 10 minutos, a -20°C , a mistura foi centrifugada (10000 rcf/10 min). O sedimento foi lavado com 500 μ L de etanol 75%, seco por 5 min, em concentrador a vácuo. O sedimento foi eluído em 50 μ L de TE pH 8,0 (TRIS-HCl 10mM-EDTA 1mM).

A concentração de DNA nas amostras foi estimada pelo espectrofotômetro GeneQuantII, Amersham Pharmacia Biotech e ajustada para 30ng/ μ L.

3.5.2. Extração de DNA de isolados de fungos utilizando-se resina de sílica gel Wizard (Promega).

Isolados listados na Quadro 1 e isolados obtidos de sementes de soja de diversos cultivares, foram transferidos para placas de Petri descartáveis de 9 cm de diâmetro contendo 25 mL de meio BDA, onde permaneceram durante 3 dias, a 27°C . Após este período, o micélio de cada colônia foi coletado, com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática e depositado em microtubos de 1,5 mL, contendo 350 μ L de STE (1% de SDS, 10 mM de TRIS/HCL e 25 mM de EDTA). Após 20 minutos de agitação à temperatura ambiente, foram centrifugados a 17000 rcf/10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para

novos microtubos contendo 350 µL de resina de sílica gel da Wizard (Promega), misturados por inversão, permanecendo em contacto com a mesma por 1 minuto. Em seguida, as misturas foram transferidas para seringas de 2 mL acopladas a colunas. Os componentes solúveis foram removidos por pressão, com auxílio dos êmbolos das seringas, e DNAs adsorvidos à resina foram retidos no filtro. Procedeu-se a lavagem dos DNAs com 2 mL de isopropanol 80%. Após passagem do isopropanol pelas colunas, estas foram centrifugadas por 1 min a 8000 rpm para retirar o excesso de isopropanol. As colunas foram transferidas para um novo microtubo, adicionado-se 30 µL de TE pH 8,0 (TRIS/HCL 10mM-EDTA 1mM) para eluir os DNAs.

A concentração de DNA nas amostras foi estimada em espectrofotômetro, modelo, GeneQuantII, marca Amersham Pharmacia Biotech e ajustada a 30ng/µL.

3.5.3. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso–(RAPD)

Com a finalidade de determinar uma região do DNA diferenciadora entre os isolados de Dph, Dphs e *Diaporthe* spp. foram realizadas amplificações ao acaso do DNA desses isolados.

Os DNAs dos isolados foram amplificados utilizando-se o iniciador 425 (5' CGTCGGGCCT 3'), conforme trabalho de FERNÁNDEZ ; HANLIN (1996).

Para um volume final de reação de 20 µL foram utilizados 2,0 µL de solução tampão 1783 (sacarose/cresol/red, 10x, MgCl₂ 20mM, Idaho Technologies) 2,0 µL de dNTP mix (2mM cada), 0,3 µL de taq-DNA polimerase, 1 µL do iniciador (100uM) e 1µL de DNA (30 ng/µL) .

A reação foi processada em um termociclador PTC-100- MJ Research Inc., utilizando o seguinte programa de temperatura: uma denaturação inicial de 3 seg a 94 °C; 45 ciclos de 30 seg a 94 °C , 1 min a 36 °C e 1 min a 72 °C e um alongamento final de 7 seg a 72 °C.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada através de eletroforese horizontal, em gel agarose a 1% em tampão TAE (TRIS-acetato 0,04M e EDTA 0,001M) e brometo de etídio.

3.5.4. Clonagem dos fragmentos diferenciadores dos DNAs dos isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*.

Os fragmentos DNA dos isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 27, 28, 29, 30 31, 32, 33, 34, 35 e 36 (Quadro1) obtidos por amplificação em RAPD, comuns a todos os isolados identificados como Dphm, foram eluídos do gel de agarose em 50 µL de água destilada, deiodonizada e esterilizada utilizando-se o *kit QIA quick – Gel –Extraction*, QIAGEN. A concentração de DNA eluído do gel foi estimada pela absorção em 260 nm no espectrofotômetro Gene Quant II.

Em seguida os 50 μL foram reduzidos a 8 μL e a eles acrescentados 10 μL de tampão de extração 2x, 1 μL de T4 DNA-ligase (3U/ μL) e 1 μL do vetor pGEM-T Easy da Promega (50ng/ μL) para se chegar à proporção molar aproximada de 1:1 de inserto: vetor. A mistura de ligação foi incubada por 24h a 0 °C.

Para transformar 100 μL de células competentes de *E.coli* (DH10B) foram utilizados 2 μL da reação de ligação.

As células competentes foram obtidas a partir de bactérias provenientes de uma colônia isolada crescidas em 3 mL de meio SOB (bacto-triptona, extrato de levedura, NaCl e KCl: 20:5:0,5 g/L) por duas horas a 37° C, sob agitação, seguidas de mais 4 h, a 37°C, após o acréscimo de 100 mL de SOB adicionais. Após permanecer em repouso por 30 min, sob gelo, as células foram sedimentadas por centrifugação (2.500 rcf/15 min a 4 °C), lavadas duas vezes com 100 mL de glicerol 10% gelado e ressuspendidas em 0,4 mL da solução GYT (10% glicerol, 0,125% extrato de levedura e 0,25% bacto-triptona) gelado. As células foram estocadas a – 70 °C até sua utilização.

A transformação foi realizada por eletroporação utilizando-se o eletroporador *E coli*, da “Life Technologies”. A mistura de 2 μL de vetor recombinado e 100 μL de células competentes de *E.coli* foi incubada por 20 min, a 0 °C. Em micro células de eletroporação de polipropileno, previamente geladas, foram pipetados 25 μL da mistura entre os dois eletrodos de alumínio da célula. Um pulso de 2,5 KV, 2 μF e 4 K Ω foi aplicado às células na câmara

de micro-eletroporação, a 4 °C. Às células transformadas foram acrescentados 950 µL do meio SOC (bacto-triptona), extrato de levedura, NaCl e KCl, 20:5:0, 5 g/L, acrescidos de glucose 20 mM e MgCl₂ 10 mM). Após 1,5 h a 37 °C, sob agitação, 100 µL da suspensão foram semeados em meio 2YT (bacto-triptona), extrato de levedura, NaCl- 160: 10: 5 g/L) na presença de ampicilina (50µg/mL) e X-Gal (40µL a 20mg/mL) e encubados por 16 h, a 37 °C.

Colônias brancas foram, isoladamente, cultivadas em 2 mL de 2YT líquido na presença de ampicilina. O DNA do plasmídeo foi isolado utilizando-se o sistema de purificação da Life Technologies: “*Concert Rapid Plasmid Miniprep System*”. O DNA do plasmídeo foi utilizado para seqüenciamento das bases do inserto.

3.5.5. Seqüenciamento do fragmento inserido no vetor PGEM-T

Para o seqüenciamento, o DNA do vetor recombinado foi submetido a um PCR com um iniciador universal M13- 40 “*reverse*” ou “*foward*” marcados com o corante fluorescente Cy5, na presença de bases di dioxi, na seguinte mistura de reação: 400 ng de plasmídeo (1 a 5 µL), 1,5 pmol de M13 Universal Primer - Cy5, 1 µL da mistura de dnTPs, 1 µL das bases de ddnTP e thermo sequenase DNA polimerase.

Utilizou-se o seguinte programa de temperatura para o termociclador Perkin Elmer 2.400 ou M.J. Research Inc. 3 seg a 94°C de pré-aquecimento; 25

ciclos de 20 seg a 94°C, 30seg a 60°C, 60 seg a 72°C e uma pós-extensão de 7 min a 72°C.

Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese no seqüenciador ALFExpress- Pharmacia utilizando: Gel-Mix 6.00FA-Gibco (5,7% de acrilamida, 0,3% bis acrilamida e 8M de uréia) ou ALF Grade Ready Mix Gel (5,7%, de acrilamida, 0,3% bis acrilamida e 7M de uréia) na espessura de 3 mm, tampão 0,6 x TBE (1M TRIS, 0,83M ácido bórico, 10mM de EDTA), e o programa de corrida de 1500 V/60 mA/25 W/55 °C.

3.5.6. Projeção do par de iniciadores para diagnóstico de *Diaporthe phaseolorum var. meridionalis*

As seqüências dos fragmentos de DNA obtidas foram alinhadas pelo programa “*Sequencer*” e as extremidades correspondentes às seqüências das pontas do vetor pGEM-T linearizado foram eliminadas. O par de iniciadores foi desenhado utilizando-se o programa *WWW Primer Picking (Primer3)* disponível no *site* da Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

A síntese dos iniciadores DphRi e DphLe foi realizada pela firma Bio-Synthesis Incorporated.

3.5.7. Otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores projetados

Para se determinar a temperatura ideal de anelamento dos iniciadores projetados, DphLe (TCGGCCTTGGAAGTAGAAAG) e DphRi (ACTGAATGCGTTGCGATTCT), DNA do isolado de Dphm (2 - Dphm-CH8-EMBRAPA) foi amplificado utilizando-se o Termociclador PTC-200 MJ Research Inc., com o seguinte programa: 3 seg a 94 °C; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C com temperatura de anelamento variando de 50 °C a 66 °C, 1min a 72 °C e um alongamento final de 7 min a 72 °C.

Para um volume final de reação de 20µL foram utilizados 2,0µL de solução tampão 1783 (sacarose/cresol/red, 10x, MgCl₂ 20mM, Idaho Technologies) 2,0 µL de dNTP mix (2mM cada), 0,3µL de Taq-DNA polimerase, 1µL do iniciador (10µM) e 1µL de DNA (30 ng/µL) .

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese horizontal em gel agarose a 2%, em tampão TAE (TRIS - acetato 0,04M e EDTA 0,001M) e brometo de etídio.

3.5.8. Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados.

Os DNAs de isolados de *Diaporthe* spp listados no Quadro 1, bem como 96 isolados de Dph de sementes foram utilizados na reação de PCR com os iniciadores sintetizados DphLe e DphRi.

As extrações de fragmentos de DNA dos isolados, bem com dos isolados utilizados nos experimentos seguintes, foram feitas pelo método da resina de sílica gel da Wizzard (Promega).

Para um volume final de reação de 20µL foram utilizados 2,0µL de solução tampão 1783 (sacarose/cresol/red, 10x, MgCl₂ 20mM, Idaho Technologies) 2,0 µL de dNTP mix (2mM .cada), 0,3µL de Taq-DNA polimerase, 1 µL da mistura dos iniciadores (10 µM) e 1µL de DNA (30 ng/µL).

A reação foi processada em um termociclador PTC-100- MJ Research Inc., utilizando o seguinte programa de temperatura: 3 seg a 94 °C; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C e 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C e um alongamento final de 7 min a 72 °C.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR foi realizada através de eletroforese horizontal em gel agarose a 2%, com tampão TE e brometo de etídio.

3.5.9. Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição-RFLP

A região do espaço intergênico (ITS) do rDNA de 24 isolados de Dphm, um isolado de Dphs, relacionados no Quadro 1, e isolados de Dph provenientes de sementes, foram amplificados utilizando-se os iniciadores

ITS₄ (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS₅ (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G), conforme INNIS et al. (1990).

Para um volume final de reação de 20 µL foram utilizados 2,0 µL de solução tampão (200 mM de TRIS/HCL, pH 8,4, 500 mM KCL), 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µL de dNTP mix (2mM), 0,3 µL de Taq-DNA polimerase, 1,0 µL do iniciador ITS₄ e ITS₅ (10 µM) e 1 µL de DNA (30 ng/µL)

A reação foi processada em um termociclador PTC-100- MJ Research. Inc.utilizando-se o seguinte programa de temperatura: 3 seg a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg a 94 °C e 1 min a 55 °C, 1 min 72 °C e um alongamento final de 7 min a 72 °C.

Produtos do PCR da região do ITS dos isolados: 2 (Dphm-CH8) utilizado como padrão, 3 (Dphm-03/99), 5 (Dph-49/98), 8 (Dphs- 36/94), 30 (Dph.- 96/97) e 47 (Dphm – 8505), foram cortados com a enzima de restrição Alu1, conforme ZHANG et al. (1997).

Para uma reação de volume final de 20 µL, foram utilizados 7 µL da reação de PCR acima descrita, 0,3 µL da enzima Alu1 e 2,0 µL de tampão (50 mM TRIS/HCL pH 8, 10 mM MgCl₂), permanecendo a 37°C por 4 horas.

A separação dos fragmentos amplificados antes e após a restrição com a enzima Alu1 foi realizada através de eletroforese horizontal em gel agarose a 2%, em tampão TAE (TRIS-acetato 0,04 M e EDTA 0,001M) e brometo de etídio.

3.5.10. Seqüenciamento dos fragmentos DNAs amplificados com os iniciadores ITS₄ E ITS₅

Os fragmentos de DNA dos isolados (2, 3, 5, 8, 30 e 47), listados no Quadro 1, obtidos por amplificação em PCR com os iniciadores acima mencionados, foram eluídos do gel de agarose em 50 µL de água estéril utilizando-se o *kit QIA quick – Gel –Extraction*, QIAGEN.

Para o seqüenciamento, o DNA eluído do gel foi submetido a um PCR na presença de bases didioxi marcadas com corantes de dRhodamine, na seguinte mistura de reação: 5,5 µL de DNA eluído, 0,5 µL de iniciador (ITS₄ ou ITS₅ a 10 µM), 2 µL de Big Dye (bases didioxi marcadas, dnTPs e AmpliTaq DNA polimerase) , 2 µL de tampão (0,2M de TRIS/HCL, 5 mM de MgCl₂)

Utilizou-se o seguinte programa de temperatura para o termociclador PTC-100- MJ Research Inc.: 1 min e 30 seg a 96 °C de pré-aquecimento; 24 ciclos de 10 seg a 96 °C, 5 min a 50 °C, 4 min a 60 °C.

Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese no seqüenciador ABI PRISM 377, utilizando: 5% Long Ranger-BioWittaker Molecular Applications, 6 M uréia, na espessura de 0,2 mm, tampão 1,0 x TBE, e o programa de corrida de 1680V/51 °C.

3.6. Detecção do fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR

3.6.1 Inoculação de sementes de soja da cultivar IAS 5.

Para os estudos de detecção de Dphm, sementes de soja da cv IAS5 foram inoculadas artificialmente com o isolado 2 (Dphm CH8). A inoculação das sementes foi feita por contacto, procedendo-se uma desinfestação prévia das sementes com hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, em seguida distribuídas 30 sementes por placa de Petri, contendo meio BDA, com o fungo, cultivado por sete dias. Após 56 h à temperatura de 25 °C, as sementes foram retiradas das placas e colocadas para secar em temperatura ambiente (S.I.).

A amostra de semente acima mencionada foi previamente analisada para sanidade pelo método do papel de filtro modificado com 2,4 D e não apresentaram micélio típico de Dph, portanto foi considerada uma amostra isenta do fungo (S.S.).

3.6.2. Métodos de extração do DNA de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* das sementes

3.6.2.1. Método de extração com e sem incubação das sementes sob trituração com nitrogênio líquido

Neste experimento foi utilizada a amostra de semente inoculada, conforme descrito no item 3.6.1.

- a) Método sem incubação: uma amostra de 100 sementes inoculada (S.I.) foi triturada sob N₂, retirando-se 4 sub amostras, de 50 mg do triturado e submetidas à extração com 350 µL de STE como descrito no item 3.5.1.
- b) Método com incubação: uma amostra de 100 sementes inoculada e incubada por 7 dias (S.I.Inc.), foi analisada pelo método do papel de filtro modificado com 2,4D e apresentou 60% de incidência de Dphm. Estas sementes foram retiradas das placas e trituradas sob N₂, como descrito no item a.

3.6.2.2. Método de extração do DNA de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes incubadas e sensibilidade do PCR

Para estes estudos de extração e sensibilidade do PCR, utilizando-se método com incubação das sementes (papel de filtro, modificado com 2,4D), as S.I. foram misturadas com S.S, conforme Quadro 2. Foi avaliada a eficiência de quatro métodos de extração de DNA de Dphm das sementes:

Quadro 2. Incidência (%) de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) em amostras de sementes de soja da cultivar IAS5, analisada para sanidade pelo método do papel de filtro.

Incidência (%) Dphm	Número de sementes	
	*S.I.	**S.S.
0,00	0	400
0,25	1	399
0,50	1	199
1,00	1	99
2,00	1	49
5,00	5	99
10,00	1	9

*S.I. - semente inoculada com Dphm.

**S.S – semente sem Dphm.

- a) Trituração das sementes em N₂. Amostras de sementes com incidência 1,0, 5,0 e 10% de Dphm foram incubadas por 3, 5 e 7 dias e, posteriormente, trituradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Cinco sub amostras, de 50mg cada, foram submetidas à extração com 350 µL de STE como descrito no item 3.5.1.
- b) Liofilização das sementes com posterior trituração sob N₂. Amostras de sementes com incidência 0,0, 1,0 5,0 e 10% de Dphm foram liofilizadas durante 36h e, em seguida, trituradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido, utilizando-se o mesmo de extração de DNA descrito no item a.
- c) Lavagem das sementes em solução de STE. Amostras de S.S. e S.I.Inc. por 7 dias, apresentando 0,0; 0,25; 0,50; 1,00, 2,00 e 10,00% de incidência de Dphm, foram submersas em STE (0,5 mL/semente). Após 20 min., sob agitação a 100 rpm, alíquotas de 350µL do sobrenadante foram utilizados para extração de DNA como descrito no item 3.5.1.
- c) Lavagem das sementes em solução de STE e purificação do DNA com a resina de sílica gel da Wizzard (Promega). Amostras de S.S e S.I.Inc. por sete dias, apresentando 0,25; 0,50; 1,00% de

incidência de Dphm e o procedimento desta extração encontra-se descrito no item 3.5.2.

- e) Como testemunha, nos itens b e c, foram utilizadas SS (0% incidência de Dphm), empregando-se o método de extração descrito para cada item.

Os DNAs extraídos foram utilizados como molde na reação de PCR com os iniciadores DphLe e DphRi, sintetizados como descrito no item 3.5.6, alterando a temperatura de anelamento para 54°C., salvo nos últimos experimentos onde a temperatura de anelamento foi alterada para 60 °C.

3.7. Avaliação de metodologia para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em amostras comerciais de sementes de soja

3.7.1. Método do papel de filtro modificado com 2,4 D

Amostras de sementes de soja das cultivares listadas no Quadro 3 foram analisadas pelo método do papel filtro modificado com 2,4 D. Foram distribuídas dez sementes por placa de Petri descartável de 9 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente embebidas em solução de herbicida 2,4D a 0,2%, colocando-se no centro de cada placa uma semente inoculada com Dphm, totalizando 400 sementes por amostra. As amostras foram

incubadas à temperatura de 25°C, com alternância de 12 horas de luz negra e escuro, durante sete dias.

A identificação dos fungos foi feita baseando-se nas características morfológicas e de coloração do micélio que se desenvolveram sobre as sementes, com auxílio de microscópios binocular e estereoscópico.

3.7.2. Método do plaqueamento em meio Czapeck

Amostras de sementes de soja das cultivares OCEPAR, Jatobá, BR16 e MG-BR46 (Conquista), Quadro 3, que apresentaram maiores incidência de *Diaporthe* spp., foram previamente desinfestadas, com hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Czapeck. A incubação, quantidade e distribuição das sementes foram as mesmas descritas no item 3.7.1.

A identificação dos fungos foi feita baseando-se nas características morfológicas das colônias que cresceram ao redor das sementes.

3.7.3. Método de incubação com papel de filtro-modificado com 2,4 D seguido de PCR

Neste método foram utilizadas as amostras de sementes comerciais. Cada amostra foi subdividida em duas submostras.

Em uma das amostras adicionou-se uma (1) semente inoculada e incubada (S.I.Inc.) por sete dias. A proporção de sementes S.I.Inc. nas subamostras utilizadas encontram-se no Quadro 3.

Para a proporção 1 S.I.: 399 sementes foram selecionadas amostras das cultivares de soja FT Estrela (A3) e Cristalina (A6), por apresentarem baixa incidência de *Diaporthe* spp, e maiores incidências de outros fungos comumente detectados em sementes (Quadro 4). As amostras de sementes das cultivares, FT Jatobá (A2) e OCEPAR 13 (A4), também apresentaram baixa incidência de *Diaporthe* spp e foram selecionadas de forma a obter a proporção 1S.I.: 99 sementes. Nas demais cultivares, foram retiradas somente as sementes colonizadas pelo *Diaporthe* spp. a proporção 1S.I.: 99 semente ou por fungos que apresentaram micélio de coloração branca, que não puderam ser identificados, devido a pouca quantidade de micélio ou ausência de frutificação, conforme proporção descrita no Quadro 3. A identificação do fungo *Diaporthe* foi feita baseando-se nas características morfológicas e de coloração do micélio que se desenvolveram sobre as sementes, com auxílio de microscópios binocular e estereoscópico.

O método para extração de DNA do fungo nas sementes foi o da resina de sílica gel descrito no item 3.5.2

Os DNAs extraídos foram submetidos a PCR com os iniciadores projetados DphLe e DphRi, como descrito no item 3.5.8., utilizando-se duas repetições por amostra.

QUADRO 3. Proporção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., em amostras de sementes comerciais de diferentes cultivares de soja, analisadas para sanidade pelo método do papel de filtro modificado com 2,4D, utilizadas na detecção do patógeno, associado à técnica de PCR.

	Cultivar	Número de S.I.Inc	Número de sementes com micélio branco	Número de sementes com <i>Diaporthe</i> spp.	S.I.Inc.: nº sementes*
A1	FT Jatoba	1	74	215	1: 289
A2	**FT Jatoba	1	0	07	1:99
A3	**FT Estrela	1	0	04	1:399
A4	**OCEPAR13	1	0	06	1:99
A5	BR 16	1	97	11	1:108
A6	**Cristalina	1	20	0	1:399
A7	MG/46-Conquista	1	26	21	1:47
A8	OCEPAR 13	1	20	107	1:127

*nº de sementes inoculadas e incubadas (S.I.Inc), por nº sementes com *Diaporthe* spp. e sementes com micélio branco.

**Amostras de sementes comerciais com baixa incidência de *Diaporthe* spp., selecionadas para a obter proporção 1S.I.:399 e 1S.I.: 99 sementes,

*

Quadro 4. Incidência (%) de fungos em amostras de sementes de soja das cultivares FT Estrela e Cristalina, analisadas para sanidade pelo método do papel de filtro modificado com 2,4D, utilizadas em método de incubação de sementes e PCR, para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*.

Fungo	Cultivar	
	FT Estrela	Cristalina
<i>Phomopsis</i> spp.	1,00	0,00
<i>Fusarium semitectum</i>	5,00	4,00
<i>Fusarium</i> sp	3,25	4,50
<i>Cladosporium</i> sp.	44,50	58,25
<i>Aspergillus</i> sp.	9,50	5,25
<i>Alternaria tenuis</i>	3,25	0,25
<i>Curvularia lunata</i>	1,00	0,00
<i>Phoma</i> sp.	1,50	0,25
<i>Penicillium</i> sp.	0,75	0,75
<i>Pithomyces chartarum</i>	0,50	0,00
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0,25	0,00
<i>Fusarium equiseti</i>	0,25	0,75
Micélio branco*	-	5.00

*fungos não identificados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos micológicos de *Diaporthe phaseolorum* var *meridionalis*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe* spp.

4.1.1. Características morfológicas dos conídios

Os resultados das avaliações das características conidiais feitas aos 10, 20 e 30 dias, encontram-se no Quadro 5.

Observa-se a presença de apenas conídios do tipo α em todos os isolados de Dphm. A presença deste tipo de conídio, também foi observada nos trabalhos realizados por YORINORI (1991) e FERNANDEZ ; HANLIN (1996). Estes autores citam esta característica com um dos parâmetros para diferenciar a var.

Quadro 5. Tipos de conídios de diferentes isolados de *Diaporthe phaseolorum* var.*meridionalis* e *Diaporthe* spp., isolados de sementes e plantas com sintomas de cancro da haste, em meio BDA.

Número	Isolado		Tipo conídio
1	Dphm-6093	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
2	Dphm-CH8	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
3	Dphm.-03/99 –	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> .	α
4	Dphm-45/95-	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
5	Dph-49/98-	<i>Diaporthe</i> sp.	α
6	Dphm-01/96	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
7	Dphm-02/96	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
8	Dphm-36/94-	<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> .	α
9	Dph-03/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
10	Dphm-04/96	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
11	Dph-05/96	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
12	Dph-06/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
13	Dph-07/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
14	Dph-08/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
15	Dph-09/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
16	Dph-10/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
17	Dph-11/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
18	Dph-12/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
19	Dph-13/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
20	Dph-14/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
21	Dph-15/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
22	Dph-16/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
23	Dph-17/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
24	Dph-18/96-	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
25	Dph-19/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
26	Dph-20/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
27	Dph-83/97	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
28	Dph 99/97	<i>Diaporthe</i> sp.	α
29	Dphm-42/95	<i>Dphaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
30	Dph 96/97	<i>Diaporthe</i> sp.	α
31	Dphm-44/95	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
32	Dphm-109/97	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
33	Dphm-47/95	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
34	Dphm-59/97	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
35	Dphm 60/97	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
36	Dphm-65/97	<i>D.phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
37	Dph-21/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
38	Dph-22/96-	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
39	Dph-23/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α

meridionalis, de outras espécies de *Diaporthe*. No que se refere a *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, LUTTRELL (1947) e KULLIK (1984) citam que este patógeno pode ser identificado como variedade em relação a outras espécies de *Diaporthe* por produzir peritécios típicos e conídios α e β . Entretanto, na maioria dos isolados não caracterizados como variedade *meridionalis* e no isolado (36/94), da variedade *sojae*, foram constatados somente conídios do tipo α .

Estes resultados mostram que pode haver uma identificação equivocada de Dphm com outras espécies de Dph presentes em sementes, quando se utiliza apenas o tipo de conídios como parâmetro na diferenciação do complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

4.1.2. Coloração das colônias

Colônias de Dphm e de Dph spp. foram separadas em 9 grupos, de acordo com o aspecto e coloração do micélio, em meio BDA e Czapeck. O meio de soja não foi considerado porque apresentou grande variação na coloração e forma de crescimento, dentro dos mesmos isolados.

Analisando-se o Quadro 6 e a Figura 1, observa-se que tanto os isolados de Dphm como os de Dph foram agrupados quanto ao tipo de micélio e coloração, nos grupos 2 e 3, em meio BDA.

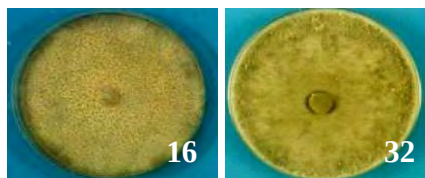
Em meio Czapeck, Figura 2, todas os isolados identificados como Dphm, exceto o isolado 46 (Dphm-8496), foram classificados nos grupos 8 e 9

Quadro 6. Agrupamento de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., segundo características miceliais e coloração em meios de cultura batata ágar dextrose e Czapeck.

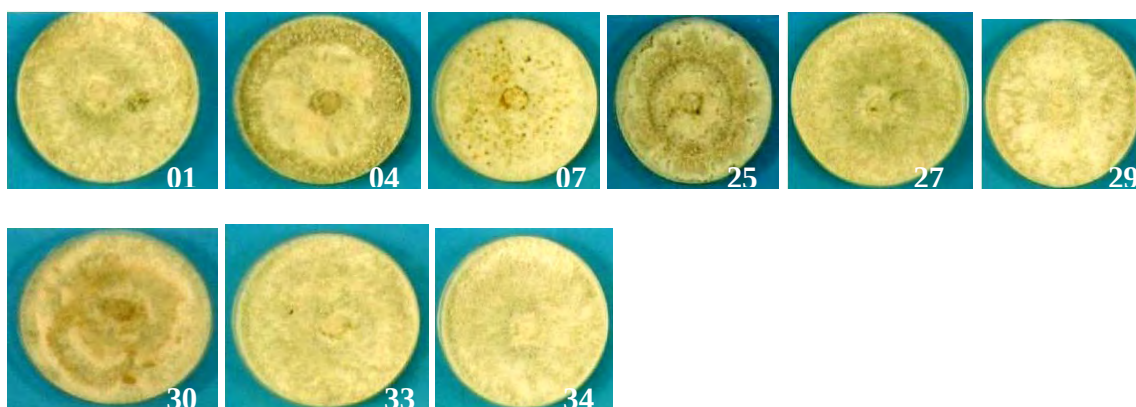
Grupos	Meios de cultura	
	Batata ágar dextrose	Czapeck
1	16 e 32	
2	01, 04, 07 , 25, 27, 29, 30, 33, e 34	13, 25, 28, 38 e 39
3	02, 03, 06, 09, 10 , 13, 15, 19, 26, 35, 36 e 39	05, 15, 26, 30 e 37
4	12, 14, 17, 28, 37, e 38	09, 12, 14, 17, 19 e 46
5	11 e 31	16
6	05, 08, 21 e 22	8, 21 e 22
7	18, 20 , 23 e 24	18, 20, 23 e 24
8		01, 02 ,03 ,04, 07, 10 , 11, 27, 29, 31, 33 e 36, 44, 48, 49, 50 e 51
9		06, 32, 34, 35, 43, 45 e 47

1. micélio cotonoso castanho; 2. micélio cotonoso esbranquiçado a castanho claro; 3.micélio cotonoso castanho claro a castanho; 4. micélio cotonoso castanho a castanho escuro; 5 micélio cotonoso castanho claro; 6. micélio cotonoso bege esverdado; 7. micélio cotonoso bege avermelhado; 8 micélio lanoso (tipo feltro) castanho; 9 . micélio lanoso (tipo feltro) castanho, com pouco de micélio aéreo castanho escuro.

GRUPO 1



GRUPO 2



GRUPO 3

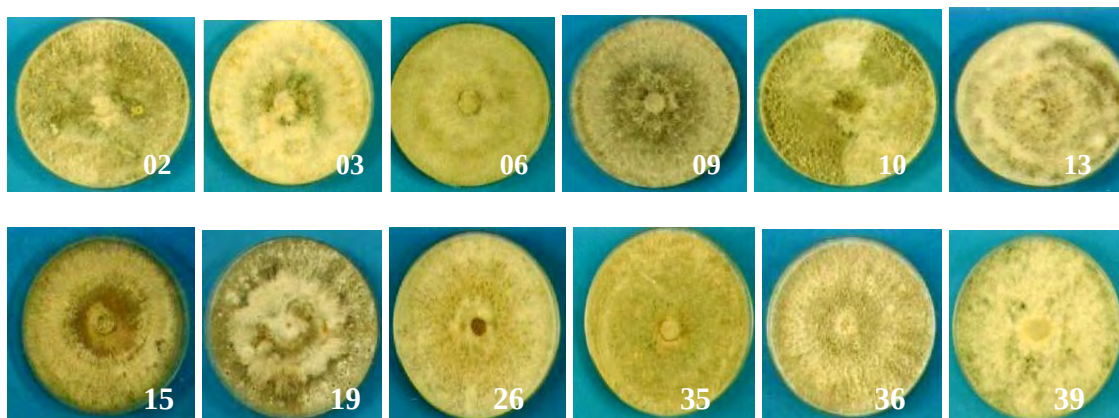
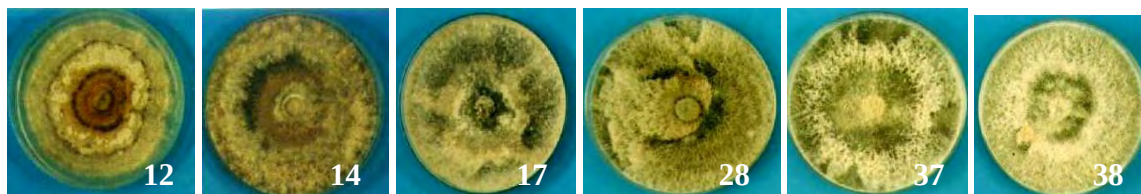
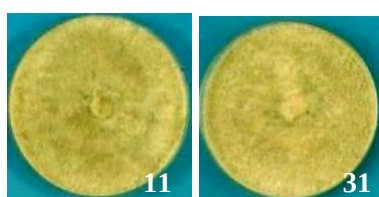


Figura 1. Agrupamento de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe, phaseolorum* var. *meridionalis*, segundo características de tipo e coloração de micélio, em meio BDA.

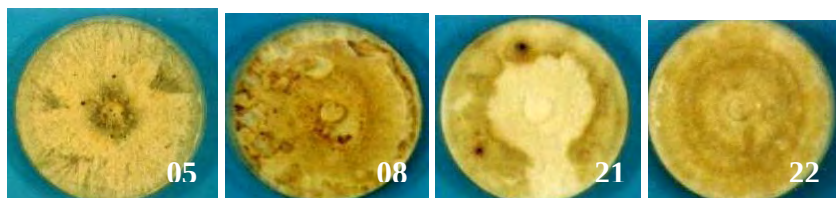
GRUPO 4



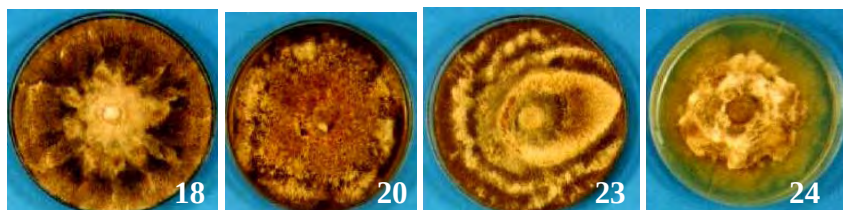
GRUPO 5



GRUPO 6



GRUPO 7



continuação da Figura 1

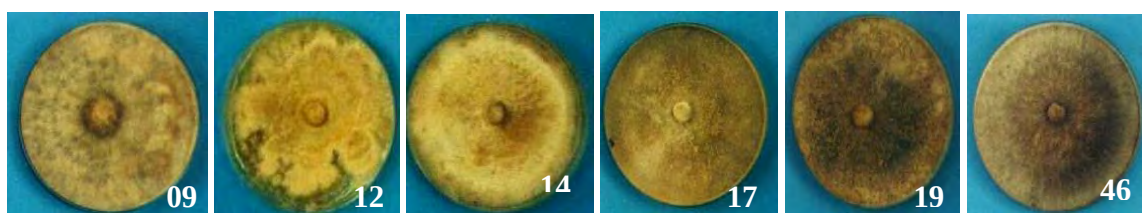
GRUPO 2



GRUPO 3



GRUPO 4

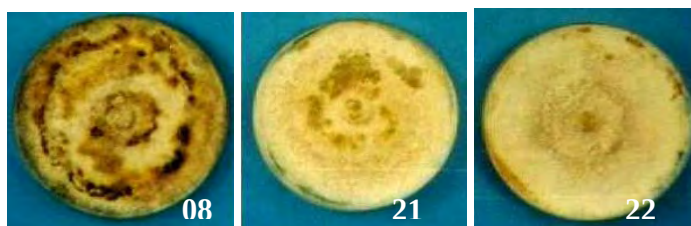


GRUPO 5

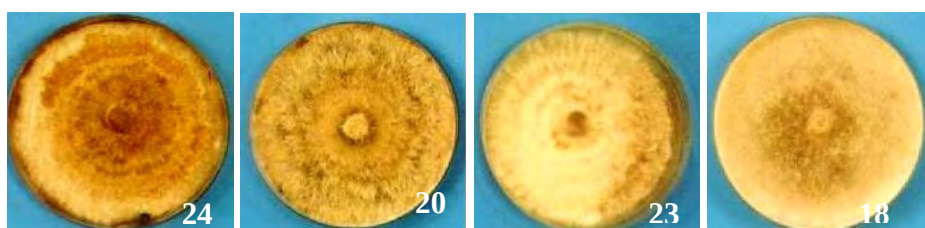


Figura 2. Agrupamento de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, segundo características de tipo e coloração de micélio, em meio Czapeck.

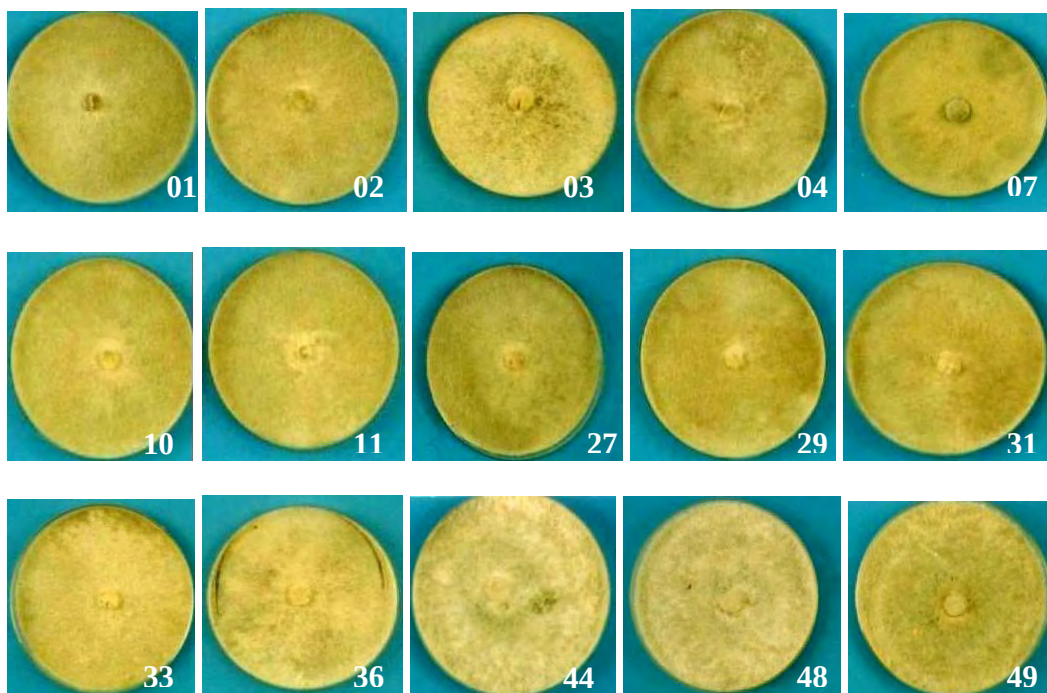
GRUPO 6



GRUPO 7

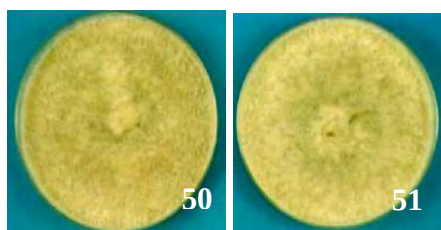


GRUPO 8

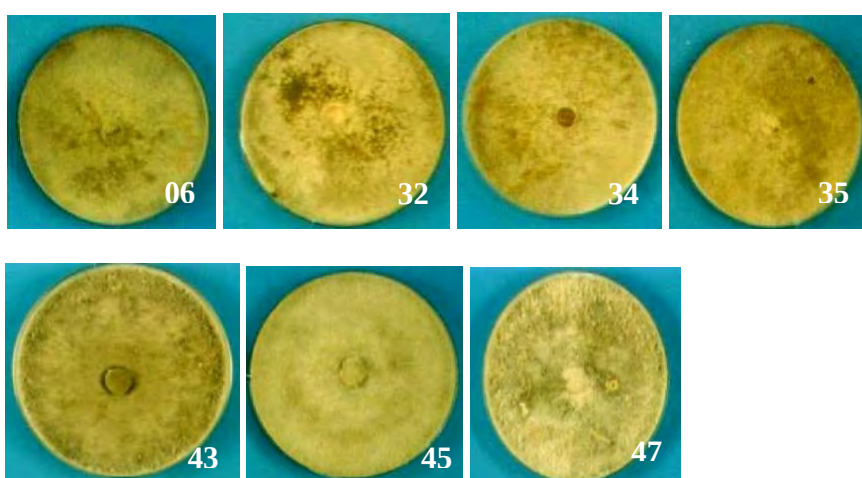


continuação da Figura 2

GRUPO 8



GRUPO 9



continuação da Figura 2

apresentando um padrão micelial lanoso (tipo feltro) e de coloração diferente dos isolados de Dphs e Dph spp., os quais foram agrupados em diferentes grupos, devido à variabilidade apresentada não só neste meio, mas também em BDA.

Apesar da maioria das colônias dos isolados de Dphm, provenientes de várias regiões, apresentarem um padrão semelhante quanto ao tipo e coloração do micélio em meio Czapeck, o isolado 46 (Dphm-8496) apresentou características bem distintas dos isolados de Dphm, enquadrando-se no grupo 4, onde foram agrupadas outras espécies de *Diaporthe*.

As características de coloração de micélio apresentadas pelo isolado 46, bem diferente dos outros isolados de Dphm, pode ser atribuída à grande variabilidade existente entre os isolados do fungo causador do cancro da haste e da vagem da soja (KEELING, 1985a; KEELING, 1985b; HIGLEY & TACHIBANA, 1987, MORGAN-JONES, 1989). Segundo AZEVEDO (1997), a ocorrência de grupos de anastomose entre hifas de Dphm, com possível processo heterocariótico dentro desta espécie, elucidam fenômenos como o surgimento de novas raças fisiológicas, bem como poderia explicar as alterações na coloração do micélio.

Em relação à esporulação dos isolados estudados, não foi possível sua constatação até a avaliação efetuada aos 30 dias. Estes resultados evidenciam a limitação do meio de Czapeck para a detecção e identificação do patógeno, utilizando-se o método do plaqueamento em ágar, em testes de rotina de análise de sanidade de sementes.

4.1.3 .Crescimento micelial

Os resultados expressos no Quadro 7, na avaliação aos três dias, mostraram que em BDA a maioria dos isolados apresentou crescimento micelial superior, em relação aos meios de soja e de Czapeck.

O crescimento micelial, em meio Czapeck, dos isolados número 3, 10, 27, 32 e 33 foram significativamente inferiores aos demais isolados da var. *meridionalis* e das outras espécies de *Diaporthe*. Observa-se também que, apesar da maioria dos isolados de Dphm apresentarem os menores valores de crescimento micelial, eles não diferiram de outros isolados de Dph. Não foi constatada diferença de crescimento micelial entre os isolados de Dphm, nos meios de soja e de BDA, os quais se comportaram de maneira semelhante à maioria dos isolados de Dph.

Na avaliação, aos sete dias (Quadro 8), observa-se que no meio Czapeck 17 isolados, entre estes Dphm e Dph, apresentaram crescimento micelial inferior, quando comparados com os meios de soja e BDA. Não foi constatada diferença de crescimento micelial nos meios de soja e BDA entre os isolados, exceto para os de número 12, 24 e 36 para BDA e 12, 20 e 24 para soja. Em relação ao meio Czapeck, somente o isolado de número 17 (Dph), apresentou crescimento micelial inferior em relação aos isolados de Dphm, comportando-se de maneira semelhante com aos isolados de Dph 5, 12, 14, 21 e 30.

Quadro 7. Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., incubados à temperatura de 25 °C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 3 dias de incubação.

Nº	Isolado	Meio de cultura					
		Czapeck		Soja		BDA	
		3 dias					
1	Dphm-8498	1,53 lmn	C	2,20 efjhi	B	2,66 bcdef	A
2	Dphm-CH8	1,77 ijkl	C	2,35 bcdefg	B	2,76 abcde	A
3	Dphm-03/99 –	1,00 o	C	2,47 abcde	B	2,73 bcde	A
4	Dphm-45/95-	1,54 lm	C	2,16 fghi	B	2,82 abc	A
5	Dph-49/98-	2,16 abcde	C	2,56 abc	B	2,84 abc	A
6	Dph-01/96	1,53 lm	C	2,19 efghi	B	2,53 cdefg	A
7	Dph-01/96	1,90 defghijk	B	2,30 bcdefgh	A	2,40 fgh	A
8	Dphs-36/94	2,20 abcd	C	2.48 abcde	B	2,80 abcd	A
9	Dph-03/97	2,44 a	B	2,43 abcdef	B	2,77 abcde	A
10	Dph-04/97	1,22 no	B	2,23 defghi	A	2,46 efg	A
11	Dph 05/96	1,62 klm	C	2,27 bcdefghi	B	2,83 abc	A
12	Dph-06/96	1,86 efghij k	B	2,07 ghi	AB	1,96 j	A
13	Dph-07/96	2,17 abcde	B	2.23 defghi	B	2,50 defg	A
14	Dph-08 /96	2,11 bcdefg	B	2,30 bcdefgh	B	2,49 defg	A
15	Dph-09/96	1,93 cdefghi	B	2,12 fghi	AB	2,29 ghi	A
16	Dph-10/96	2,23 abc	B	2,23 defghi	B	2,71 bcdef	A
17	Dph-11/96	1,80 ghijkl	C	2,41 abcdef	B	2,89 ab	A
18	Dph-12/96	2,06 cdefghi	B	2,48 abcde	A	2,60 bcdef	A
19	Dph-13/96	2,11 bcdefg	C	2,31 bcdefgh	B	2,65 bcdef	A
20	Dph-14/96	2,06 cdefghij	A	1,97 i	A	1,98 ij	A
21	Dph-15/96	2,17 abcde	B	2,58 ab	A	2,76 abcde	A
22	Dph-16/96	2,19 abcd	C	2,40 abcdef	B	2.77 abcde	A
23	Dph-17/96	2,13 abcdef	C	2,34 bcdefg	B	2,72 bcde	A
24	Dph-18/96	1,87 efghijk	A	2,20 hi	A	1,98 j	A
25	Dph-19/96	2,24 abc	B	2,36 abcdefg	B	2,75 bcde	A
26	Dph-20/96	2,10 bcdefgh	C	2,42 abcdef	B	2,70 bcdef	A
27	Dphm-83/97	1,00 o	C	2,29 bcdefgh	B	2,85 ab	A
28	Dph 99/97	2,12 abcdef	C	2,34 bcdefg	B	2,68 bcdef	A
29	Dphm-42/95	1,80 hijkl	C	2,40 defghi	B	2,91 ab	A
30	Dph-96/97	2,04 cdefghij	C	2,41 abcdef	B	2.66 bcdef	A
31	Dphm-44/95	1,40 mn	C	2,33 bcdefgh	B	2,88 ab	A
32	Dphm-109/97	1,00 o	C	2,26 cdefghi	B	2,73 bcde	A
33	Dphm-47/95	1,00 o	C	2,30 bcdefgh	B	2,80 abcd	A
34	Dphm-59/97	1,98 cdefghij	C	2,41 abcdef	B	3,07 a	A
35	Dphm 60/97	1,75 jkl	C	2,27 cdefghi	B	2,89 ab	A
36	Dphm-65/97	1,83 fghij k	C	2,66 a	B	2,12 hij	A
37	Dph-21/97	2,09 bcdefgh	C	2,52 abcd	B	2,86 ab	A
38	Dph-22/97	2,22 abc	B	2,37 abcdefg	B	2,85 ab	A
39	Dph –23/97	2,38 ab	B	2,48 abcde	B	2,79 abcd	A

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e de maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 8. Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., incubados à temperatura de 25 °C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 7 dias de incubação.

Nº	Isolado	Meio					
		Czapeck		Soja		BDA	
		7 dias					
1	Dphm-8498	3,06 a	A	3,08 a	A	3,08 a	A
2	Dphm-CH8	3,04 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
3	Dphm-03/99	3,01 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
4	Dphm-45/95	2,90 fghj	B	3,08 a	A	3,08 a	A
5	Dph-49/98	2,80 jk	B	3,08 a	A	3,08 a	A
6	Dph-01/96	3,01 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
7	Dph-01/96	2.90 defghij	B	3,08 a	A	3,08 a	A
8	Dphs-36/94	3.05 abc	A	3,08 a	A	3,08 a	A
9	Dph-03/97	3,08 a	A	3,08 a	A	3,08 a	A
10	Dph-04/97	3,03 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
11	Dph 05/96	3.03 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
12	Dph-06/96	2,77 jk	A	2,83 bc	A	2,80 b	A
13	Dph-07/96	3,00 abcdef	A	3,04 a	A	3,08 a	A
14	Dph-08 /96	2,78 hijk	B	3,08 a	A	3,08 a	A
15	Dph-09/96	3,00 abcdef	AB	2,95 a	B	3,06 a	A
16	Dph-10/96	3,08 a	A	3,05 a	A	3,08 a	A
17	Dph-11/96	2,73 k	B	3,08 a	A	3,08 a	A
18	Dph-12/96	3.05 abcd	A	3,08 a	A	3,08 a	A
19	Dph-13/96	3,06 abc	A	3,08 a	A	3,08 a	A
20	Dph-14/96	3,01 abcdef	A	2,70 c	B	2,98 a	A
21	Dph-15/96	2,79 hijk	B	3,08 a	A	3,08 a	A
22	Dph-16/96	2,99 abcdef	B	3,08 a	A	3,08 a	A
23	Dph-17/96	3.01 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
24	Dph-18/96	2,92 bcdefgh	A	2,80 bc	B	2,77 bc	B
25	Dph-19/96	2,90 efghij	B	3,08 a	A	3,08 a	A
26	Dph-20/96	2,92 cdefghi	B	3,08 a	A	3,08 a	A
27	Dphm-83/97	2,96 abcdef	B	3,08 a	A	3,08 a	A
28	Dph 99/97	3,08 a	A	3,08 a	A	3,08 a	A
29	Dphm-42/95	3,04 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
30	Dph-96/97	2,80 ghijk	B	3,08 a	A	3,08 a	A
31	Dphm-44/95	3,07 a	A	3,08 a	A	3,08 a	A
32	Dphm-109/97	2,95 abcdef	B	3,08 a	A	3,08 a	A
33	Dphm-47/95	3,06 ab	A	3,08 a	A	3,08 a	A
34	Dphm-59/97	3.05 abcde	A	3,08 a	A	3,08 a	A
35	Dphm 60/97	3,02 abcdef	A	3,08 a	A	3,08 a	A
36	Dphm-65/97	2,94 abcdefg	B	3,08 a	A	2,65 c	C
37	Dph-21/97	3,06 abc	A	3,08 a	A	3,08 a	A
38	Dph-22/97	2,97 abcdef	B	3,08 a	A	3,08 a	A
39	Dph -23/97	2,97 abcdef	B	3,08 a	A	3,08 a	A

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e de maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente

entre si pelo teste de Tukey, a 5%de probabilidade.

Analisando-se os Quadros 7 e 8, observa-se que os isolados de Dphm não apresentaram um padrão de crescimento micelial semelhante entre si para cada meio estudado, apresentando variações dentro destes meios, não havendo possibilidade, por esta característica, de separá-los de outras espécies de Dph que colonizam sementes de soja, quando se usa o método do plaqueamento em ágar.

4.2. Patogenicidade de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe* spp.

Os resultados dos testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação com diferentes isolados de *Diaporthe* estão expressos no Quadro 9.

Na avaliação feita aos 30 dias após a inoculação, constatou-se uma variação de 60 a 100% de plantas mortas inoculadas com Dphm (Figura 3), exceto para os isolados 6 (Dphm-01/96) e 7 (Dphm-02/96). Apesar de não ter sido constatada morte das plantas inoculadas com estes isolados, foram observadas no local da inoculação, lesões necróticas maiores que nas plantas testemunhas (Figura 4). Estes isolados apresentaram as mesmas características morfológicas dos Dphm e foram agrupados juntos aos Dphm, em meio Czapeck, dentro das classes 8 e 9, além disso, foram amplificados com os iniciadores específicos para diferenciação da var. *meridionalis* de outros fungos presentes nas sementes (Figura 8). A baixa virulência dos isolados 6 e

Quadro 9. Teste de patogenicidade do fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe* spp., em plantas de soja da cultivar IAC 14.

Número	Isolado	Procedência	Plantas mortas (%)
1	Dphm-6093- EMBRAPA	Paraná	100
2	Dphm- CH8- EMBRAPA	Brasil	100
3	Dphm-03/99 –EMBRAPA	Bolívia	70
4	Dphm-45/95- EMBRAPA	Cascavel –PR	90
5	Dph-49/98- EMBRAPA	Argentina	0
6	Dphm –01/96	Goiás	*
7	Dphm –01/96 IB	Orlândia –SP	*
8	Dphs 36/94-EMBRAPA	Uruçui-PI	0
10	Dphm –04/97IB	Avaré-SP	80
11	Dphm -05-IB/97	Guairá –SP	80
27	Dphm-83/97-EMBRAPA	Argentina	60
28	Dph. 99/97-EMBRAPA	Argentina	0
29	Dphm-42/95-EMBRAPA	Cascavel- PR	100
30	Dph.-96/97-EMBRAPA	Argentina	0
31	Dphm-44/95-EMBRAPA	Guarapuava-PR	70
32	Dphm-109/97-EMBRAPA	Argentina	80
33	Dphm-47/95-EMBRAPA	Ponta Grossa-PR	80
34	Dphm-59/97-EMRAPA	Brasil	70
35	Dphm 60/97-EMBRAPA	Brasil	80
36	Dphm-65/97-EMBRAPA	Luiziana-GO	100
43	Dphm/8498-IAC	Colômbia-SP	100
44	Dphm-8493-IAC	Colômbia-SP	100
45	Dphm-8497-IAC	Colômbia-SP	80
46	Dphm -8496-IAC	Fazenda Mundo Novo	100
47	Dphm-8505-IAC	Frutal-MG	100
48	Dphm-8509-IAC	Ipauçu-SP	70
49	Dphm-9093-IAC	Tarumã-SP	100
50	Dphm-9983-IAC	Assis-SP	100
51	Dphm-10057-IAC	Mococa -SP	100
52	Dph –89/01 - IB	Dourados-MS	0
53	Dph –90/01 - IB	Dourados-MS	0
54	Dph—91/01 - IB	Formosa-GO	0
55	Dph –92 /01- IB	Formosa-GO	0
TESTEMUNHA			0

* sintomas de cancro da haste nas plantas.

Dphm- *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* identificado e enviados pelo Dr. José Tadashi Yorinori EMBRAPA-Soja e Dra. Margarita F. Ito do Instituto Agrônomo de Campinas.

Dphs- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* identificado pela EMBRAPA-Soja.Dph.- *Diaporthe* spp.



Figura 3. Teste de patogenicidade de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., em plantas de soja da cultivar IAC 14, em casa de vegetação.

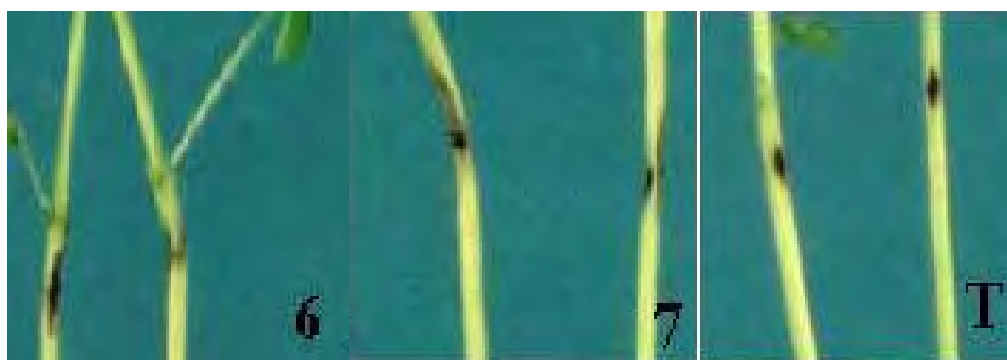


Figura 4. Sintomas em plantas de soja da cultivar IAC 14, inoculadas com os isolados 6 (Dphm-01/96- IB), 7 (Dphm-01/96- IB) e testemunha (T).

7, pode ser atribuída à perda de pelas repicagens sucessivas durante o período de manutenção do fungo de 1996 a 1999, em tubos contendo meio de BDA.

4.3. Técnicas moleculares

4.3.1. DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso –RAPD

A análise eletroforética, em gel de agarose a 2%, dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em RAPD, dos isolados de Dphm (1, 2, 4, 6, 7, 10, 11, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 e 51), um de Dphs e de 34 isolados de Dph, com o iniciador 425, revelou a presença de 1 fragmento de aproximadamente 400 pb comum a todos os identificados como var. *meridionalis* (seta, Figura 5). Entretanto, isolados não identificados como var. *meridionalis* (isolados 5 e 8), também apresentaram amplificação de fragmentos de tamanho semelhante. Estes resultados evidenciam que a técnica de RAPD não é adequada para a diagnose desse patógeno.

Esta técnica segundo KOHN (1992) é particularmente apropriada para estudar organismos abaixo ao nível de espécie, entretanto possui baixa reprodutibilidade que limita sua utilização para fins de diagnose e tem sido utilizada como estratégia para selecionar fragmentos de DNA de isolados, que após clonagem e seqüenciamento, geram iniciadores específicos.

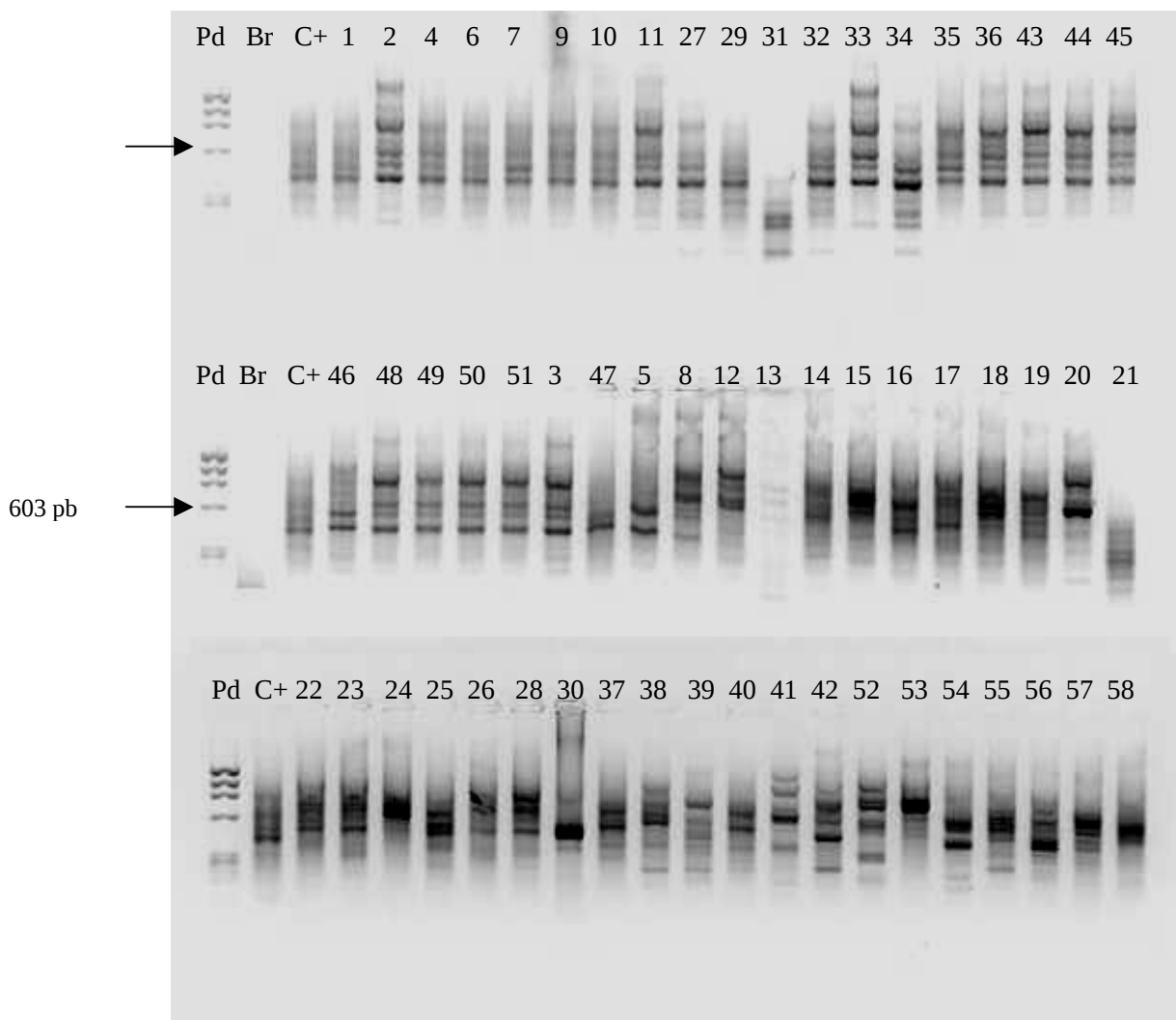


Figura 5. Gel agarose, 2%, do RAPD com o iniciador 425 de DNAs de micélio dos isolados listados no Quadro 1 e 3 isolados de Dph, extraídos com STE sob agitação, purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+(controle positivo)=DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8) .Br-(branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR, com H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd-(Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.

4.3.2. Seqüenciamento do fragmento clonado

Dos 20 fragmentos de aproximadamente 400 pb que foram clonados e seqüenciados, 15 mostraram 100% de homologia entre si. Cinco fragmentos correspondentes aos isolados 3, 5, 8, 28 e 30 mostraram seqüência distintas entre si. A seqüência comum aos 15 isolados foi:

```
GAATTCACTAGTGATTTCGTCGGCCTTGGAAGTAGAAAGCAAAGTCTGC
CCGCTGATGAGCCATGATGCGGCGGGAAGGATCAGAAAAATTGGTCTT
GAGCACGTTTAATCCCTCAAATTTAGTGCGACCCGGTGGTCAAATATG
CGCAAGTCTAGTCCAGACAAACCGAAAAAGACCGTAAGAGCGTCTTC
GAGGCTAAGGCATGGGACAAGCTGGCGGGAGCTCCGCAGAAGCCTGC
ACACCTGCTCACCAGGCACAGCCAGGTACACGCCATAGTTGCAAAAGC
TCATAAACGCCGGACCGGGGCGGGATCCGGACCGGGGCGGGATCGGG
ACCTGGGCCCATCAGTACATGGATCCTAACAAAAGTCCGTTGAATTTA
CAGGAGCTCGCGTAGAAAGCGTTCCCGCCCAGACAAGAATCGCAACG
CATTCAGTAGGCCCGACG
```

A comparação dessa seqüência com as dos bancos de dados existentes mostrou pequena homologia pelo *blast* x (valores de E acima de 0,42) (GenBank CDS translations, +PDB+, SwissProt, + PIR, + PRF, 17 / 05 / 2002), com as proteínas: - ornitina-decarboxilase antizime de *Homo sapiens*, apresentando identidade apenas com 25 aa numa seqüência de 76 aa (32%) e E-valor = 0,42 (gi| 1092922| prf| 2102231A) ou 19 em 49 (38%) {gi| 2576244| dbj| BAA23101.1 (D89870)}; - proteína conservada hipotética de *Treponema pallidum* apresentando identidade apenas com 13

aa numa sequência de 24 aa (54%) e E-valor = 1,2 {gi|15639066|ref|NP-218512.1| (NC-000919)}; serina/treonina quinase de *Streptomyces coelicolor* A3(2) apresentando identidade apenas com 21 aa numa sequência de 64 aa (32%) e E-valor = 4,7 {gi|7546664|emb|CAB87324.1| (AL163672)}; NBS *resistance protein-like* de *Gossypium hirsutum* apresentando identidade apenas com 18 aa numa sequência de 54 aa (33%) {gi|20378913|gb|AAM21037.1|AF469099-1 (AF469099)} e E-valor = 6,1; putativa 2-dehidropantoato 2-redutase de *Streptococcus pyogenes* M1 GAS apresentando identidade apenas com 16 aa numa sequência de 40 aa (40%) e E-valor = 6,1 {gi|13622023|gb|AAK33780.1| (AE006535)}. Pelo *blast n* {GenBank + EMBL + DDBJ + PDB , 13/06/2002) mostrou também baixa homologia com mRNA *open reading frame* 183 do cromosoma 20 de *Homo sapien* apresentando identidade com 21 pb numa sequência de 21 pb (100%) e E-valor = 0,46 (C20orf183) gi|13540544| ref| NM_030776.1|); mRNA da putativa proteína DLM-1 de estroma de tumor e macrófago ativado de *Homo sapiens* apresentando identidade com 20 pb numa sequência de 20 pb (100%) e E-valor = 0,46 (gi|11863670| emb| AJ300575.1| HSA300575); BAC clone RP11-523H20 do cromosoma 2 de *Homo sapien* apresentando identidade com 20 pb numa sequência de 20 pb (100%) e E-valor = 1,8 (gi|4508118| gb| AC005041.2| AC005041); clone RP11-585K6 do cromosoma 18 de *Homo sapien* apresentando identidade com 22 pb numa sequência de 23 pb (95%) e E-valor = 7,2 (gi|20331021|gb|AC067819.10|); micro satélite Lb4-19 de *Lysandra bellargus* apresentando identidade com 19 pb numa

seqüência de 19 pb (100%) e E-valor = 7,2 (gi|10644640|gb|AF276051.1|AF276051).

A translação da seqüência desse fragmento de DNA pelo programa BCM Launcher: Sequence Utilities (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) mostrou a presença de 3 a 8 *stops codons* dependendo da frame considerada (frame +3, frame +2, frame+1, frame -1, frame -2, and frame -3). A frame -1 (R R A Y **Stop** Met R C D S C L G G N A F Y A S S C K F N G L L L G S Met Y **Stop** W A Q V P I P P R S G S R P G P A F Met S F C N Y G V Y L A V P G E Q V C R L L R S S R Q L V P C L S L E D A L T V F F G L S G L D L R I F D H R V A L N L R D **Stop** T C S R P I F L I L P A A S W L I S G Q T L L S T S K A D E S L V N), foi a única que em *blast p*, mostrou pequena homologia com proteína conservada hipotética de *Treponema pallidum* apresentando identidade apenas com 13 aa numa seqüência de 24 aa (54%) {gi|15639066|ref|NP_218512.1|(NC_000919)} e com a NBS *resistance protein-like* de *Gossypium hirsutum* apresentando identidade apenas com 15 aa numa seqüência de 39 aa (38%) {gi|20378913|gb|AAM21037.1|AF469099 - 1 (AF469099)}.

A pequena homologia com proteínas conhecidas e a presença de muitos stops e codons, sugere a possibilidade de tratar-se de uma seqüência de espaço intergênico.

4.3.3. Par de iniciadores (*primers*) para diagnóstico de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*

Os iniciadores foram sintetizados pela firma Bio-Synthesis Incorporated e apresentam as seguintes características:

DphmLe =TCGGCCTTGGAAGTAGAAAG

	1	2	3	4
Tamanho (pb)	20	20	20	20
Peso molecular	6207,00	-	6206,00	
Temperatura de fusão	63,10	59,45	60,00	60,00
% de CG	50,00	50,00	50,00	-
Estrutura secundária	muito fraca	muito fraca	-	-
Formação de dímeros	não	não	-	-

1-Genosys Oligo Calculations (http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe)

2- Primer3 Output (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

3-Bio.Synthesis Oligo Data

4. TM [4x (nº C+G) + 2x (nº A+T)](<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/contents.html>)

DphmRi= ACTGAATGCGTTGCGATTCT

	1	2	3	4
Tamanho (pb)	20	20	20	20
Peso molecular	6124,00	-	6123,00	-
Temperatura de fusão	64,62	60,81	58,00	58,00
% de CG	45,00	45,00	45,00	-
Estrutura secundária	muito fraca	muito fraca	-	-
Formação de dímeros	não	Não	-	-
1-Genosys Oligo Calculations(http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe)				
2- Primer3 Output (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)				
3-Bio.Synthesis Oligo Data				
4. TM [4x (nº C+G) + 2x (nº A+T)](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/contents.html)				

Foi utilizado 54 °C, como temperatura de anelamento , 4 °C abaixo da temperatura de fusão mais baixa, do iniciador DphmRi calculado pela firma Bio Synthesis. A otimização da temperatura de anelamento foi realizada em Termociclador com gradiente de temperatura.

O iniciador DphmLe de 20 pb possui homologia de 17 a 14 pb, a partir da extremidade 3', com seqüências depositadas em banco, dos genomas do homem, rato, camondongo, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* *Anolis biporcatus* e *Candida albicans*. Enquanto que o iniciador DphmRi apresentou homologia de 17 a 14 pb, a partir da extremidade 3', somente com seqüências de genomas de outros organismos como: *Danio rerio*,

Drosophila melanogaster, vírus da tristeza dos citros, *Plasmodium berghei*, *Helicobacter pylori* e *Pleurocera vestitum*. Estes resultados evidenciam que esse par de iniciadores pode ser utilizado na detecção de Dphm em sementes de soja.

4.3.4. Otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores projetados DphRi e DphLe

Como pode ser observado pela Figura 6, o anelamento dos iniciadores projetados DphLe e DphRi foi satisfatório em todas as temperaturas empregadas de 50 °C a 66 °C, pois foi obtido em todas as temperaturas apenas a banda de 418 pb. A reação parece ter sido igualmente eficiente nas temperaturas de 50 a 60,3 °C, o que é indicado pela espessura semelhante da ligeiramente mais estreita indicando queda de eficiência. Foi então adotada a temperatura de 60 °C para as reações de PCR, para a diagnose de Dphm em sementes de soja, na tentativa de se aproximar do ótimo de especificidade e eficiência dos iniciadores.

4.3.5. Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados

A reação de PCR com DNAs genômicos de 25 isolados de Dphm, 1 de Dphs e 34 de Dph., com os iniciadores DphmLe e DphmRi, resultou na amplificação de um fragmento de 418 pb comum a todos os isolados

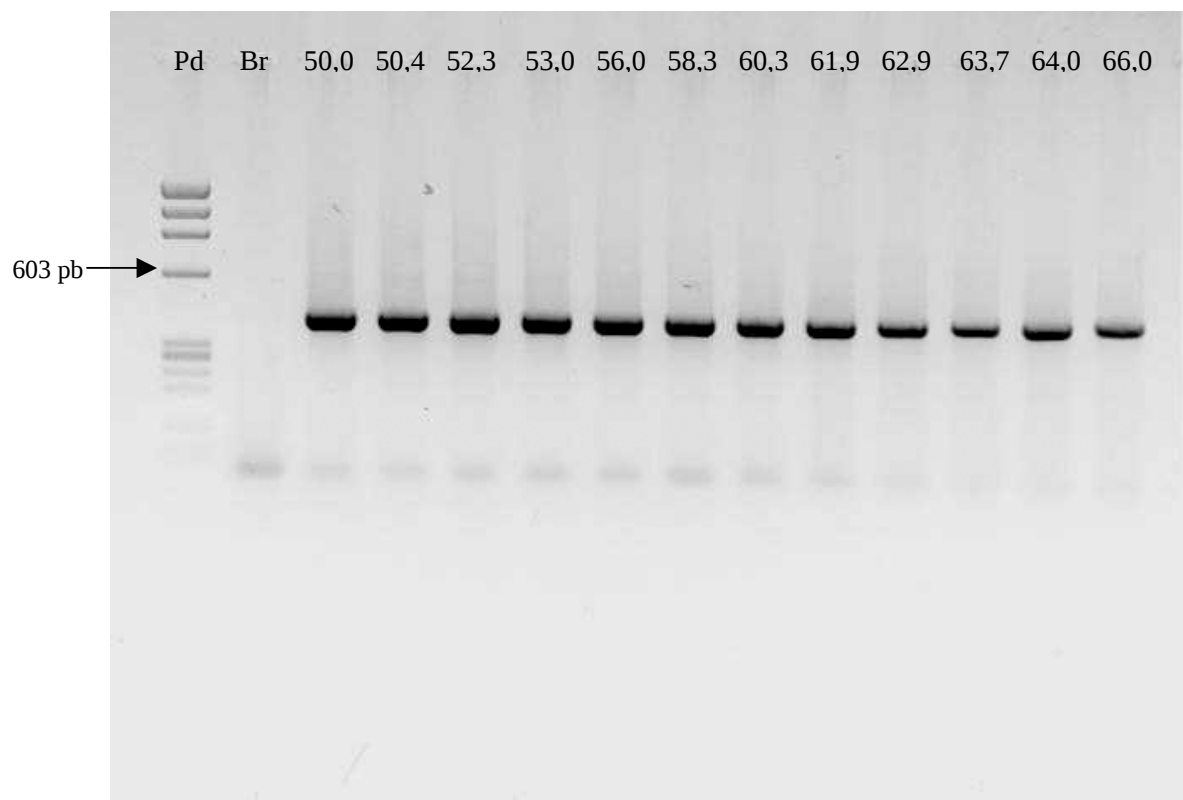


Figura 6. Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores projetados DphLe e DphRi, em diferentes temperaturas de anelamento. O DNA utilizado foi extraído de micélio do isolado 2 (Dphm- CH8) com STE, sob agitação e purificado em resina de sílica gel da Wizard-Promega. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 178 bp. Br – (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA.

identificados como variedade *meridionalis*, exceto para o isolado 3 (Dphm-03/99) e 47 (Dphm-8505) e ausente nos demais (Figura 7).

Na Figura 8, observa-se que não houve amplificação dos fragmentos dos 96 isolados de Dph, provenientes de micélio e esporos de sementes, que possuíam diferentes características morfológicas, no que se refere à coloração e tipo de micélio. É importante ressaltar que estes 96 isolados foram provenientes de amostras de sementes utilizadas em experimentos de avaliação de metodologia, e os resultados obtidos na detecção de Dphm nas sementes foram negativos.

Esses resultados reforçam a eficiência do método do papel de filtro modificado com 2,4D associado a PCR para diagnose do agente causal do cancro da haste em sementes de soja. Entretanto, dois isolados, 3 e 47, não amplificaram com os iniciadores projetados. Estes isolados apresentaram sintoma de cancro da haste em testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação, comportando-se de maneira bastante agressiva com porcentagem de 90 a 100% de plantas mortas (Quadro 9), além de apresentarem características como tipo e coloração de micélio, semelhante a isolados de Dphm em meio Czapeck (Figura 2).

Entretanto, ZHANG et al. (1998) citam que há possibilidade de se distinguir a variedade *meridionalis* de *Phomopsis longicolla*, agentes causais do cancro da haste e podridão de sementes em soja, respectivamente, pela digestão de fragmentos amplificados com os iniciadores ITS4 e ITS5 com a enzima de restrição AluI. Na tentativa de

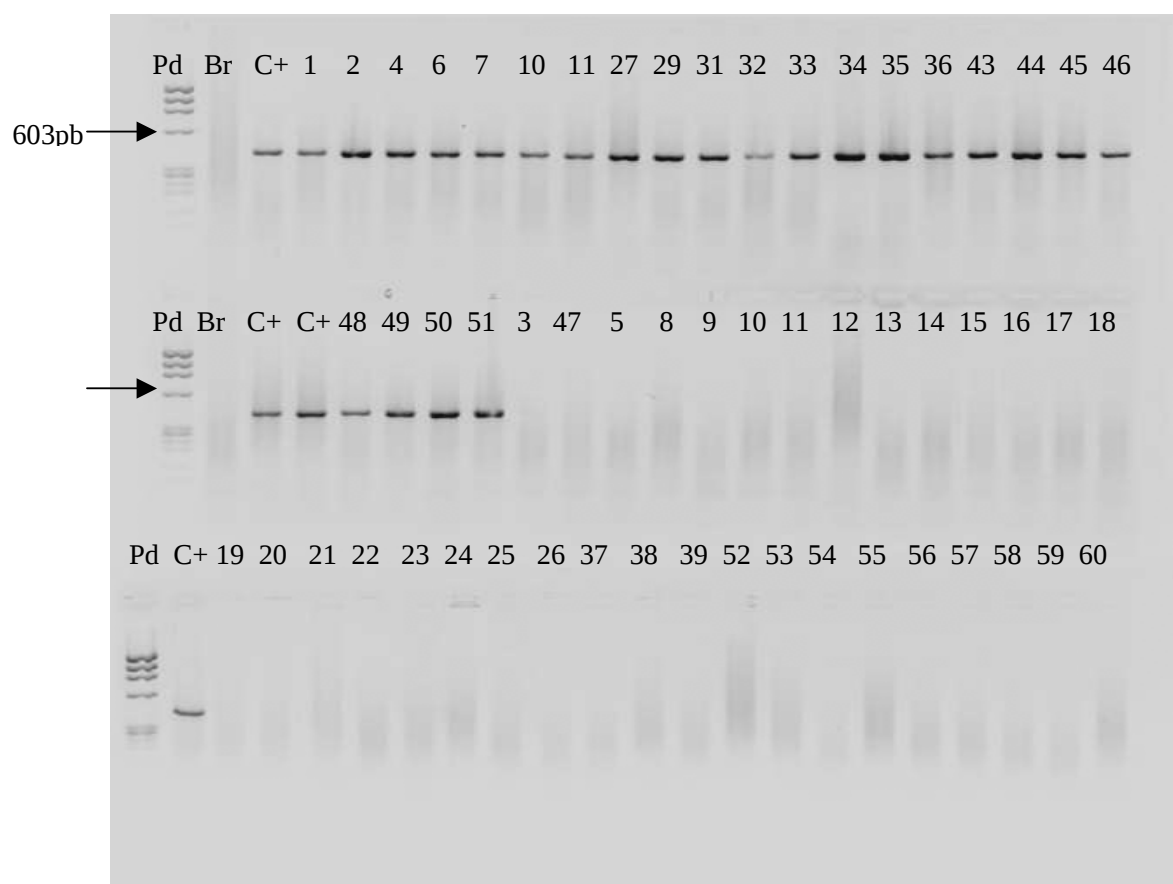


Figura 7. Gel agarose, 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de micélio de isolados de Dphm e Dph, listados no Quadro 1 e 5 isolados de Dph, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+ (controle positivo)= DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8) Br –(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.

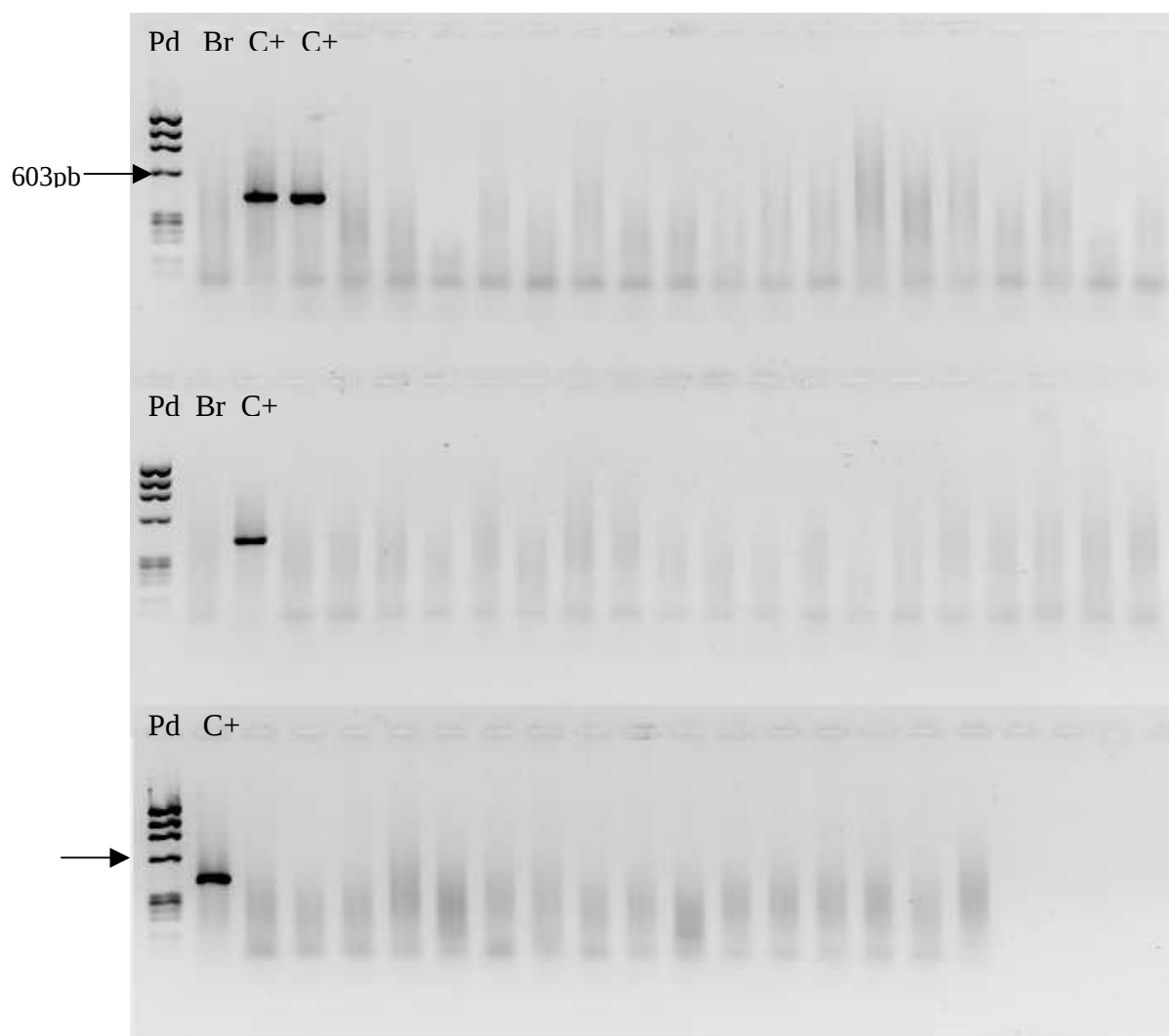


Figura 8. Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de micélio de 96 Dph spp., isolados de sementes, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+(controle positivo) = DNA do micélio do isolado 2 (Dphm-CH8). Br-(branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd-(Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 pb.

de esclarecer os resultados foi aplicada a técnica de RFLP com posterior seqüenciamento das regiões do ITS, dos dois isolados.

4.3.6. Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição-RFLP

Os iniciadores ITS4 e ITS5 amplificaram fragmentos de DNA cerca de 600 bp em todos os isolados de *Dphm* (Figura 9A e B).

A análise eletroforética, em gel de agarose a 2%, dos fragmentos de DNA cortados com a enzima de restrição *AluI* mostra que fragmentos de DNA dos isolados, 3 (*Dphm* 03/99) e 47 (*Dphm* 8505), amplificados na região do ITS não possuem sítio de reconhecimento da enzima *AluI* semelhante aos isolados da variedade *meridionalis* (2, 4, 6, 7, 11, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51). Fragmentos de DNA amplificados dos demais isolados de *Diaporthe* spp. foram cortados com *AluI* resultando em seções de cerca de 450 pb (Figura 9B).

Esses dados foram confirmados pelo mapa de restrição (Quadro 10) obtido após seqüenciamento dos fragmentos dos isolados 2, 3, 5, 8, 30 e 47. Na realidade seriam esperados dois fragmentos, um de 444 e outro de 116 pb, porém, foi possível observar, no gel de agarose, somente o fragmento maior.

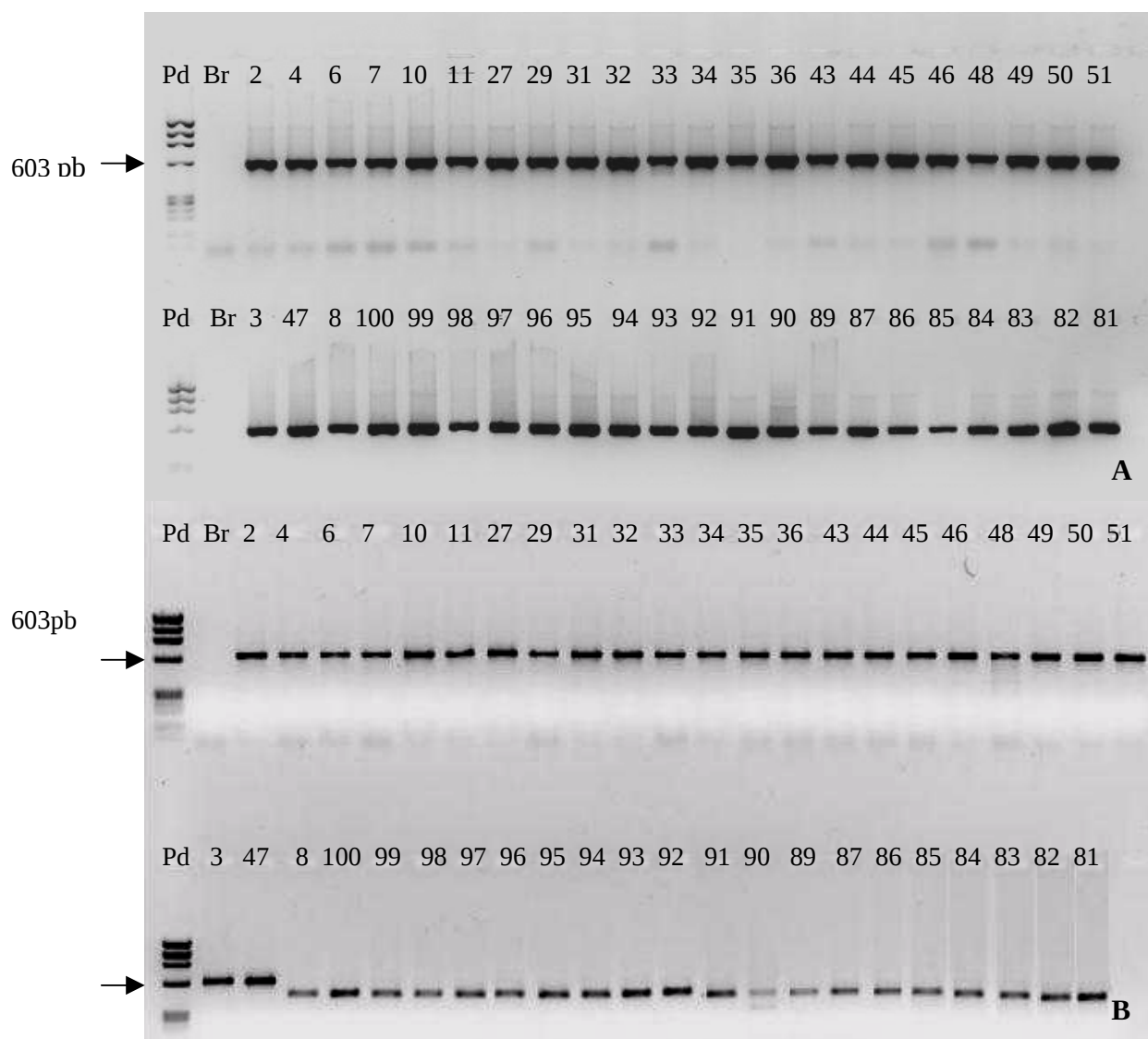


Figura 9. Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores ITS4 e ITS5 e DNAs de Dphm, e Dphs, mencionados no Quadro 1 e de Dph spp, isolados de sementes, extraídos de micélio com STE sob agitação e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. **A** = sem enzima *AluI* e **B** = com enzima de restrição *AluI*. Br (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd – (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.

Quadro 9. Mapa de restrição dos fragmentos amplificados, com os iniciadores ITS₄ e ITS₅ a partir de DNAs isolados de micélio dos isolados 2, 3, 5, 8, 30 e 47, pelo programa Sequencer.

Enzima de restrição	Local do sítio de restrição*pb	
	Grupo 1 Isolados 5, 8, e 30	Grupo 2 Isolados 2, 3 e 47
AluI	*116	-
ApaI	-	145
AvaI	100	472, 497
AvaII	105	468
BanI	59	513
BanII	118	145, 462
Bsp106I	310	266
Bsp1289I	62, 118, 161	145, 518, 462
BspMI	214	360
BstNI	174, 429	71, 403, 468, 508,466
DdeI	368,437	208
DraII	105, 134, 433	141, 504
EcoRI	264	310
FnuIVHI	298, 404, 415	174, 279
HaeIII	136, 403, 435,449,453	127,128, 165,176,505,440
HgiAI	118	-
HhaI	232, 505, 513	67,76,122,348,361,479
HinfI	232,505,513	227,319,327
HpaII	215, 407, 450	127, 170, 361
MboI	16, 327, 525	49, 247, 556
NaeI	408, 451	128, 171
NlaIII	210	143, 372, 470
NlaIV	61, 106, 434	142, 143, 144, 515
PpuMI	105	468
SacI	118	-
RacI	-	17

*pares se bases

4.3.7. Sequenciamento dos fragmentos DNAs amplificados com os iniciadores ITS4 e ITS5

O alinhamento das seqüências dos fragmentos de DNA da região do ITS dos isolados 2, 3, 5, 8, 30 e 47 mostrou tratar-se de dois grupos distintos (Figura 10).

O grupo 1 com os isolados 5, 8 e 30 amplificou um fragmento de 560 pb com os iniciadores ITS4 e ITS5 e o grupo 2 com os isolados 2, 3 e 47 um fragmento de 596 pb.

Esses resultados demonstram que os isolados 3 e 47 possuem seqüência idêntica aos isolados de *meridionalis* na região do ITS, utilizando-se os iniciadores ITS4 e ITS5 .

A comparação das seqüências obtidas dos isolados dos dois grupos com as dos bancos de dados existentes mostrou que:

a) O grupo 1 ao qual pertencem os isolados 5- (Dph-49/98-EMBRAPA), 8 (Dphs-36/94-EMBRAPA) e 30 (Dph-96/97-EMBRAPA) apresentou identidade de 96%. com seqüências dos isolados de *Phomopsis longicolla*, e *Phomopsis sojae* e de 95% com *Diaporthe* sp; *Diaporthe phaseolorum* de 90 a 96%.; *Diaporthe helianthi* de 95 a 96% ; *Phomopsis* sp. de 96%; com os isolados de *Phomopsis vitimegaspora*, *Phomopsis amygdali* e *Phomopsis quercina* a identidade foi de 94%.e *Diaporthe ambigua* 94%.

```

      *          20          *          40          *          60
grupo1 : -----TTTAAACCTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTGCTGGAA : 45
grupo2 : TTGAAAGTAAAAGTCGTACCAAGGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTGCTGGAA : 63
              A
              TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTGCTGGAA

      *          80          *          100          *          120
grupo1 : CGCGCTTC-GGCGCACCCAGAAACCCCTTTGTGAACTTATACCTATTGTTGCCTCGGCGTAGG : 107
grupo2 : CGCGCCCCAGGCGCACCCAGAAACCCCTTTGTGAACTCATACCTTACTGTTGCCTCGGCGCAGG : 126
              CGCGC C GGCGCACCCAGAAACCCCTTTGTGAACT ATACCT TGTTCCTCGGCG AGG

      *          140          *          160          *          180
grupo1 : CCGGCCCTCTTGAAGGAGACAGGGAGCAG-CCCGCCGGCGGCCAACTAACTC : 169
grupo2 : CCGGCCCTCTTGAAGGAGACAGGGAGCAG-CCCGCCGGCGGCCAACTAACTC : 188
              CCGGCC C A G GGCCCC GGAGAC GGAGCAG CCCGCCGGCGGCCAA AACTC

      *          200          *          220          *          240          *
grupo1 : TTGTTTCTATAGTGAATCTCTGAGTAAAAAACATTAATGAATCAAACTTTCAACAACGGAT : 232
grupo2 : TTGTTTCTATAGTGAATCTCTGAGCAAAAAA-CACAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGAT : 250
              TTGTTT TA A GAA CTCTGAG AAAAA CA AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGAT

      260          *          280          *          300          *
grupo1 : CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT : 295
grupo2 : CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT : 313
              CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT

      320          *          340          *          360          *          3
grupo1 : TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTG : 358
grupo2 : TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTG : 376
              TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTG

      80          *          400          *          420          *          440
grupo1 : TTCGAGCGTCATTTCACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCTCTCTGACGGGAGC : 421
grupo2 : TTCGAGCGTCATTTCACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCTGTAGAAGGG--C : 437
              TTCGAGCGTCATTTCACCCTCAAGCCTGGCTTGGTG TGGGGCACTGC GA GGG C

      *          460          *          480          *          500
grupo1 : AGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCGCTAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGTTCTG : 484
grupo2 : AGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCGCTAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTAAACCCTCGCTCG : 500
              AGGCCCTGAAATCTAGTGGCG GCTCGC AGGACCCCGAGCG AGTAGTTA A C G

      *          520          *          540          *          560
grupo1 : GAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGG : 547
grupo2 : GAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGG : 563
              G AGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGG

      *          580          *          600
grupo1 : TAGGAATACCCGC----- : 560
grupo2 : TAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATTAATA : 596
              TAGGAATACCCGC

```

Figura 10. Alinhamento das seqüências dos fragmentos de DNA da região do ITS do grupo 1 isolados, 5 (Dph-49/98), 8 (Dphs-36/94), 30 (Dph-96/97) e grupo 2 isolados 2 (Dphm-CH8), 3 (Dphm-03/99) e 47 (Dphm-8505), utilizando o programa CLUSTAL X e o GeneDoc.

b) O Grupo 2 ao qual pertencem os isolados 2 (DphmCH8), 3 (Dphm 03/99) e 47 (Dphm8505), apresentou identidade de 97% com isolados de *Diaporthe meridionalis*, 94% a 95% de *Diaporthe caulivora*. A identidade apresentada para com os isolados de *Diaporthe phaseolorum* foi de 95 a 96%, *Diaporthe* sp 92%, *Diaporthe helianthi* 90 a 97%, *Phomopsis* sp 91 a 96%. Para os isolados de *Phomopsis quercina* e *Phomopsis vaccinii* a identidade foi de 95%. Além dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, este grupo, apresentou também identidade com seqüências de 3 ascomicetos endomicorizicos na ordem de 92 a 93%.

Comparando-se esses grupos, verifica-se que a seqüência da região do ITS dos isolados 3 e 47, que não amplificaram com o par de iniciadores projetados para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja, possuem alta homologia tanto com os isolados de *Diaporthe meridionalis* como os de *caulivora*. O mesmo não ocorreu com a seqüência dos isolados do grupo 1 que pertencem a outras espécies de *Diaporthe* que não são agentes causais do cancro da haste da soja.

Embora os resultados acima sugiram que os isolados 3 (Dphm-03/99EMBRAPA), e o isolado 47 (Dphm 8505-IAC), provenientes da Bolívia e Frutal/SP, respectivamente, pertencem a variedade *meridionalis*, existe uma diferença entre eles e os isolados utilizados, na região do DNA reconhecida pelos iniciadores projetados DphLe e DphRi, tendo em vista a ausência de produtos de amplificação desses dois isolados com os iniciadores citados.

Estudos de caracterização do complexo *Diaporthe/Phomopsis* realizados por ZHANG et al. (1998), mostraram que existe diferença entre

isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* e entre isolados da var. *meridionalis*, ambos agentes causais do cancro da haste da soja, provenientes de diferentes países e também entre isolados de diferentes regiões dos E.U.A.. Estes autores citam que há possibilidade destas variedades e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, pertencerem a um ancestral comum, sendo que a var. *caulivora* e *meridionalis* formam um grupo monofilético.

Considerando esses fatos, os isolados 3 e 47 podem pertencer a var. *meridionalis* como uma nova variante, distinta do isolado 2, ou mesmo uma variante da var. *caulivora*, ambos agentes causais do cancro da haste da soja, visto que estes isolados foram altamente agressivos nos testes de patogenicidade.

4.3.8. Extração e amplificação do DNA de *Diaporthe phaseolorum* var *meridionalis* em amostras de sementes, utilizando-se PCR

A análise eletroforética, em gel de agarose a 2%, dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em PCR, utilizando-se amostras S.I., com cerca de 60% de infecção de Dphm, mostra que não houve amplificação nas linhas de 1 a 4, no método de extração de DNA em que as sementes foram trituradas sob nitrogênio líquido, sem incubação das sementes. A amplificação de fragmentos de DNA do patógeno ocorreu apenas do DNA extraído de micélio de cultura pura dos isolados de Dphm CH8 (2) e Dphm 45/95 (4), utilizados como controle positivo ,C+, (Figura 11).

Entretanto, na Figura 12, constatou-se a presença de banda correspondente ao fragmento de 418 pb, em todas as repetições da amostra com incidência de 60% de infecção de Dphm, quando se utilizou o método do papel de filtro modificado com 2,4 D e técnica de PCR. A não amplificação do DNA nas sementes sem incubação, pode ter sido devido a pouca quantidade de micélio do patógeno nas sementes, não sendo possível extrair quantidade necessária para amplificação, pelo método utilizado. Esta hipótese pode ser reforçada, tendo em vista a amplificação do DNA, quando as sementes foram incubadas, obtendo-se uma maior quantidade de micélio.

Apesar da eficiência da detecção do patógeno nas sementes quando se utilizou o método do papel de filtro e PCR, observa-se a presença de uma segunda banda de tamanho menor e de intensidade mais fraca do que a banda de 418 pb, provavelmente, devido ao anelamento em regiões de homologia menores que 100%, pela baixa temperatura utilizada, visto que em reações posteriores com temperatura de anelamento de 60 °C, obteve-se apenas um fragmento de 418 pb.

Determinado que o melhor método de detecção do patógeno nas sementes foi uma combinação do método de incubação (papel de filtro modificado com 2,4D) e o emprego da técnica de PCR, foram realizados experimentos visando determinar a sensibilidade do método.

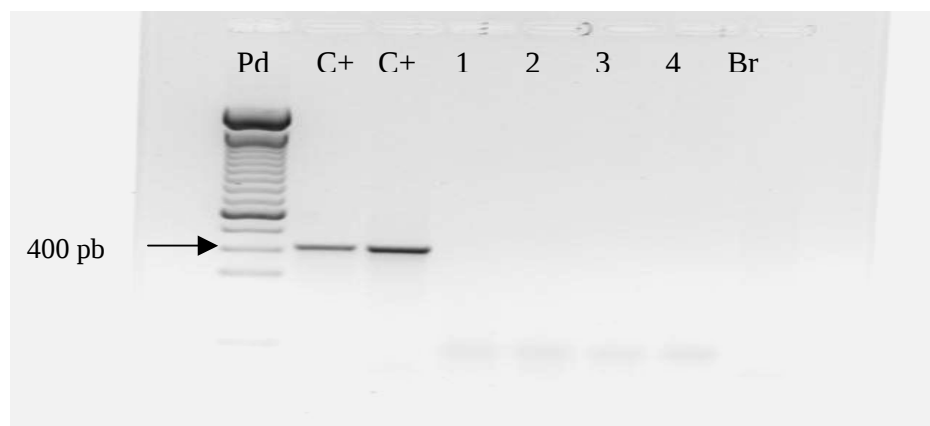


Figura 11. Eletroforese de gel de agarose 2% de produtos de PCR utilizando-se o iniciador DphLe e DphRi, com temperatura anelamento 54° C, em amostras de S.I.; linhas de 1 a 4, com 60,0% incidência de Dphm., sem incubação e trituradas sob N₂. Pd – (Padrão)= 100 pb DNA Ladder, Life Technologies. C+ - (controle positivo) isolado Dphm-CH8 e Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder (Life Technologies)

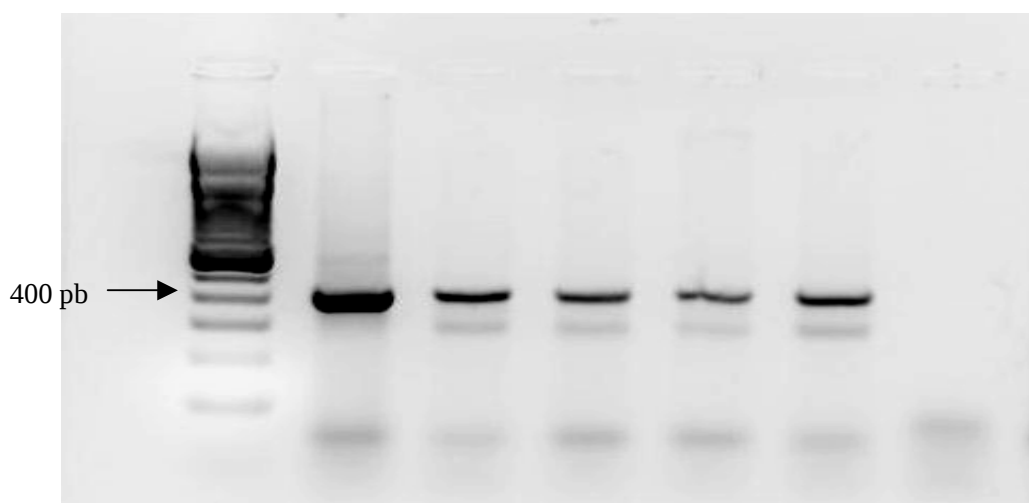


Figura 12. Eletroforese de gel de agarose a 2%, de produtos de PCR de Dphm,utilizando-se o iniciador DphLe e DphRi, com temperatura anelamento 54° C, em amostras de S.I.Inc.por 7 dias, com 60,0% incidência de Dphm, trituradas sob N₂, linhas de 2 a 5 Dphm e SS-= semente sem patógeno, 1C+ isolado CH8, Pd-(Padrão)= 100 pb DNA Ladder (Life Technologies) e Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA.

Como mostra a Figura 13, na amostra de sementes com incidência de 10,0% do patógeno (09 S.S. e 01 S.I. Inc. por três dias), foi constatada a presença de bandas correspondentes ao fragmento de 418 pb nas cinco sub-amostras analisadas.

No método de extração de DNA do patógeno, utilizando a trituração das sementes sob N₂, houve a amplificação do fragmento de 418 pb a partir de DNAs extraídos das amostras de S.I.Inc. por três, cinco e sete dias (Figuras 14). Observa-se que nas S.I.Inc. por três dias, constatou-se apenas duas amplificações do produto do PCR, apresentando bandas fracas somente em sementes com incidência de 10%. Nas incubadas por sete dias, foram constatadas uma banda fraca na amostra com 1% e 5% de incidência de Dphm e quatro bandas com 10,0%. Os melhores resultados foram obtidos com sementes incubadas por cinco dias, constatando-se quatro bandas intensas na amostra com 10%, uma com 5% e duas com 1% de incidência de Dphm.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos anteriores e também da dificuldade da trituração das sementes *in natura*, submeteu-se as amostras a um processo de liofilização, com posterior trituração sob nitrogênio líquido, este procedimento facilitou a trituração das amostras.

O método da liofilização com posterior trituração das sementes sob nitrogênio líquido apresentou melhores resultados que o da trituração das sementes sob nitrogênio líquido. Foram obtidas amplificações de fragmentos de 418 pb, nas amostras de S.I.Inc. por três dias, com amplificação em duas

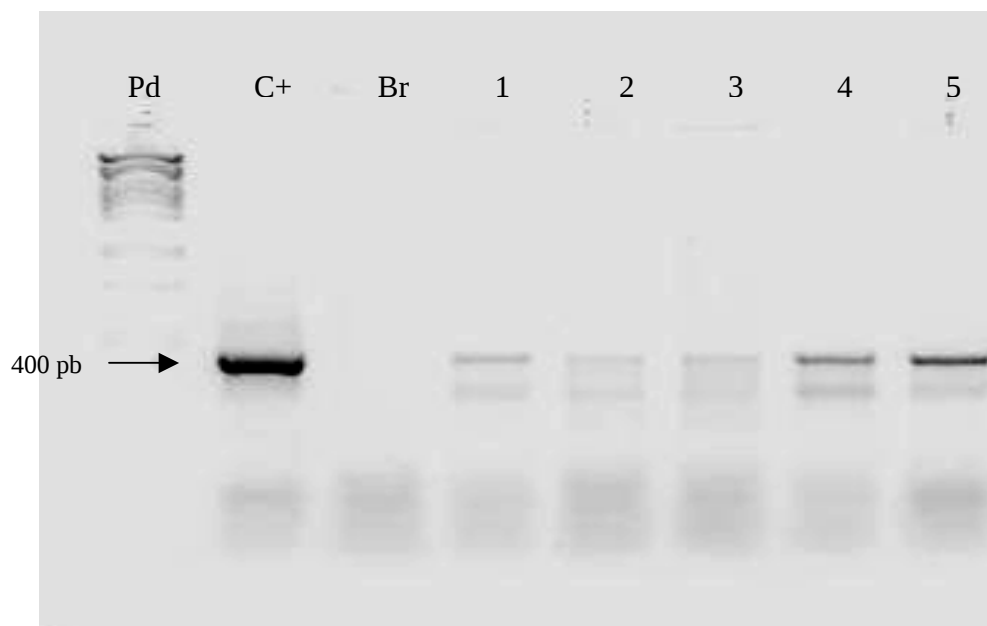


Figura 13 .Eletroforese de gel de agarose 2%, de produtos de PCR de Dphm, utilizando-se o primer DphLe e DphRi, temperatura anelamento 54° C, extraídos de amostra com 9 S.S. e uma S.I. Inc. por 3dias, linhas de 1 a 5 sementes com 10,0% de incidênciade Dphm, C+ - (controle positivo)= isolado Dphm-CH8, Br-(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA., Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder , Life Technologies.

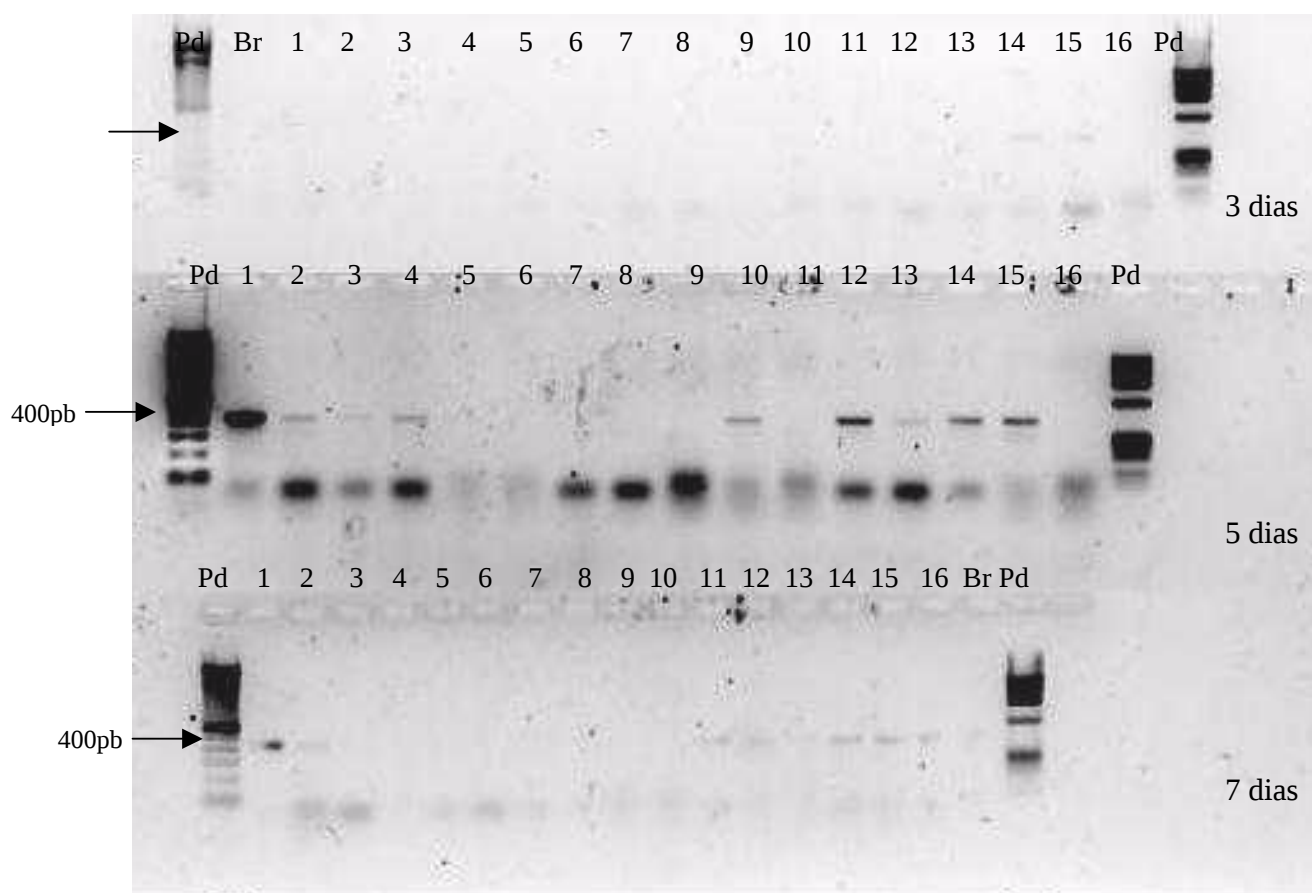


Figura 14. Amplificação de fragmentos de micélio de DNA de Dphm, em gel de agarose a 2%, extraídos de amostra de S.S e S.I.Inc por 3, 5 e 7 dias, apresentando 1,0 , 5,0, e 10% de incidência, trituradas sob nitrogênio líquido. 1.- controle positivo Dphm,, linhas 2 a 6 –1,0 % de incidência, 7 a 11 –5,0%, 12 a 16–10,0%. Br(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd (Padrão) = 100pbDNA Ladder (Life Technologies).

das cinco sub-amostras com 5,0% em três das cinco sub-amostras com 10% de incidência. Amostras de S.I.Inc. por cinco dias, houve amplificação em duas das cinco sub-amostras com 5% e cinco das cinco sub-amostras com 10% de incidência. Nas amostras de S.I.Inc., por sete dias observou-se a presença de quatro bandas fracas nas cinco sub-amostras com incidência de 5% e cinco bem visíveis nas cinco sub-amostras com incidência de 10% (Figura15).

Apesar do método de extração de DNA de Dphm, através da liofilização com posterior trituração das sementes sob nitrogênio líquido, apresentar melhores resultados que o da trituração das sementes sob nitrogênio líquido, em ambos os métodos as bandas não apresentaram boa visualização, com exceção das amostras liofilizadas e trituradas em S.I.Inc. por sete dias e nas S.I.Inc. por cinco dias, trituradas sob nitrogênio líquido.

Na extração do DNA pelo método de lavagem das sementes inoculadas após a incubação de sete dias, conforme ilustra a Figura 16, ocorreu amplificação em todas sub amostras com incidências de 10,0, 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25% do patógeno. Entretanto, a partir de 1% de incidência observou-se bandas mais fracas.

Os resultados obtidos pelo método de extração de DNA do patógeno, com DNA purificado com sílica gel da Wizzard (Promega), estão expressos nas Figuras 16 e 17 .

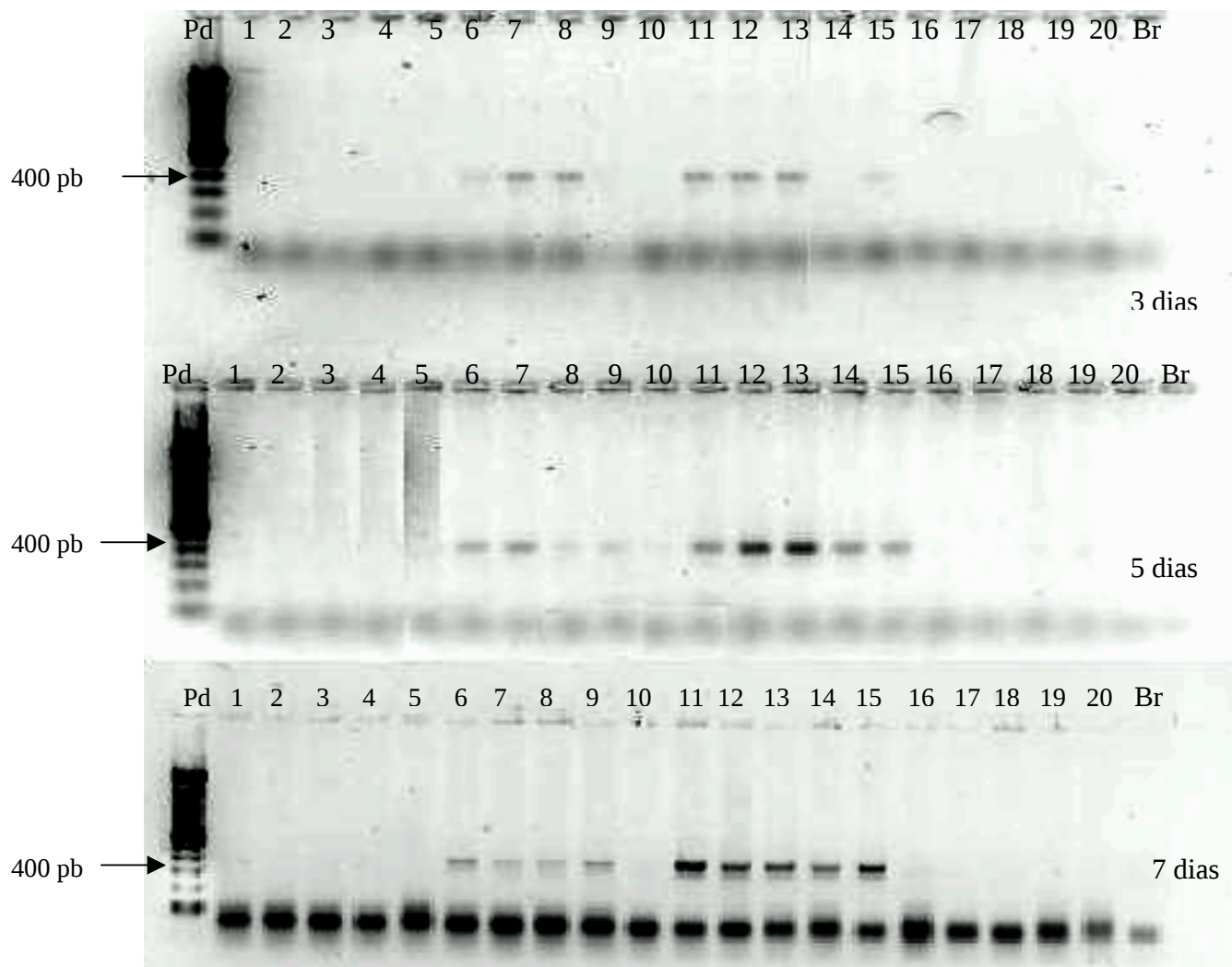


Figura 15. Amplificação de fragmentos de 418 pb de DNA de Dphm, em gel de agarose a 2%, extraídos de amostra de S.S e S.I.Inc por 3, 5 e 7 dias, apresentando 0, 1,0, 5,0 e 10,0% de incidência, liofilizadas e trituradas sob nitrogênio, linhas 1 a 5 – 1,0%, 6 a 10- 5,0%, 11 a 15 –10,0%, 16 a 20 –0,0% incidência, em gel de agarose a 2%. Br (Branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DN. Pd(Padrão)= 100 pb DNA Ladder (Life Technologies).

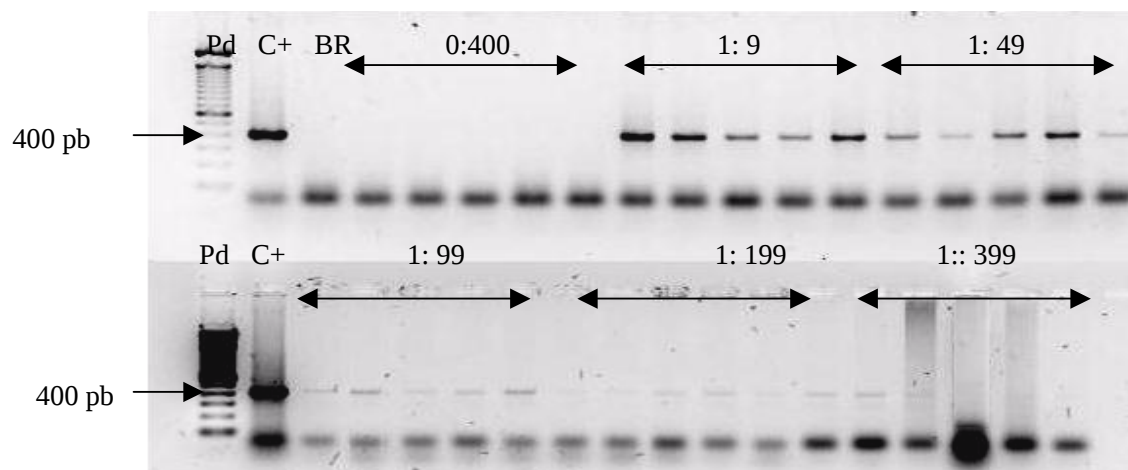


Figura 16. Gel agarose, 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostras de sementes de soja incubadas por 5 dias, com os iniciadores DphLe e DphRi, com 0,00 (0 SS.:400 SS); 0,25 (1 S.I.Inc.: 399 SS); 0,50 (1 S.I.Inc.:199 SS); 1,00 (1S.I.Inc.:99SS), 2,00 (1S.I.Inc.:49 S.S) e 10%(1S.I.Inc.:9 SS) de incidência de Dphm e submetidas a agitação, C+ (controle positivo) isolado 2. Br (Branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd-(Padrão) 100pbDNA Ladder (Life Technologies).

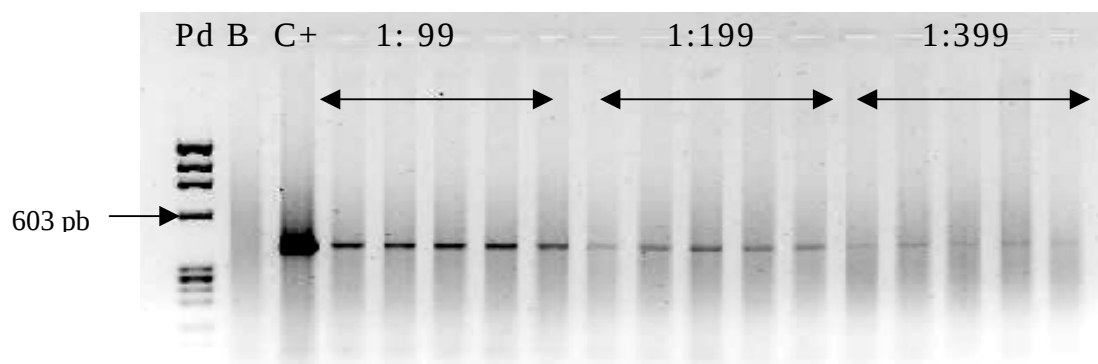


Figura 17. Gel agarose, 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostra de sementes de soja, incubadas por 7 dias, com 1,00 (1 S.I.Inc.: 99 SS), 0,50 (1 S.I.Inc : 199 SS) e 0,25 % (1 S.I.Inc: 399 S.S) de incidência de Dphm, submersas em STE (0,5 mL / semente) e o DNA foi purificado em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+ (controle positivo) isolado 2. Br (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd (Padrão) = ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.

Nos resultados apresentados nas Figuras 16 e 17 verifica-se que foi possível detectar por este método, uma semente infectada com Dphm em amostra de 400 sementes (0,25% de incidência). Entretanto, nas amostras de sementes com menores incidências do fungo, a partir de 1,0. 0,5 e 0,25%, com DNA purificado com sílica gel, apresentaram melhores visualizações das bandas, comparando-se com o método de extração sem purificação do DNA com sílica gel.

Analisando-se os resultados apresentados nos testes de sensibilidade, as aparentes discrepâncias, no que se refere à presença ou ausência de amplificação, bem como bandas fracas nas repetições, nos diferentes dias de incubação e incidência de Dphm, podem ser atribuídas à quantidade de inóculo que as sementes apresentam, refletindo na colonização do patógeno sobre as mesmas, quando são submetidas à incubação, interferindo na concentração do DNA extraído, pois existe mais possibilidade de se obter maior quantidade de DNA, quanto maior for a quantidade de micélio sobre às sementes.

Observa-se também uma melhor visualização das bandas, em amostras contendo menor número de sementes sem o patógeno em relação às sementes portadoras de Dphm. Estes resultados evidenciam que existe uma relação direta entre incidência do patógeno na amostra e sementes livres do patógeno, quanto maior for a incidência maior é a quantidade de DNA extraído.

Considerando estes fatos, visando melhorar a eficiência de extração, o período de incubação das sementes de pelo menos sete dias, seria

aconselhável para a obtenção de uma maior quantidade de micélio, sobretudo para as sementes portadoras de pouco inóculo.

4.4. Avaliação de metodologia para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em amostras comerciais de sementes de soja

Comparando-se os métodos: papel de filtro modificado-2,4D, plaqueamento em ágar com o meio Czapeck e o método do papel filtro modificado-2,4D associado a PCR, na detecção de Dphm em sementes de soja, foi verificado que o último método foi o que apresentou resultado mais confiável na identificação do agente causal do cancro da haste da soja em sementes.

Os métodos papel de filtro modificado-2,4D e plaqueamento em ágar com meio Czapeck não permitiram distinguir morfológicamente o fungo Dphm das sementes inoculadas, colocadas no centro da placa de Petri, das outras espécies de Dph que se desenvolveram sobre as outras sementes, durante o período de incubação de sete dias. YORINORI (1990) cita que a variedade *meridionalis* apresenta uma coloração típica de micélio e picnídio que se desenvolvem sobre as sementes ou mesmo ao redor delas, podendo ser visualizada no papel de filtro, características estas que podem ser usadas como indicativo para identificação da var. *meridionalis* (Figura 18).

Entretanto, devido a grande variabilidade que ocorre no complexo *Phomosis/Diaporthe*, a identificação de Dphm, quando se utiliza como

parâmetro a coloração do micélio e a presença de picnídios em amostras com alta incidência de *Diaporthe* sp., não é confiável. Além disso, em muitos casos, não há a formação de corpos de frutificação do fungo, durante o período de incubação (Figura. 19).

Em estudos de métodos para detecção de fungos em sementes de soja, VECHIATO et al. (1995) constataram que para facilitar a identificação de *Phomopsis* sp., os métodos do papel de filtro e congelamento a 20 °C foram os mais efetivos e que havia necessidade de um período de incubação de nove a 13 dias, para expressar eficientemente a presença do fungo.

O método do plaqueamento em ágar com meio Czapeck, que parecia ser promissor para identificar a variedade *meridionalis* das outras espécies de *Diaporthe*, em relação ao padrão de crescimento e coloração do micélio (Figura 20), mostrou as seguintes limitações: a) nos estudos micológicos com os diferentes isolados estudados, o isolado 46 (Dphm 8496) apresentou um padrão de crescimento e coloração do micélio totalmente diferente dos isolados da variedade *meridionalis*, sendo classificado no grupo 4, onde foram agrupados outros isolados de Dph.; b) a quantidade de inóculo presente na semente que refletiu no desenvolvimento do patógeno no meio, como ilustrado na Figura 21, originou micélio tão ralo que impossibilitou a definição de sua coloração ou tipo de micélio; c) além do custo em relação ao papel de filtro modificado-2,D, a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio, que as sementes são submetidas, pode inviabilizar as estruturas fúngicas que estão na superfície das sementes, e *Diaporthe* spp. pode estar tanto interna como

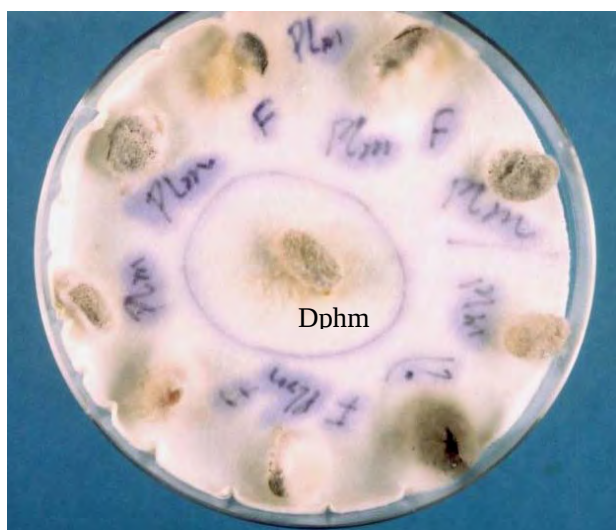


Figura 18. Semente colonizada por de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, no centro da placa, e por outras espécies de *Diaporthe* spp., detectadas pelo método do papel de filtro modificado-2,4D.

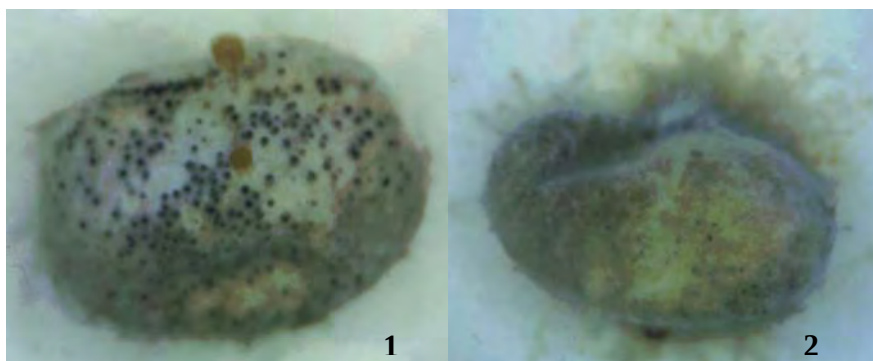


Figura 19. Sementes de soja da cultivar IAS5, colonizadas por *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, com formação de picnídios (1) e sem picnídio (2), após período de 7 dias de incubação.

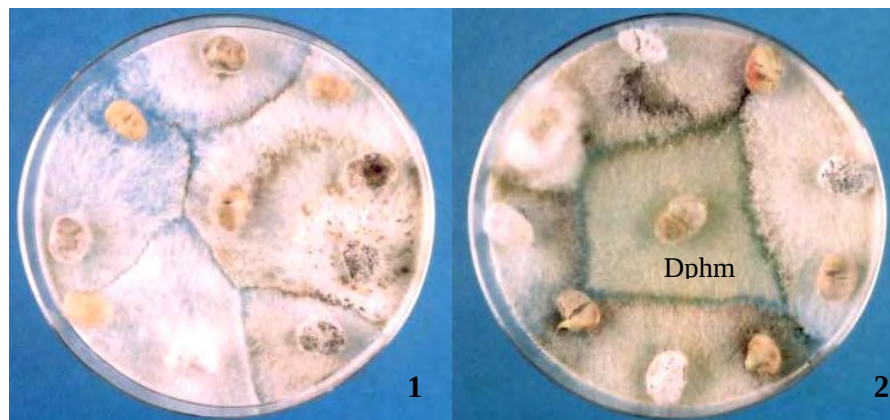


Figura 20. Coloração e tipos de micélio de *Diaporthe* spp. **(1)** e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, no centro da placa **(2)**, colonizando sementes de soja, utilizando-se o método do plaqueamento em meio Czapeck.



Figura 21. Diferentes crescimentos miceliais de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, em sementes de soja detectado pelo método do plaqueamento em agar, em meio Czapeck.

externamente nas sementes, comprometendo os resultados da análise.

A Figura 22 mostra os resultados obtidos pelo método papel filtro modificado com 2,4D, utilizando-se oito amostras comerciais (A1 a A8), com incidências e proporções de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* citadas nos Quadros 3 e 4. Nas duas linhas iniciais de cada amostra, constata-se que não houve amplificação, pois as amostras não apresentavam incidência de Dphm, e nas duas linhas seguintes à observa-se amplificação de DNA de Dphm apresentando bandas mais ou menos evidentes dependendo do número de sementes infectadas utilizadas.

O método utilizando PCR após incubação das sementes, apesar de mais trabalhoso e oneroso que os métodos utilizados rotineiramente para detecção de fungos em sementes de soja, é o mais confiável para detecção de Dphm, com uma sensibilidade de até uma semente infectada em uma amostra de 400 sementes (1:400).

Considerando que em análise de sementes, no que se refere à sanidade, a amostragem recomendada do lote é de, no mínimo, 400 sementes por amostra, quando a incidência de Dph ou micélio branco suspeito for alta na amostra e/ou houver uma pequena quantidade de micélio suspeito colonizando as sementes, a amostra poderá ser subdividida, em 4 sub-amostras de 100 ou 8 sub-amostras de 50 sementes, perfazendo um total de 400 sementes. Esta estratégia visa obter um menor número de sementes livres do patógeno em relação às sementes com Dphm, sendo possível detecta-lo em pelo menos uma das sub-amostras, resultando em uma melhor visualização do fragmento

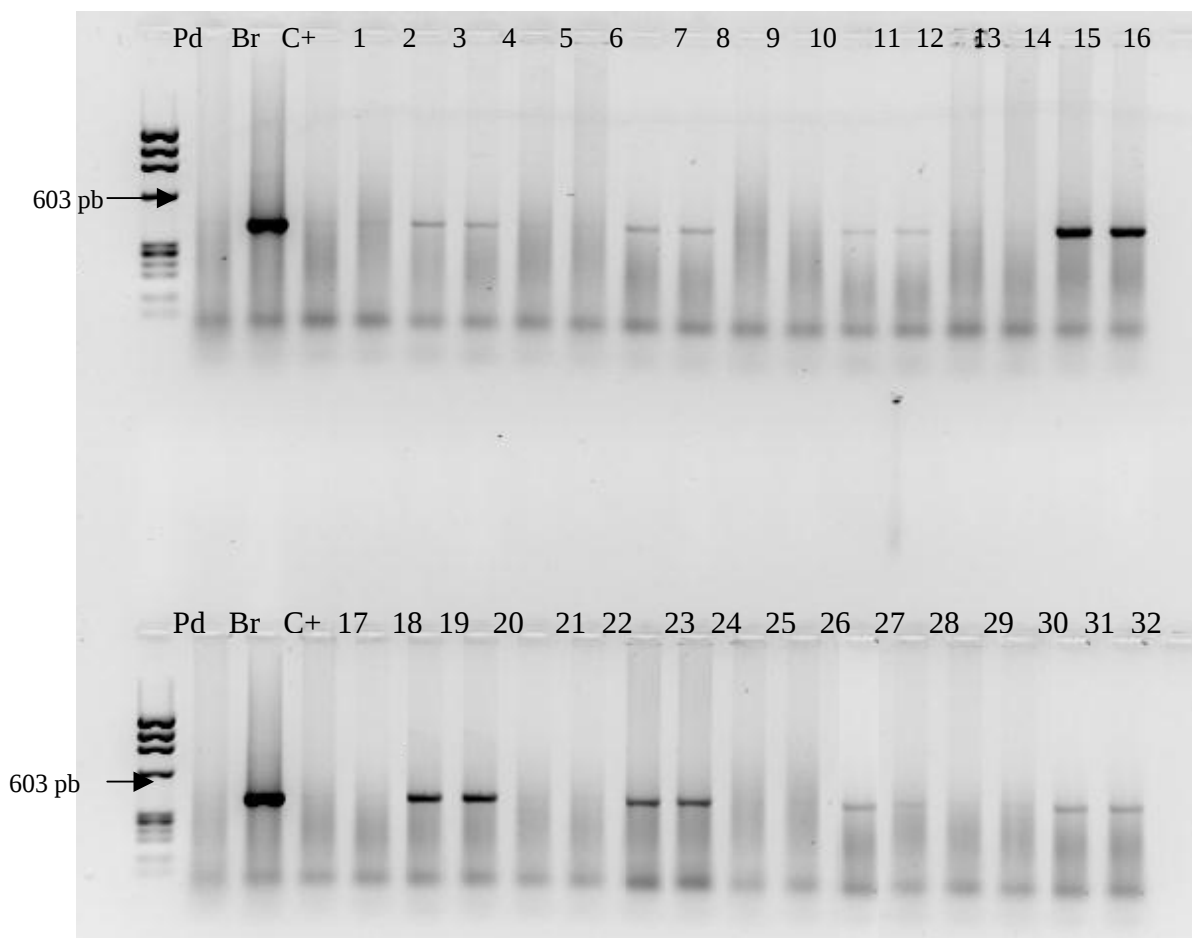


Figura 22. Gel agarose, 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de amostras comerciais de SS e S.I.Inc.com Dphm, listadas no Quadro 3, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard (Promega). C+ -(controle positivo) = DNA de Dphm- CH8, Br -(Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd - Padrão = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) *marker* 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp. Linhas apresentam 4 repetições de cada amostra, sendo 2 sem Dphm S.S e 2 com 1 S.I.Inc.

Linhas 1 a 4 – **A1**; 5 a 8 - **A5**; 9 a 12 - **A6**, 13 a 16 - **A7**; 17 a 20 - **A8**; 21 a 24 – **A2**; 25 a 28 – **A3** e 29 a 32 – **A4** .

amplificado na reação de PCR, no gel de agarose.

A especificidade dos iniciadores para identificação do patógeno alvo, quando se utiliza lavagem das sementes com STE ou mesmo água esterilizada, é necessária na identificação e detecção de fungos de sementes quando se emprega método de incubação de sementes e PCR, objetivando extração de DNA a partir de micélio, pois juntamente com o DNA do patógeno alvo é extraído também DNA de muitos outros microrganismos que colonizam as sementes (Quadro 4)

Os resultados obtidos neste trabalho, assim como obtidos por outros pesquisadores evidenciam que existe uma maior facilidade de extração de DNA a partir do micélio e de esporos de fungos, portanto, uma pré-incubação das sementes é recomendada para permitir o desenvolvimento de micélio e a. germinação dos esporos.

Assim, a utilização de PCR associado à incubação de sementes, com iniciadores específicos projetados para identificação de *Tilletia indica*, em sementes de trigo, em trabalho desenvolvido por SMITH et al. (1996) mostrou que em sementes infestadas artificialmente com teliósporos germinados, o fungo pode ser detectado em amostras com níveis de incidência de um a dez teliósporos em 50 g de sementes, enquanto que para teliósporos não germinados houve necessidade de 1000 teliósporos para uma identificação confiável. Estes autores mencionam também que esta quantidade de teliósporos não tem aplicação prática quando se deseja detectar *T. indica* em amostras de sementes de trigo.

PRYOR & GILBERTSON (2001) também detectaram *Alternaria radicina*, em sementes de cenoura, utilizando método de incubação de sementes e PCR, em amostras de 1g (aproximadamente de 800 a 1000 sementes), utilizando uma única placa de Petri descartável (100 x 15 mm), incubando-as em condições de alta umidade, por cinco dias a 28 °C.

Neste sistema esses autores conseguiram detectar uma semente de cenoura infectada com *Alternaria radicina* em lotes de até 1000 sementes (0,1%) enquanto para o sistema soja/*Diaporthe* foi possível detectar até um nível de infecção de 0,25% (uma em 400 sementes).

Para cenoura e para outras sementes de tamanho pequeno, 1 g de sementes pode ser submersa em 5 mL de tampão extração de DNA, enquanto que com 5 mL seria possível cobrir somente sete a dez sementes maiores, como as de soja ou as de feijão (correspondente a 1g). Para 400 e 1000 sementes de soja seriam necessários respectivamente 200 e 500 mL de tampão, o que diluiria muito a concentração do DNA extraído do micélio do fungo, sobretudo quando sua incidência na amostra for baixa, correspondendo a apenas uma semente colonizada.

Apesar da metodologia desenvolvida ser eficiente na detecção e identificação de Dphm em sementes de soja, devido à especificidade do iniciador projetado e sensibilidade na detecção do patógeno de uma semente infectada em uma amostra de 400 sementes, o método de extração de DNA do patógeno nas sementes deverá ser aprimorado, visando melhorar a qualidade do produto resultante da extração, refletindo na melhoria da

visualização das bandas em gel de agarose, em amostras acima de 100 sementes.

Em relação aos resultados obtidos da não amplificação do DNA de dois isolados de Dphm (3 e 47), que apresentaram sintomas de cancro da haste em plantas de soja, não inviabiliza a utilização do método em testes de rotina em laboratório de análise de sanidade de sementes e em programas de certificação de sementes para sanidade.

A não amplificação de isolados patogênicos, com iniciadores recomendados como específico, para identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, foi observado por VIERA et al. (2001) em estudos para verificar a viabilidade e especificidade do uso de PCR, em 42 isolados provenientes de diversos locais. Entretanto, estes autores concluíram que a técnica de PCR é adequada para identificação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, podendo ser utilizada em diagnose rotineira e em programas de certificação de sementes.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o método de incubação de sementes (papel filtro com 2,4 D) associado à técnica de PCR, poderá ser utilizado na diagnose de *D phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja, em laboratório de rotina de sementes, por ser um método rápido e de fácil execução, apresentando como limitação apenas o custo, um pouco maior, quando comparado com a maioria dos métodos rotineiros utilizados em patologia de sementes na detecção de fungos

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- 1) A diferenciação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, agente causal do cancro da haste da soja, de outras espécies de *Diaporthe* presentes em sementes não é confiável quando se utiliza como parâmetro as características de tipo, coloração e crescimento micelial nos meios de cultura BDA, soja e Czapeck, além da morfologia de conídios.
- 2) Os iniciadores projetados DphLe e DphRi diferenciam *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* de outras espécies de *Diaporthe*, amplificando um fragmento de 418 pares de bases do DNA.

3) O método mais confiável para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* de outras espécies presente nas sementes é o método de incubação das sementes com papel de filtro com 2,4D associado à técnica de PCR.

4) O melhor método de extração de DNA em sementes colonizadas por *Diaporthe* spp. é o da lavagem das sementes com STE e purificação do DNA em resina de sílica gel da Wizard (Promega).

5) A sensibilidade do método para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes é de uma semente infectada em amostragem de 400 sementes de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHOW, A.L. , CARDWELL, R.M. A compative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybeans. *Phytopathology*, v.44, p.319-25,1954.

AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathol.*, Piracicaba, v.2, p.3-15, 1997.

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos. *Rev. Annu. Patol. Plantas*, v.1, p.165-96, 1993.

BLAKEMORE, E.J.A., JACCOUD FILHO, D.S., REEVES, J.C. PCR for detection of *Pyrenophora* species, *Fusarium moniliforme*, *Stenocarpella maydis* and the *Phomopsis/Diaporthe* complex. In: SCHOTS, A. (Ed). Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification. CAB Wallingford International: 1994. p.205-13.

BOLLETIM AGROPECUÁRIO, [on line], nº 301, 2001. Disponível em :< [http:// www.boletimpecuario.com.br](http://www.boletimpecuario.com.br).> Acesso em: 04 set. 2001.

BONDE, M.R., PETERSON, G.L., MAAS, J.L. Isoenzimas comparisons of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*, v.81, p.1523-8, 1991.

BRUN, T.D., THOMAS, J.W., TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v.22, p.525-64, 1991.

CARUSO, R. *Soja: uma caminhada sem fim*. Campinas: Fundação Cargill, sd. 95 p.

CISAR, C.R., THORNTON, A.B., TEBEEST, O.D. Isolates of *Colletotrichum gloesporioides* (Teleomorph: *Glomerella cingulata*) with different host specifities mate on Northern Jointvetch. *Biol. Control*, v.7, p.75-83, 1996.

COSTA, J.A., MARQUEZAN, E. *Característica dos estádios de desenvolvimento da soja*. Campinas: Fundação. Cargill, 1982. 30p.

DIANESE, J.C. Taxonomia dos fungos: grandes grupos - reinos e filos. *Fitopatol. Brás.*, v.22, p.227, 1997.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina,PR). *Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil- 1994/95*. Londrina, 1994. 127p. (Documentos, 77).

FERNANDEZ, F.A., HANLIN, R.T. Morfological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, v.88, p.425-40, 1996.

FERREIRA, H., BERIAM, L.O.S., GONÇALVES, E.R., ROSATO, Y. B. Caracterização de isolados brasileiros de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* por ribotipagem e RAPD. *Fitopatol. Bras.*, v.16, p.178-85, 1997.

FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. p.220.

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

FREEMAN, S., KATAN, T., SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloesporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.1014-20, 1996.

HIGLEY, P. M., TACHIBANA, H. Physiologic specialization of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in soybean. *Plant Dis.*, v.71, p.815-7, 1987.

HOBBS, T.W., PHILLIPS, D.V. A identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates from soybean. *Phytopathology*, v.75, p.500, 1985.

INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. 482p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. *Internacional rules for seed testing. Proceedings International Seed Testing Assoc.*, v.31, p.1-152, 1966.

JENG, R.S., BERNIER, L., BRASTER, C.M. A comparative study of cultural and eletrophorectic characteristics of the eurasian north american races of *Ophisostoma ulmi*. *Can. J. Bot.*, v.66, p.1325-33, 1988.

JOHANSON, A., CROWHURST, R.N., RIKKERINK, E.H.A., FULLERTON, R.A., TEMPLETON, M.D. The use of specie-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathol.*, v.43, p.701-7, 1994.

KEELING, B.L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *culivora*. *Phytopathology*, v.77, p. 807-9, 1982.

KEELING, B.L. Observations on pathotypes of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* . *Phytopathology*, v.75, p.510, 1985a.

KEELING, B.L. Soybean cultivar reactions to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and pathogenic variation among isolates. *Plant Dis.*, v.69, p.132-3, 1985b.

KEELING, B.L. Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Plant Dis.*, v.72, p.200-2, 1988.

KOHN, L.M. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia*, v.84, p.139-53, 1992.

KOIKE, M., FUJITA, M., OSHIMA, S. Random amplified polymorphic DNA analysis of Japanese isolates of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum*. *Plant Dis.*, v.80, p.1224-7, 1996.

KULIK, M.M. Symptomless infection, persistence, and production of picnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli* and *Phomopsis sojae*, and the taxonomic implications. *Mycologia* v.76, p. 274-91, 1984.

LUTTRELL, E.S. *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* on crop plants. *Phytopathology*, v.37, p.127-50, 1947.

McGEE, D.C., BIDDLE, A. Seed borne *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, in Iowa and its relationship to soybean stem canker in the southern USA. *Plant Dis.*, v.71, p.620-22, 1987.

MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: taxonomic considerations. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE,4, 1989, Buenos Aires. *Proceedings*. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1699-06.

NEALE, D.B., DEVEY, M.E., JERMSTAD, K. D. Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New For.*, n.5. p.1-17, 1992.

NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London: The Macmillan Press, 1977. 839p.

NICHOLSON, P. , REZANOOR, H.N. Classification of a world-wide collection of isolates of *Pseudocercospora herpotriches*. *Plant Pathol.*, v.42, p.58-66, 1993.

PHILLIPS, D.V. A selective medium for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, v.74, p.815, 1984.

PLOFFER, L. D. The *Diaporthe/Phomopsis* disease complex of soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE,4, 1989, Buenos Aires. *Proceedings*. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1695-7.

PRYOR, B.M., GILBERTSON, R.L. A PCR basead assay for detection of *Alternaria radicina* on carrats seed. *Plant Dis.*, v.85, p.18-23, 2001.

SCHILLING, A.G., MOLLER, E.M., GEIGER, H.H. Polimerase Chain reaction-basead assys for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, v.86, p.515-22, 1996.

SINCLAIR, J.B. , BACKMAN, P.A. *Compendium of soybean diseases*, 3. ed, St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989.

SMITH, O.P., PETERSON, G.L., BECK, R.J., SCHAAD, N.W., BONDE, M.R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of carnal bunt of wheat. *Phytopathology*, v.86, p.115-222, 1996.

SREENIVASAPRASAD, S., SHARADA, A., BROWN, A.E., MILLS, P.R. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycol. Res.*, v.97, p.995-1000, 1993.

STAKMAN, E.C. , HARRAR, J.G. *Principles of the Plant Pathology*. New York: The Ronald Press Company, 1957. 581p.

STANOSZ, G.R., SMITH, D.R., GUTHMILLER, M.A. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* from the west central united states by means of random amplified polymorphic DNA marker analysis. *Plant Dis.*, v.80, p. 1175-78, 1996.

THREINEN, J. T., KOMMEDAHL, T. , KLUG, R. J. Hybridization between radiation induced mutants of two varieties of *Diaporthe phaseolorum*. *Phytopathology*, v.49, p.797-801, 1959.

TUITE, J. *Plant pathological methods – Fungi and Bacteria*, Minneapolis: Durgess, 1969. 239p.

VECHIATO, M.H., KOHARA, E.Y., LASCA C.C. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de soja com e sem tratamento fungicida. *Fitopatol. Bras.*, v.20, p.352, 1995.

VEIRA, B.A.H., SOUZA R.M., FIGUEIRA, A.R., BOARI, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatol. Bras.*, v.26, p.737-40, 2001.

WEHMEYER, I. E. *The genus Diaporthe Nitschke and its segregates*. Ann Arbor: University of Michigan Press, 1933. 349p.

WELCH, A.W. , GILMAN, J.C. Hetero and homotalic types of *Diaporthe* on soybeans. *Phytopatology*, v.38, p.628-37, 1948.

WELSH, J. , McCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.7213-18, 1990.

WILLIAM, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers

are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p. 6531-5, 1990.

YORINORI, J. T. *Cancro da haste da soja*. Londrina : Centro Nacional de Pesquisa de Soja/EMBRAPA, 1990. 8p. (Comunicado técnico, 44).

YORINORI, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, FEALQ, 1991. p.109-13.

YORINORI, J.T. *Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle*. Londrina: Embrapa - Soja, 1996. 75p. (Circular Técnica,14).

ZHANG, A. W. , HARTMAN, G.L., RICCIONI, L., CHEN, W. D., MA, R.Z., PEDERSEN, W .L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Dis.*, v.81, p.1143-9, 1997.

ZHANG A. W., RICCIONI, L., PEDERSEN W.L., KOLLIPARA, K.P.,
HARTMANG, G.L. Molecular identification and phylogenetic
grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates
from soybean. *Phytopathology*, v.88, p. 1306-14, 1998.

ZHANG, A. W., HARTMANG, G.L., CURIO-PENNY, B., PEDERSEN,
W.L., BECKER, K.B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum*
and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology*, v.89,
p.796-804, 1999.