

SANIDADE DE SEMENTES DE GRANDES CULTURAS

Juliana Ramiro

Objetivos da aula



- Apresentar as principais doenças que possuem agentes causais associados às sementes das grandes culturas do Brasil (soja, feijão, algodão, arroz, trigo e milho);
- Sintomatologia;
- Métodos de detecção recomendados pelo Manual de Análise Sanitária de Sementes - MAPA;
- Estruturas de identificação via características morfológicas;
- Métodos moleculares de detecção.

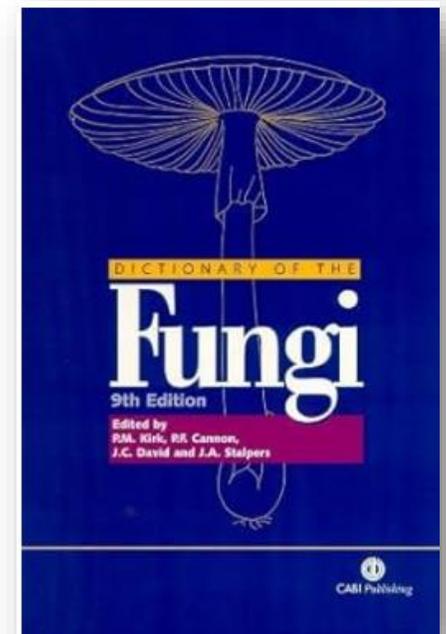
Reprodução sexuada e assexuada - classificação



- ✓ Fase assexuada - fase anamórfica, anamorfase, fase imperfeita
- ✓ Fase sexuada - fase teleomórfica, teleofase, fase perfeita

Holomorfo: o fungo como um todo, em todas as suas fases

Classificações diferentes das duas fases!!! Dictionary of the Fungi (2001) = início do fim!!!



One fungus = One name



[IMA Fungus](#), 2011 Dec; 2(2): 113–120.

PMCID: PMC3359808

Published online 2011 Jul 12. doi: [10.5598/imafungus.2011.02.02.01](https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.01)

PMID: [22679595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22679595/)

One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR

[John W. Taylor](#)*

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

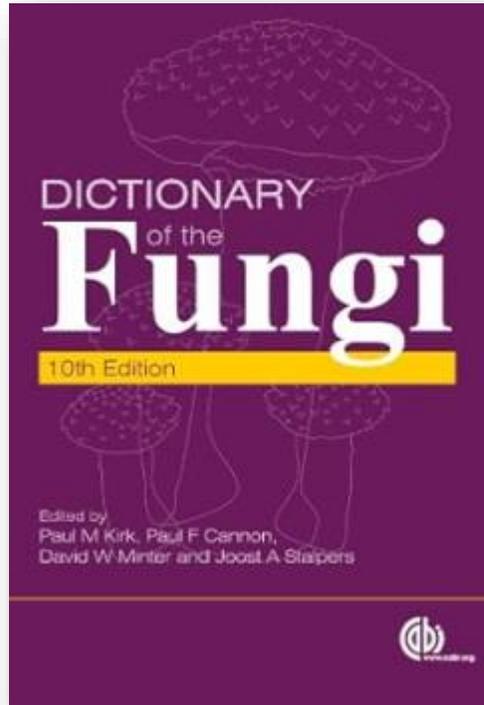
Go to:

Some fungi with pleomorphic life-cycles still bear two names despite more than 20 years of molecular phylogenetics that have shown how to merge the two systems of classification, the asexual

“Crise nomenclatorial”

Propõem a criação de um MycoCode

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359808/>



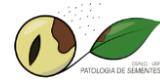
Última versão - 2011

Hoje...

<http://indexfungorum.org/>

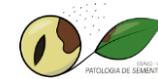
<https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/F>

<https://www.mycobank.org/>

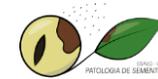


SANIDADE DE SEMENTES DE SOJA

Principais patógenos veiculados pelas sementes de soja



Patógenos	Doença
<i>Cercospora</i> spp.	Mancha Púrpura/ Crestamento Foliar
<i>Colletotrichum</i> spp.	Antracnose
Complexo <i>Diaphorte</i> / <i>Phomopsis</i> spp.	Queima (seca) da Haste e das Vagens/ Cancro da Haste/ Podridão das sementes
<i>Corynespora cassicola</i>	Mancha Alvo
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Podridão cinza da raiz da soja / Podridão de carvão
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Mofo Branco
<i>Heterodera glycines</i>	Nematoide do Cisto



Patógenos que danificam sementes e grãos

Patógenos	Doença
<i>Aspergillus</i> spp.	Podridão das sementes
<i>Fusarium</i> spp.	Podridão das sementes
<i>Penicillium</i> sp.	Podridão das sementes



MÉTODOS DE DETECÇÃO

1. EXAME DA SEMENTE NÃO INCUBADA

- Método da inspeção visual

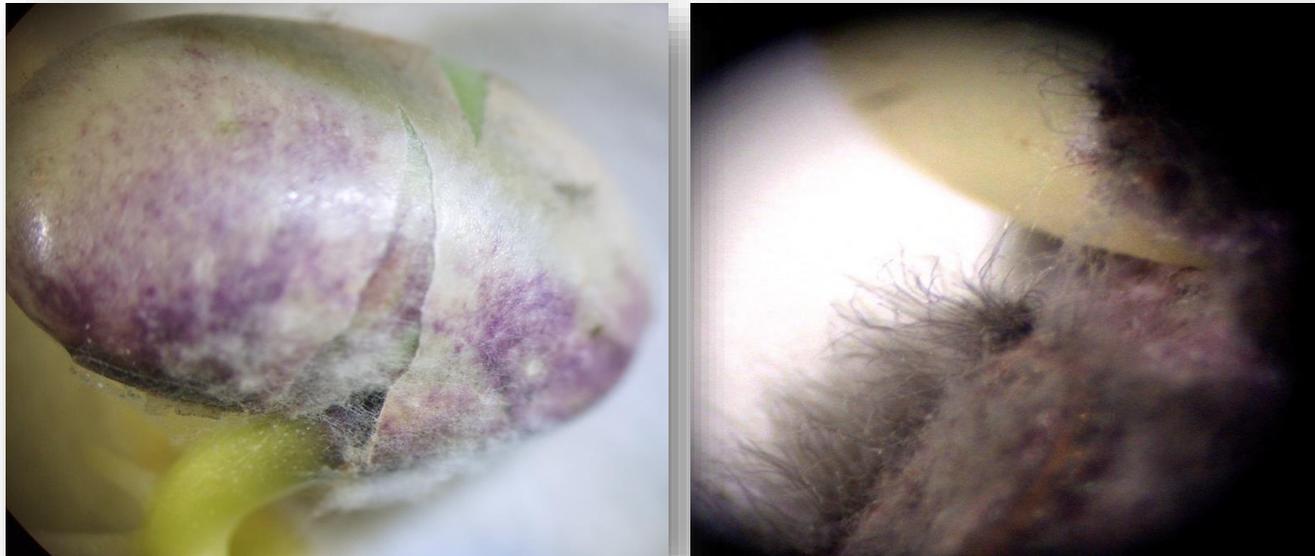
2. EXAME DA SEMENTE APÓS INCUBAÇÃO

- Método do Papel de Filtro Padrão e variação: T=15°C, 15 dias, escuro
- Método do meio semi seletivo ágar-azul de bromofenol
- Método do Rolo de Germinação

Crestamento foliar e Mancha Púrpura - *Cercospora* spp.

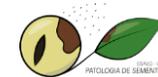


Foto: EMBRAPA



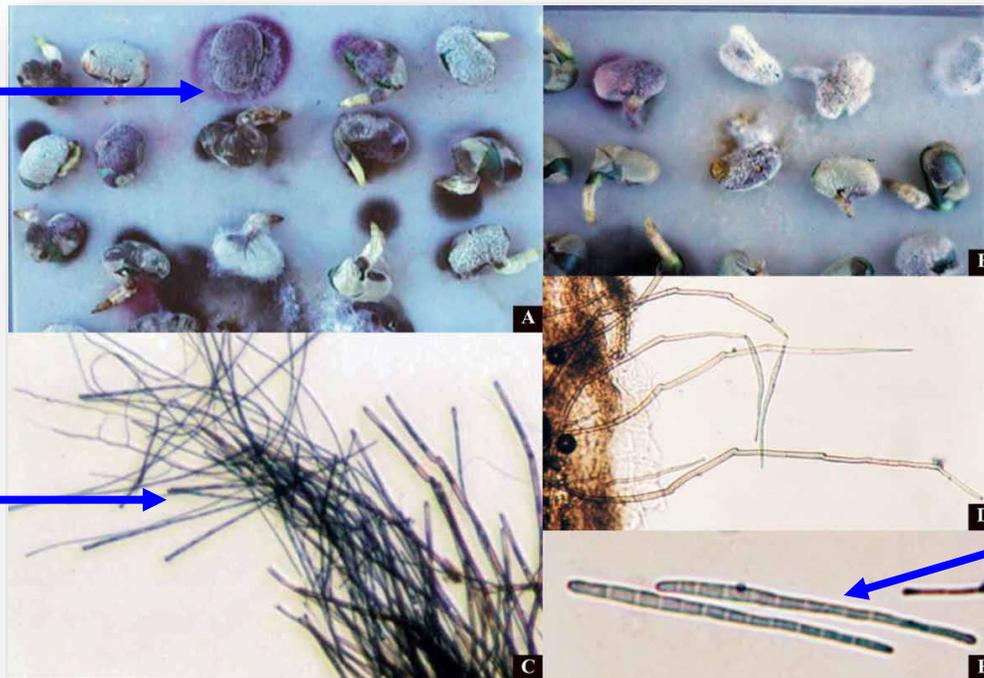
Cercospora spp. em sementes

Fotos: M. H. Moraes



Micélio superficial,
relativamente denso,
com coloração, cinza a
púrpura

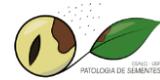
Conidióforos
fasciculados



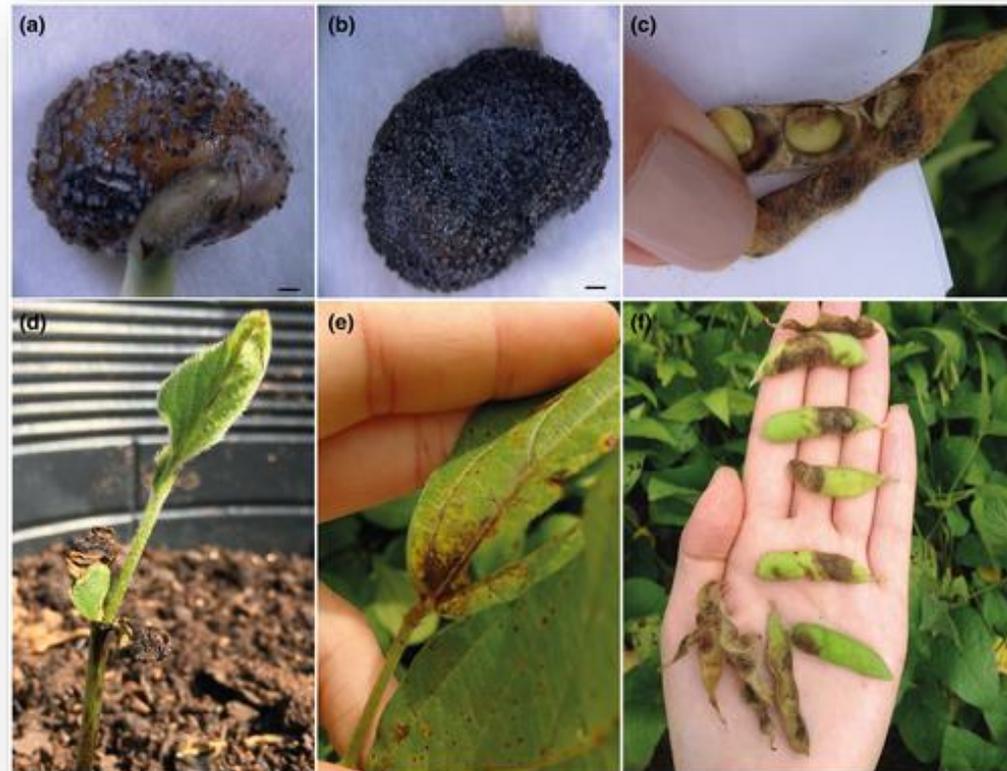
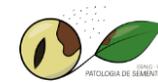
Conídios são
alongados, formados
nos extremos e ao
lado dos conidióforos

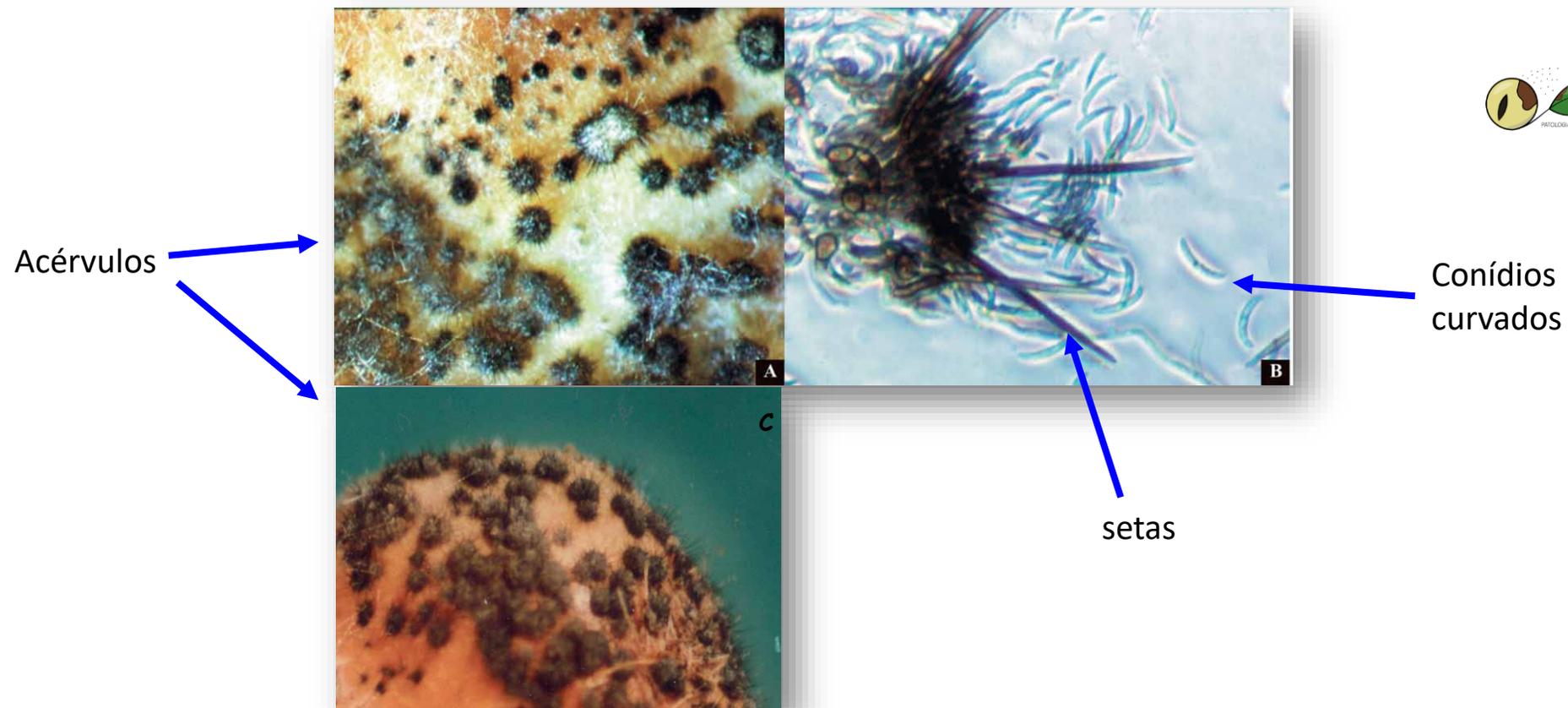
Cercospora spp. em sementes **Mancha púrpura** e micélio do fungo (A, B); Conídios e conidióforos em lâminas microscópicas (C, D, E)

Antracnose - *Colletotrichum* spp.



Antracnose - *Colletotrichum* spp.





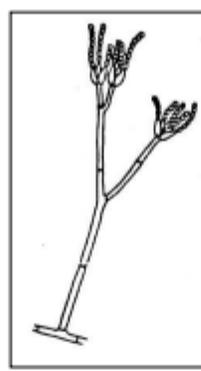
Acérvulos de *Colletotrichum* spp. em sementes (A, C) e conídios e **setas** em lâminas microscópicas (B)

Espécies de conídios curvados: *C. spaethianum*, *C. truncatum*, and *C. dematium* s.c., plus *C. chlorophyti*
Espécies de conídios cilíndricos/retos: *C. gloeosporioides*, *C. gigasporum*, *C. magnum*, and *C. orchidearum* s.c.

Morfologia dos conidióforos

Conidióforos

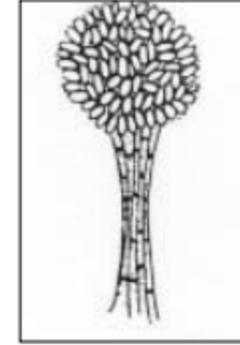
Isolados



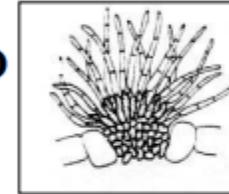
Agrupados

Desprotegidos

Sinema (Corêmio)
(ereto e alongado)

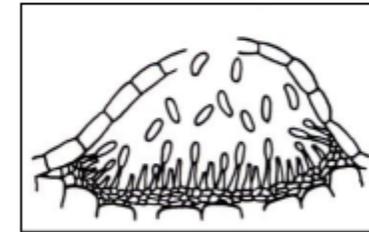


Esporodóquio
(achatado, "almofada")

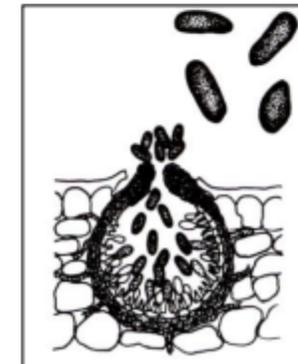


Protegidos
(corpos de frutificação)
(conidiomas)

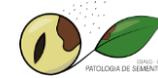
Acérvulo
(achatado)



Picnídio
(globoso)



Complexo *Diaporthe* / *Phomopsis*



O gênero *Diaporthe* contém aproximadamente 1.300 espécies registradas pelo Mycobank, enquanto 1.050 espécies registradas foram listadas no Mycobank para *Phomopsis*, que é considerada a fase assexuada de *Diaporthe*. Como *Diaporthe* foi nomeada antes de *Phomopsis*, as espécies devem ser tratadas como *Diaporthe*.



Queima (ou seca) da haste e da vagem - *Diaporthe sojae* (syn. *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*)



Imagens: Agrolink



Cancro da haste – *Diaporthe aspalathi* (syn. *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) e *Diaporthe caulivora* (syn. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*)



Imagens: Agrolink



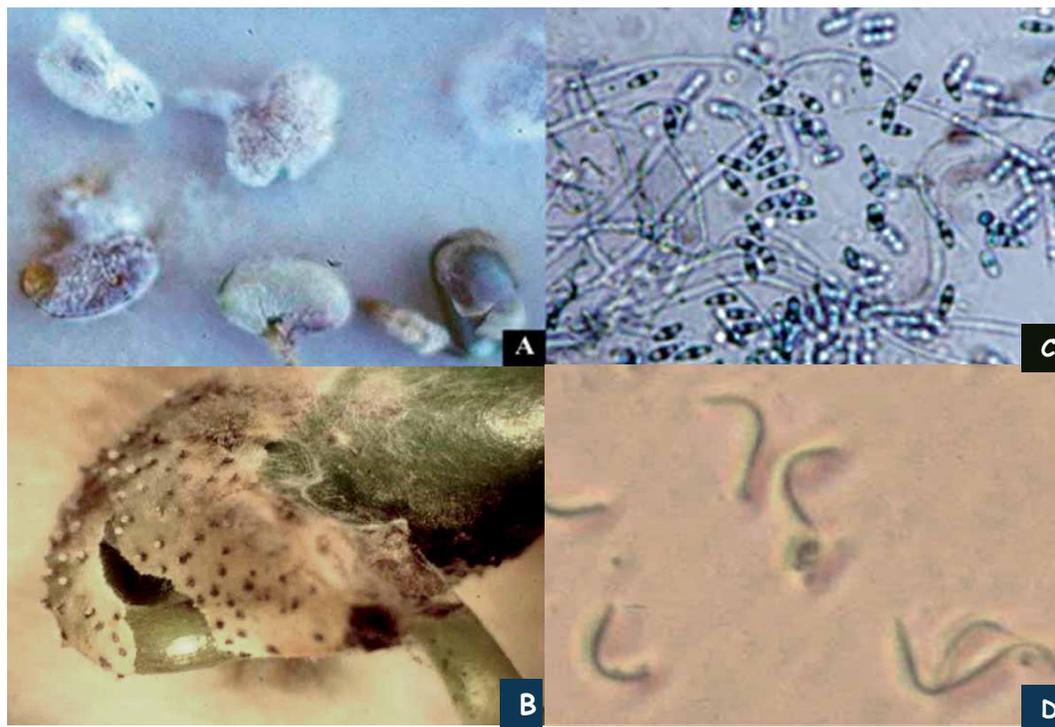
Podridão das sementes – *Phomopsis longicolla* (syn. *Diaporthe longicolla*)



John Rupe, AR, EUA



Riccioni & Petrović



Phomopsis sp. em sementes (A, B) e conídios α (C) e β (D) em lâminas microscópicas

Fotos: J. C. Machado



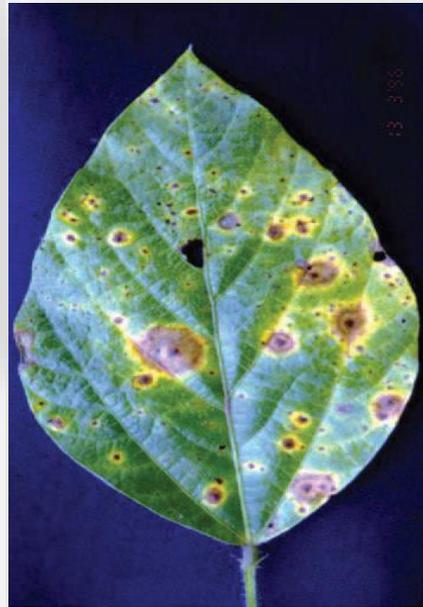
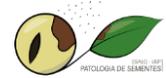
Rodrigo Pedrozo
e Christopher R.
Little

Micélio branco com
picnídios, exudação dos conídios
sobre os picnídios (cirros)

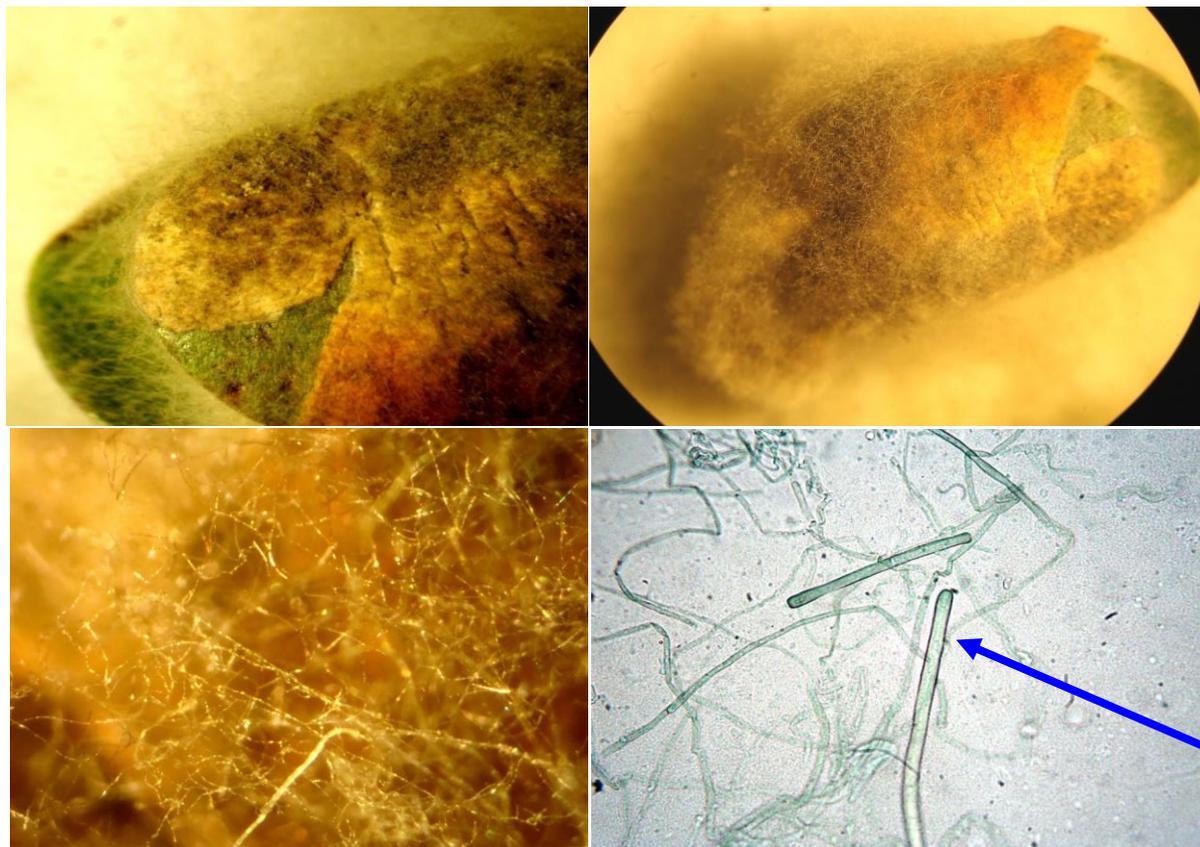
Mancha Alvo - *Corynespora cassiicola*



MC Meyer - EMBRAPA



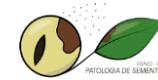
J. T. Yorinori; R. M. Soares
(2005)



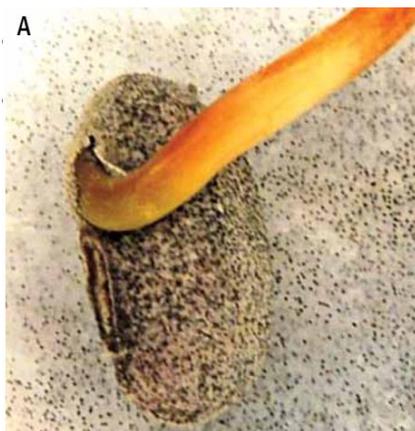
Corynespora cassiicola em
sementes de soja

Esporos típicos,
retos, tubulares,
hialinos

Podridão de carvão / Podridão cinza da raiz da soja – *Macrophomina phaseolina*



Crop Protection Network,
2015



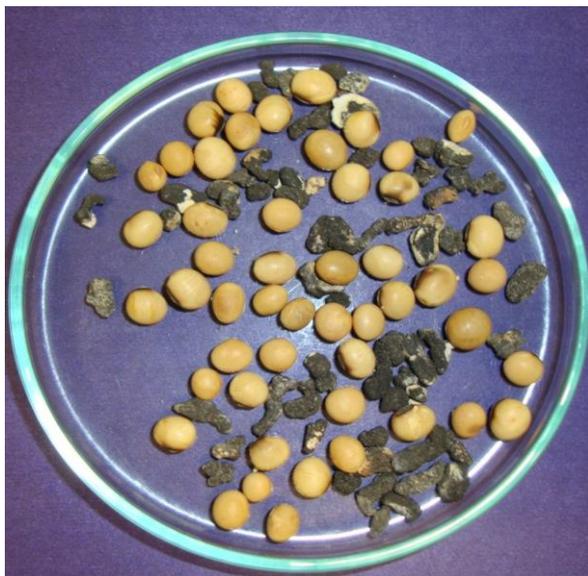
conídios são
elipsoides a
ovoides

Microescleródios espalhados sobre o papel de filtro (A);
semente infectada com *Macrophomina phaseolina* (B);
Conídios (esporos) de *M. phaseolina* (C)

Mofa branco (*Sclerotinia sclerotiorum*)



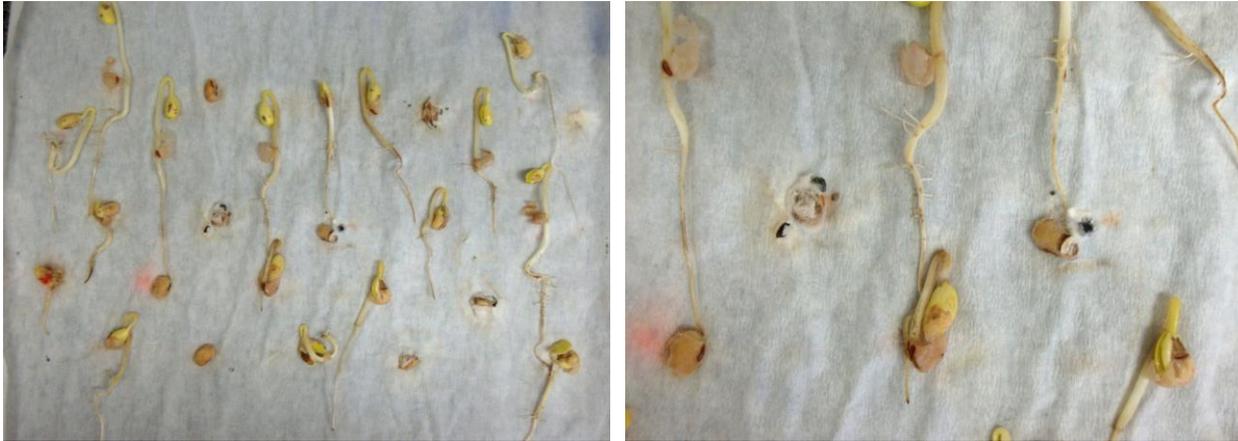
C. Godoy/ D.
Gassen



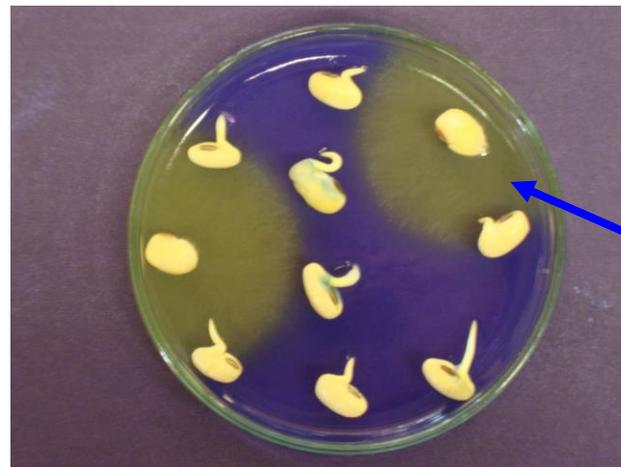
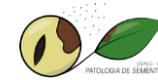
Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*
misturados às sementes



Sclerotinia sclerotiorum detectado pelo método do Papel
de Filtro modificado (micélio branco e formação de
escleródios)



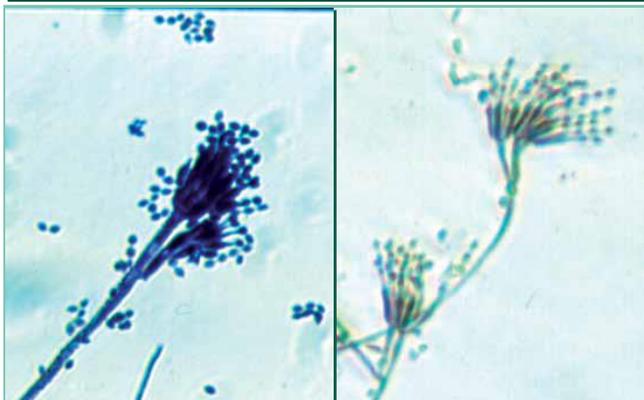
Sclerotinia sclerotiorum detectado pelo método do rolo de germinação



formação de halo amarelo

Sclerotinia sclerotiorum detectado pelo método do meio semi-seletivo ágar-azul de bromofenol

Fungos causadores de podridão de sementes e grãos



Penicillium sp.

Aspergillus flavus (B), *Aspergillus ochraceus* (C)

Conidióforo - fiálides e cadeia de conídios

Conidióforo – vesícula - fiálides e cadeia de conídios

micélio cotonoso branco
e róseo



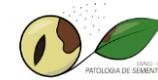
Formações típicas “agulhinhas”
no micélio que são os
agrupamentos dos
macroesporos



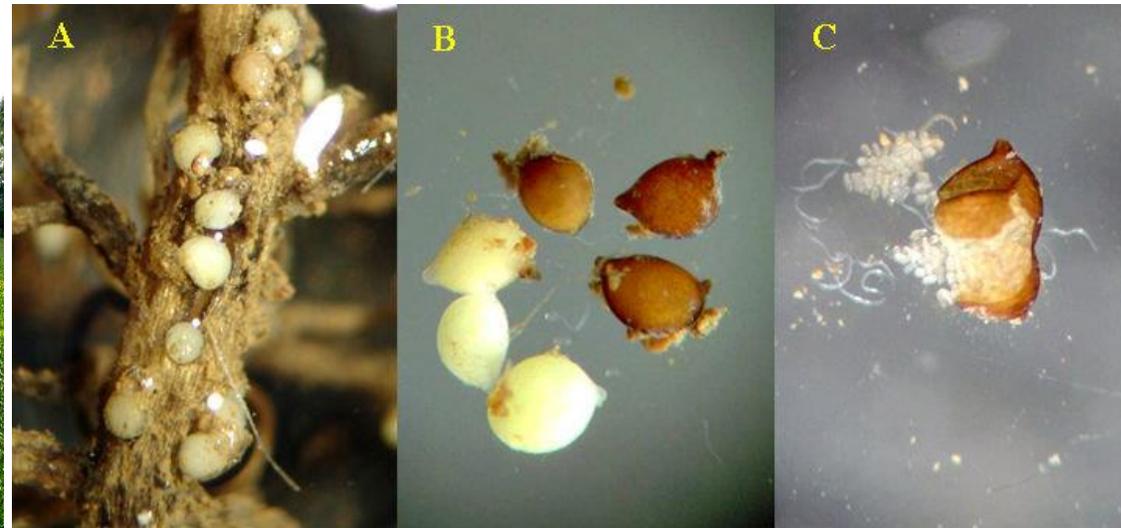
macroesporos

Fusarium spp. em sementes (A, B) e conídios em lâminas
microscópicas (C)

Nematoide do Cisto - *Heterodera glycines*

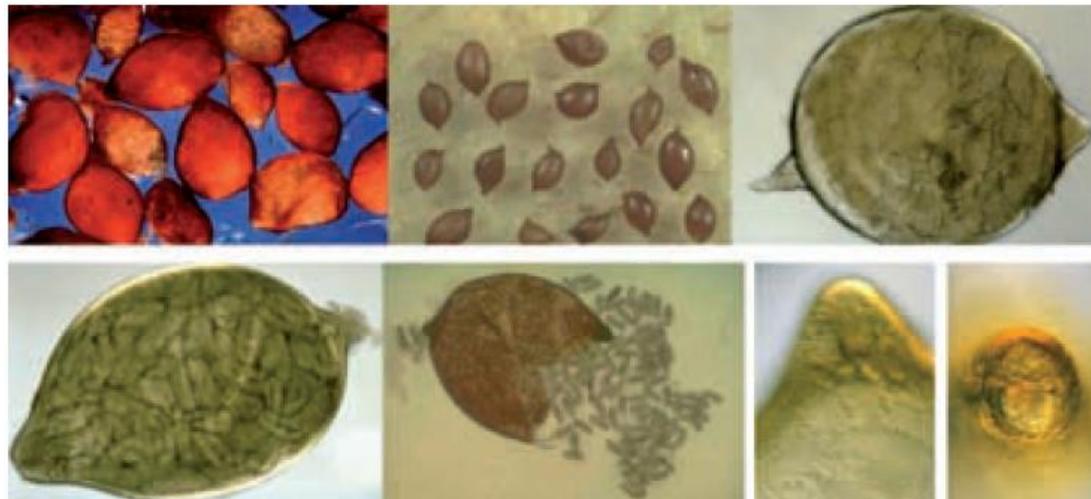


Agrolink



Fêmeas em raiz (A); fêmeas maduras e cistos (B) e cisto rompido (com ovos e J2) (C) obtido de solo cultivado com soja

Fêmeas de *Heterodera glycines*
apresentam de 0,4 a 0,8mm de
comprimento, forma de limão

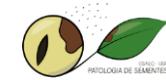


Heterodera glycines

Métodos:

- Inspeção da sementes secas;
- Peneiramento com ou sem flutuação em centrífuga.

Análise visual pelo microscópio estereoscópico



Apodrecimento de grãos e vagens / Quebramento de hastes (Anomalia da soja)

- Relatos de perdas desde a safra 19/20
- Início - MT BR-163 e expandindo para outros estados;
- Prejuízo bilionário \$\$ nas últimas três safras;
- Uma propriedade no MT – perda de 40% na safra de 21/22;
- Nos isolamentos, de grãos e vagens com e sem sintomas, foram encontrados gêneros fúngicos já descritos na cultura da soja (complexo de fungos);

- ✓ *Colletotrichum* sp.;
- ✓ Complexo *Diaporthe/Phomopsis* sp. (+ comum -*Diaporthe ueckerae*);
- ✓ *Fusarium* sp.
- ✓ *Cercospora* sp.;
- ✓ *Phoma* sp.;
- ✓ *Corynespora* sp.
- ✓ *Macrophomina* sp.

- Solução ainda depende de estudos.



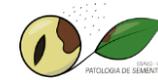
Blog – Canal Rural



Gigante 163

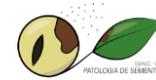


Fundação MT

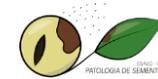


SANIDADE DE SEMENTES DE FEIJÃO

Principais patógenos transportados pelas sementes de feijão



Patógenos	Doença
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antracnose
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Murcha de Fusário
<i>Fusarium solani</i>	Podridão radicular seca
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Podridão Cinzenta da Haste
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Mofo Branco
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Murcha de Curtobacterium
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Crestamento Bacteriano



MÉTODOS DE DETECÇÃO

1. EXAME DA SEMENTE NÃO INCUBADA

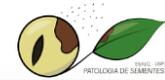
- Método da inspeção visual

2. EXAME DA SEMENTE APÓS INCUBAÇÃO

- Método do Papel de Filtro Padrão
- Método do meio semi seletivo ágar-azul de bromofenol
- Método do Rolo de Germinação

3. Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo (bactérias)

Antracnose - *Colletotrichum lindemuthianum*



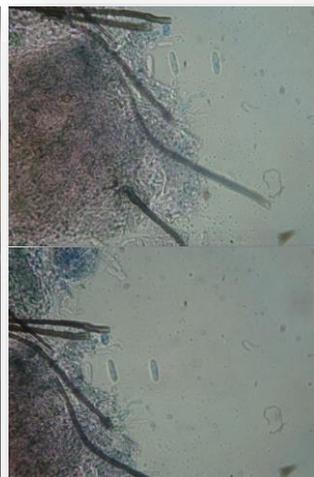


Colletotrichum lindemuthianum em feijão: sintomas nos cotilédones (método rolo de germinação)



Colletotrichum lindemuthianum em sementes de feijão – Método do Papel de Filtro

Foto - M.H.D. Moraes



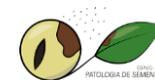
Conidióforos e conídios de *C. lindemuthianum* (Microscópio óptico)



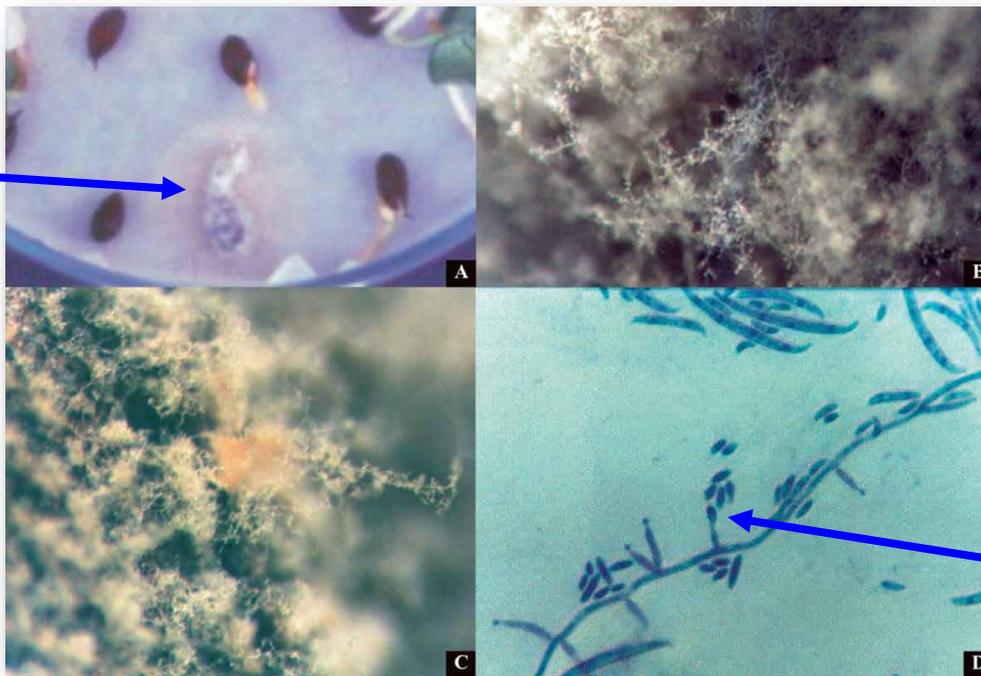
Colletotrichum lindemuthianum: na superfície de sementes de feijão (A) e **acérvulo** e conídios em preparação microscópica (B)

J.C.Machado

Murcha de Fusário - *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*



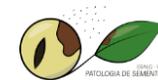
Micélio aéreo com
pigmentação rosa, roxo a
azul



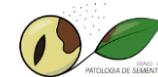
Microconídios formadas no
extremo de conidióforos curtos
produzidos ao longo da hifa

Fusarium oxysporum em sementes de algodão
(A,B,C); macro e microconídios em lâminas (D)

Podridão radicular seca - *Fusarium solani* f. sp. phaseoli



Sintomas da podridão radicular seca do feijoeiro comum.



Micélio aéreo
branco a creme
presença de
minúsculas gotas
aquosas



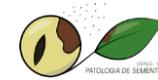
Microconídios hialinos,
ovais, elipsóides ou
reiniformes

Macroconídios são hialinos, produzidos em
grande quantidade, apresentando 3 a 4
septos, e uma célula apical arredondada
curta ou com a célula basal com leve
formação tipo engrenagem.

Fusarium solani f. sp. phaseoli em
sementes de feijão e em preparação
microscópica

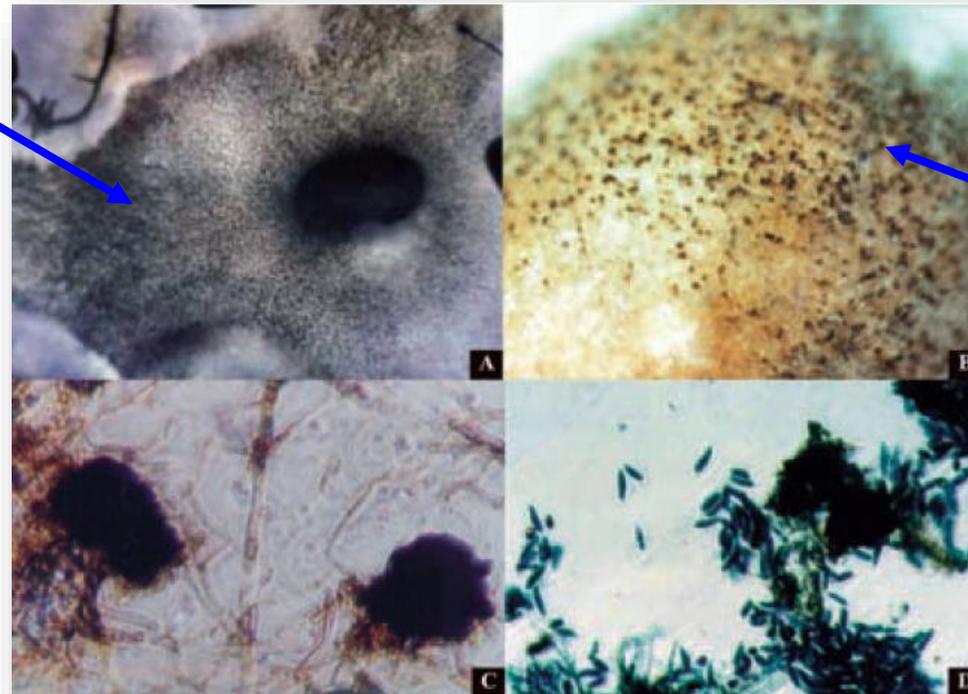
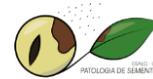
Mathur e Kongsdal , 2003

Podridão Cinzenta da Haste - *Macrophomina phaseolina*



Necrose da haste e formação de picnídios de *Macrophomina phaseolina* em feijoeiro, como resultado da podridão cinzenta da haste.

Micélio de cor cinza
claro a cinza escuro



microescleródios

Macrophomina phaseolina: crescimento em substrato (A), em sementes de feijão (B), **microescleródios** (C) e conídios (D) em preparações microscópicas



Fig. 7. Semente de feijão-caupi apresentando sinais de *Macrophomina phaseolina* em teste de papel de filtro.

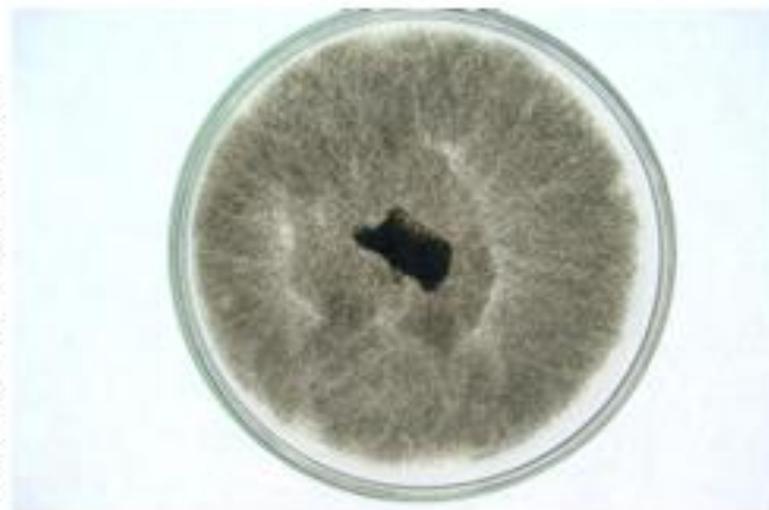


Fig. 6: Colônia de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultura BDA com formação de microescleródios.

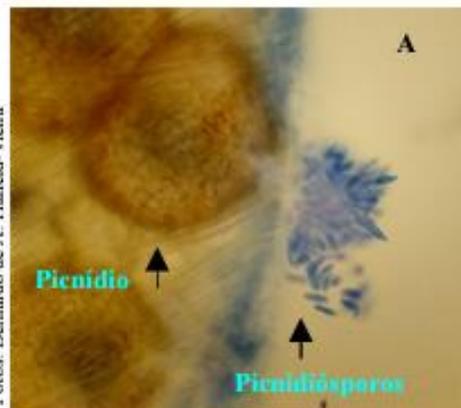
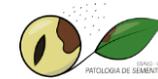


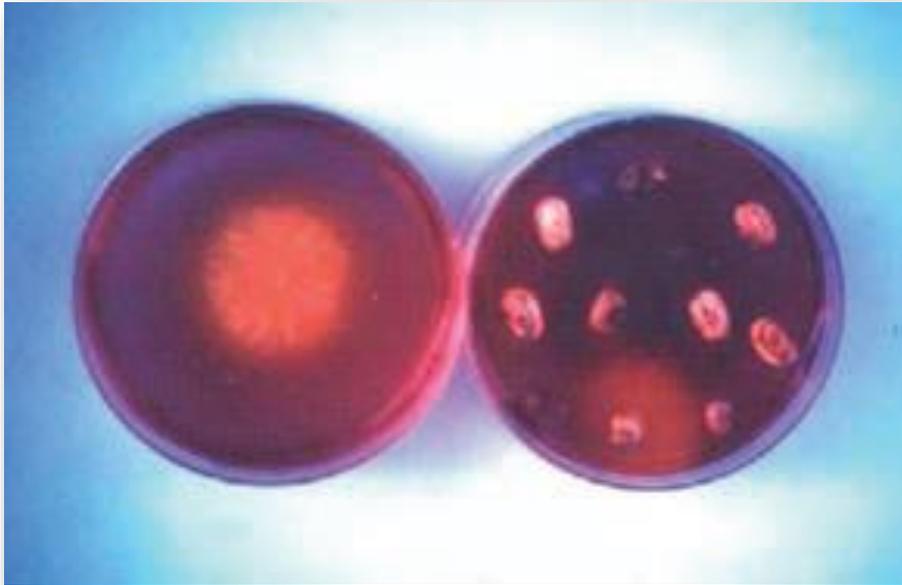
Fig. 5: A. Observação em microscópio óptico de picnídio e picnidiósporos de *Macrophomina phaseolina*. B. Detalhe dos picnidiósporos de *M. phaseolina*.

Mofa Branco - *Sclerotinia sclerotium*



Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* com a formação de apotécios, e sintomas do mofo branco em feijoeiro comum.

(EMBRAPA)

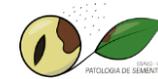


Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio –ágar azul de bromefenol.



Presença de outros fungos contaminantes mudando a coloração do meio ágar azul de bromofenol em sementes de feijão

Crestamento Bacteriano - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*



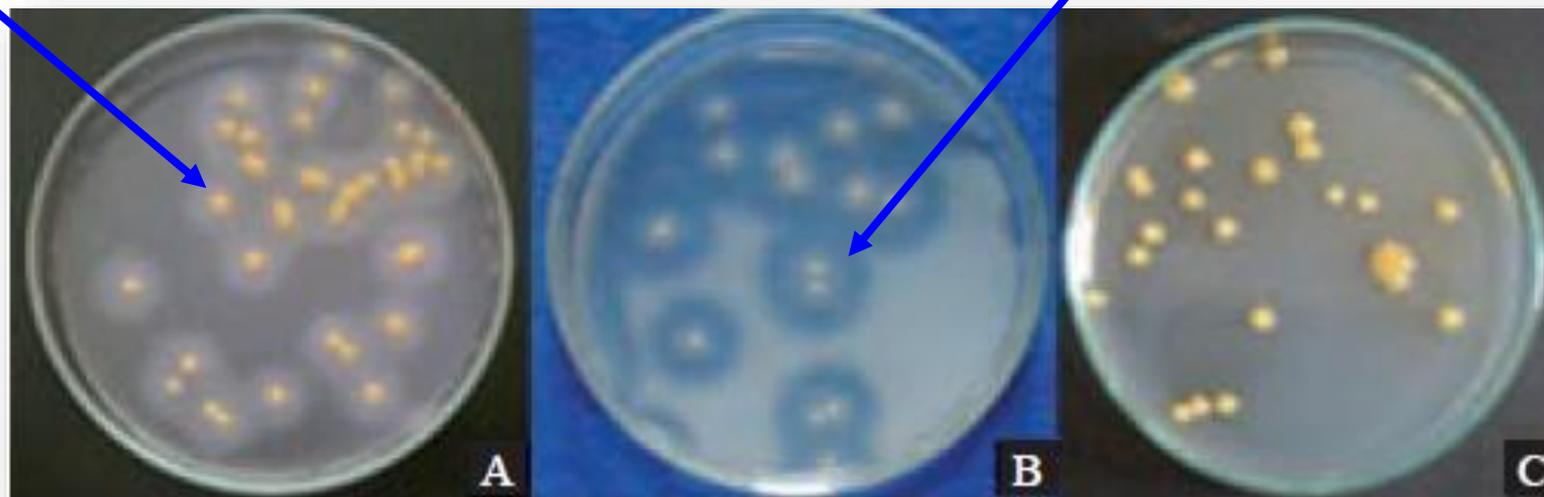
Sintomas do crestamento bacteriano comum nas folhas



Sintomas do crestamento bacteriano comum nas vagens

As colônias de Xap no meio XCP1 são amarelas, mucóides, lisas, convexas e circundadas por zonas de hidrólise de amido

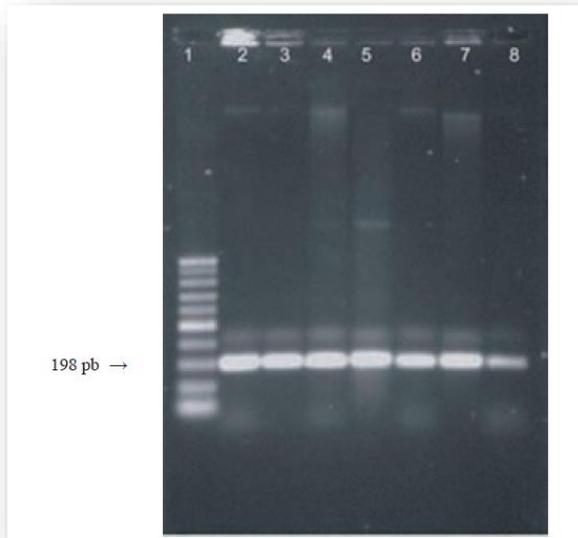
Em meio MT, as colônias são amarelas, circulares, não fluorescentes e circundadas por 2 zonas de hidrólise: uma maior, clara, correspondente à hidrólise de caseína e uma menor, leitosa (láctea), à lipólise de Tween 80



Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* formadas a partir de extratos de sementes de feijão naturalmente infectadas, 6 dias após o plaqueamento. A e B) meios de cultura semisseletivos XCP1 e MT, respectivamente; C) meio de cultura não seletivo 523.

Murcha de Curtobacterium - *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*





primers específicos para Cff (Guimarães et al., 2001):
 CF4 forward 5'-CACAGCCACCTACATGC 3'
 CF5 reverse 5'- ATCGGGAGTCCGAG 3'

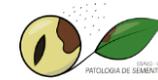
Colônias de *Curtobacterium flaccumfaciens*
 pv. *flaccumfaciens* em meio CNS

(Manual - MAPA)

sementes de feijoeiro (B)
 contaminadas por Cff, em meio NA
 (à esquerda) e CNS - modificado (à
 direita), na diluição de 10⁻³

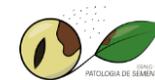


Behlau (2006)



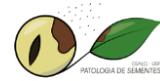
SANIDADE DE SEMENTES DE ALGODÃO

Principais patógenos transportados pelas sementes de algodão



Patógenos	Doença
<i>Colletotrichum gossypii</i>	Antracnose
<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ramulose
<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha de Fusarium
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Podridão de maçãs
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Mofo Branco
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	Mancha angular

METODOLOGIA UTILIZADA PARA SEMENTES DE ALGODÃO



1. Papel de filtro com assepsia

*Assepsia das sementes com hipoclorito de sódio a 1% por 5 min.

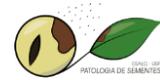
*Plaqueamento – 10 sementes / placa

*Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, 20±2°C

*Tempo = 7 dias (maioria dos fungos) e 14 dias (*Lasiodiplodia theobromae*)

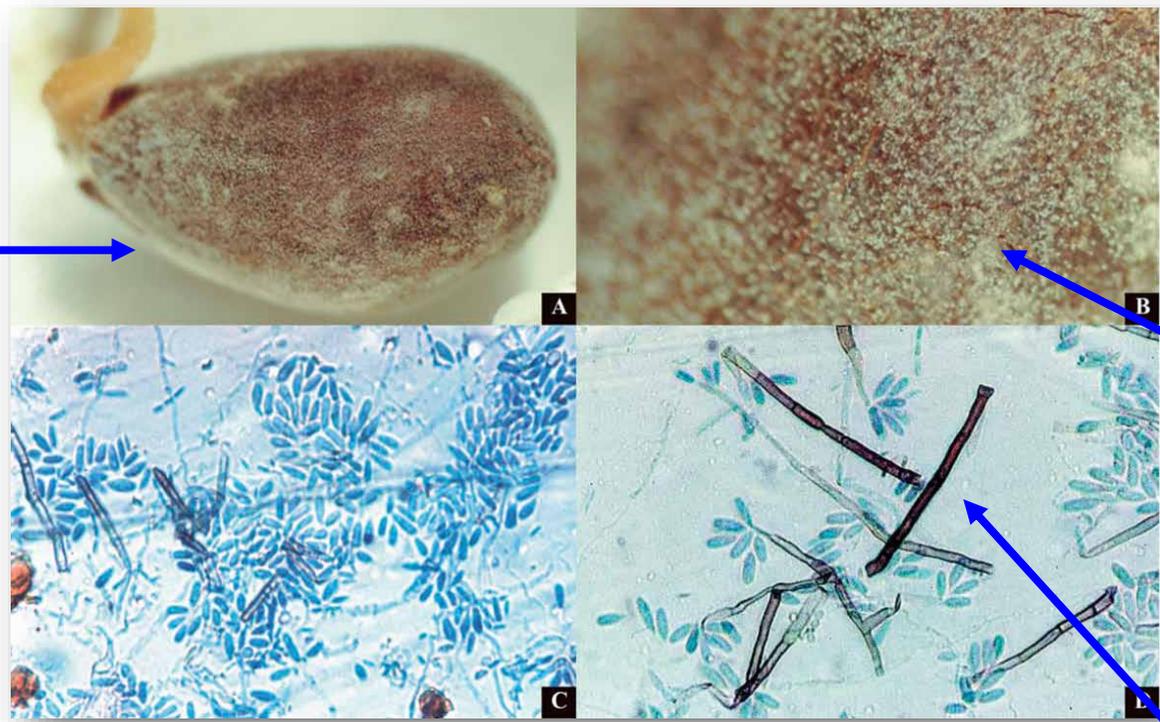
2. Plaqueamento de sementes em meio semi-seletivo (Bactérias)

Antracnose - *Colletotrichum gossypii*





Micélio escasso,
difícilmente
visualizado



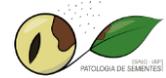
sementes podem exibir
uma aparência rosa claro
como resultado da
abundante esporulação
do fungo

Colletotrichum gossypii na semente (A,B); conídios/conidióforos em lâminas

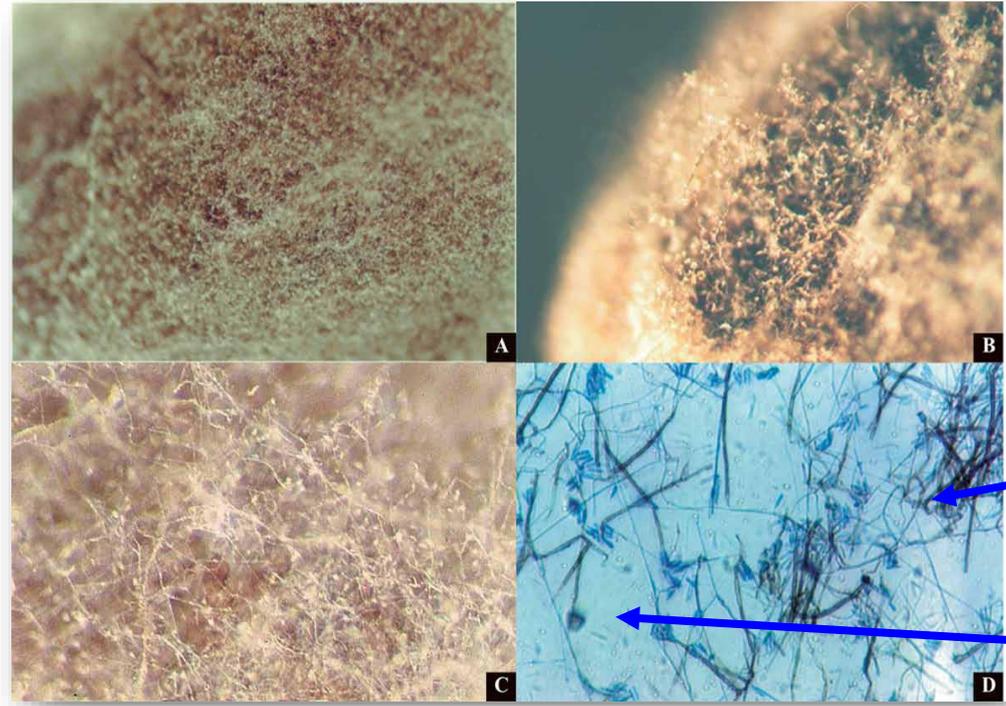
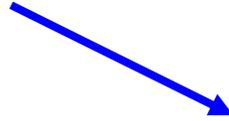
Setas são marrons, escuras com
variações em tamanho e podendo
apresentar conídios em seus
ápices

Ramulose - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*





Micélio aéreo, cor cinza claro, pouco denso



formação de setas férteis
escuras produzidas ao longo
das hifas

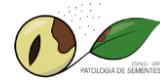


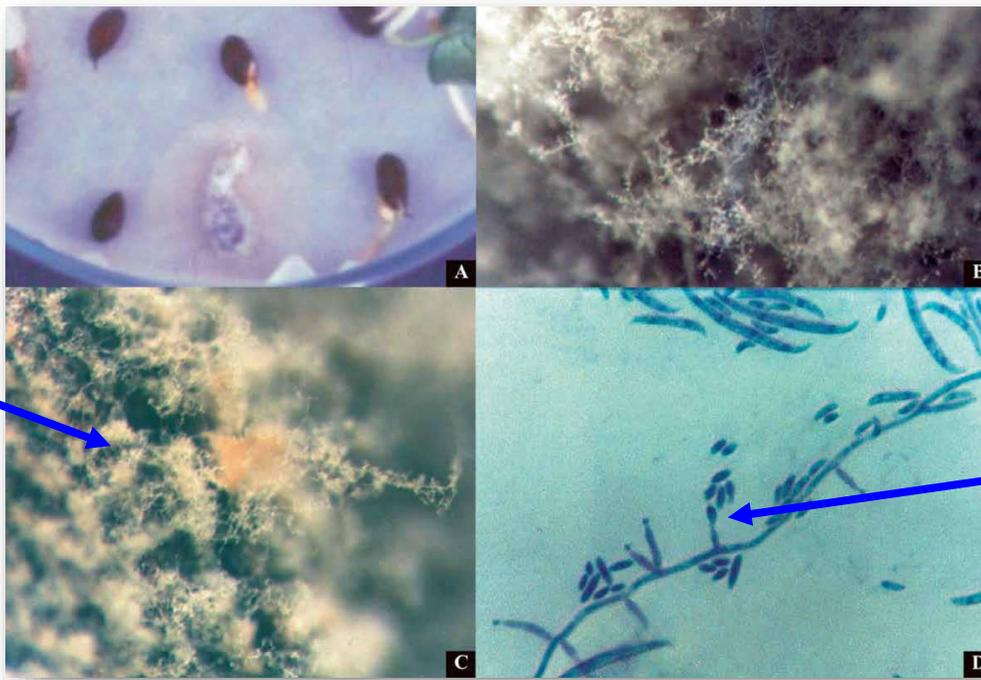
Conídios
hialinos, geralmente
cilíndricos



C. gossypii var. *cephalosporioides* em sementes (A,B,C); conídios em lâminas (D)]

Murcha de Fusário – *Fusarium axysporum*





Micélio aéreo com pigmentação rosa, roxo a azul

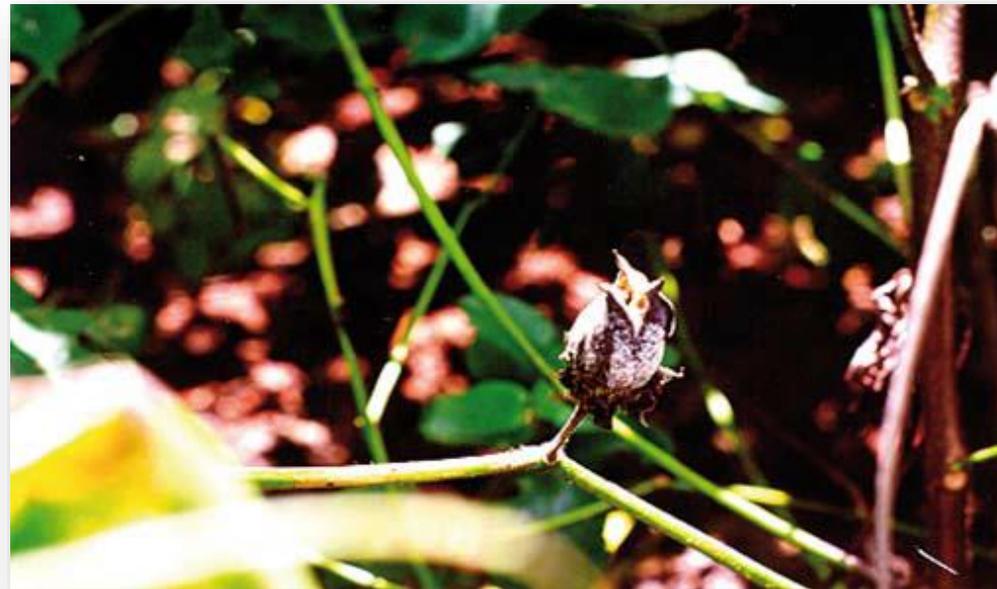


Microconídios formadas no extremo de conidióforos curtos produzidos ao longo da hifa



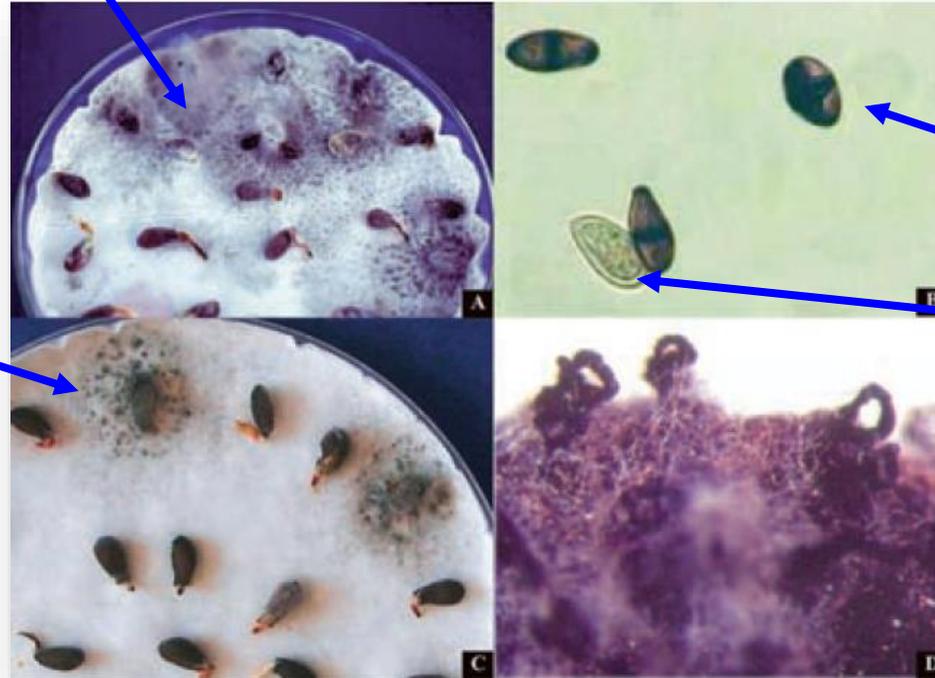
Fusarium oxysporum em sementes (A,B,C); macro e microconídios em lâminas (D)

Podridão de maçãs - *Lasiodiplodia theobromae*



Micélio aéreo, denso e acinzentado na superfície da semente e substrato

Produção de picnídios dispersos ou em agregados escuros



Conídios maduros são bicelulares, cor castanho-amarelada

Conídios jovens são unicelulares, hialinos, com parede espessa

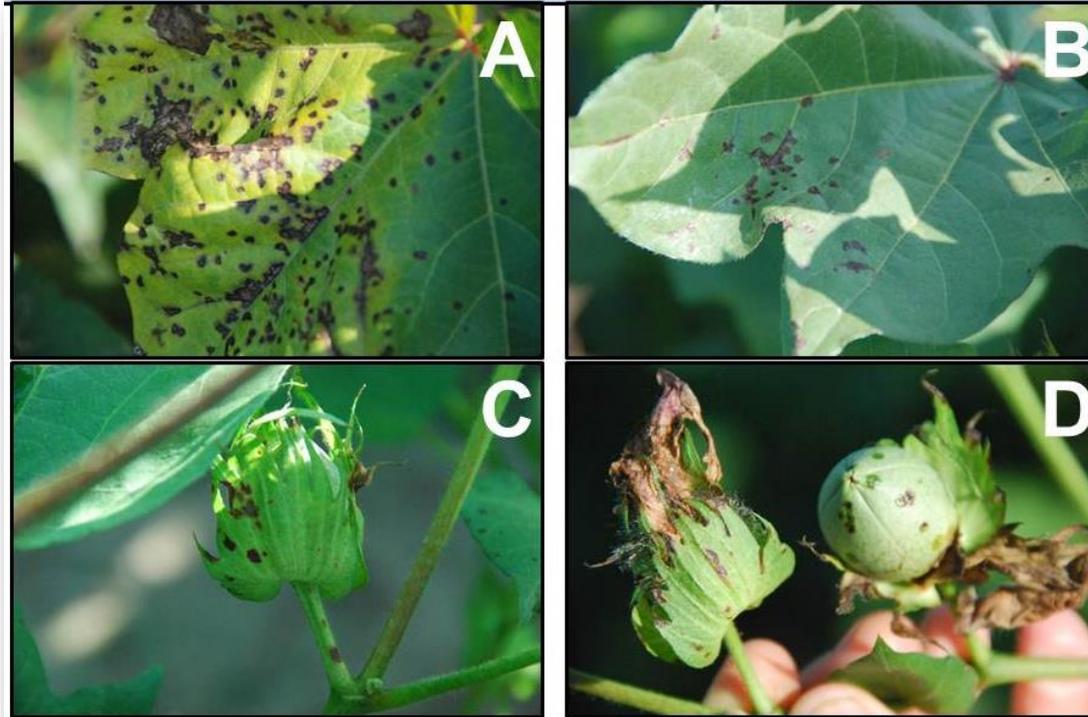
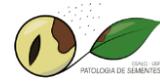
Lasiodiplodia theobromae em sementes de algodão e em papel de filtro (A e C), conídios em preparação microscópica (B) e exsudação de conídios produzidos em picnídios imersos nas superfícies das sementes (D)

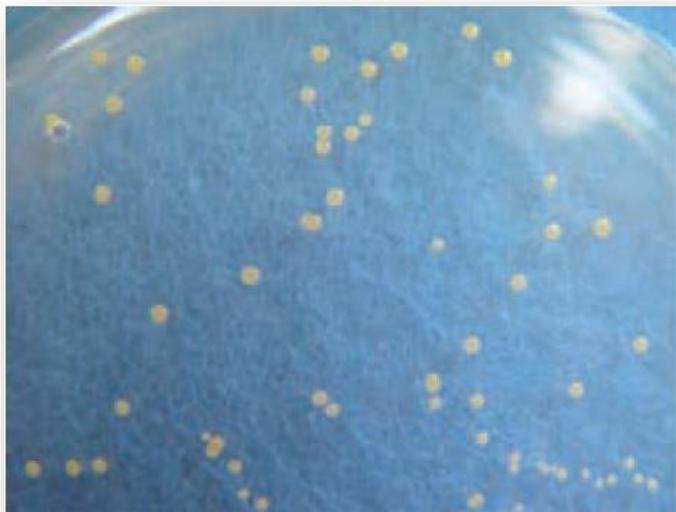
Mofo Branco - *Sclerotinia sclerotium*



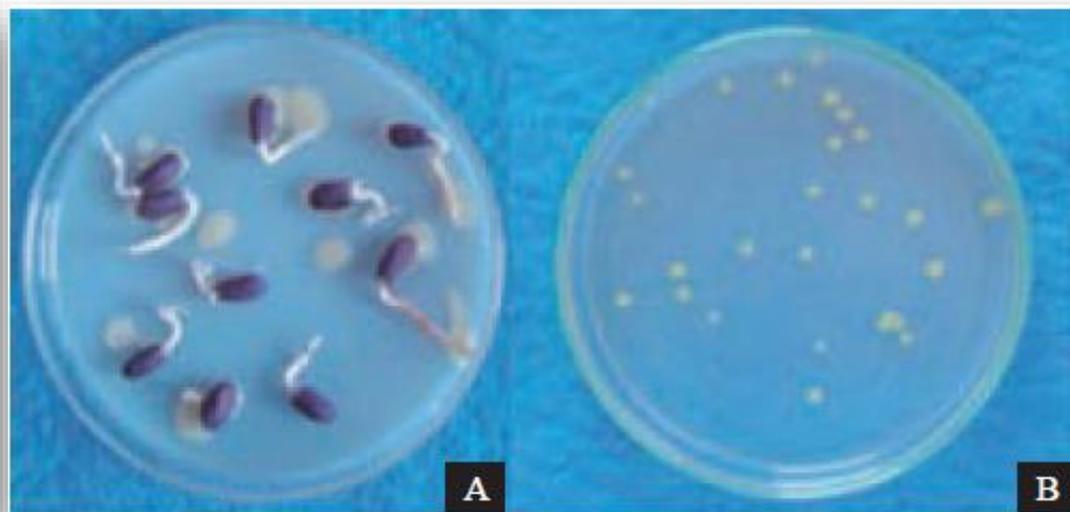
Alfredo Riciere Dias, Fundação Chapadão; Hugo Manoel de Souza, Gustavo de Faria Theodoro, UFMS

Mancha angular - *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

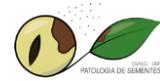




Colônias típicas de
Xanthomonas axonopodis pv.
malvacearum em meio 523

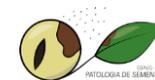


Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* em meio
PSA modificado: plaqueamento de sementes (A) e
colônias (controle positivo)(B)



SANIDADE DE SEMENTES DE ARROZ

Principais patógenos transportados pelas sementes de arroz



Patógeno	Doença
<i>Bipolaris oryzae</i> (syn <i>Drechslera oryzae</i>)	Helmintosporiose / Mancha Parda
<i>Gerlachia oryzae</i>	Escaldadura
<i>Phoma sorghina</i>	Queima das Glumelas
<i>Pyricularia grisea</i>	Brusone

METODOLOGIA UTILIZADA PARA SEMENTES DE ARROZ



PAPEL DE FILTRO

*Plaqueamento – 25 sementes / placa

*Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, 20±2°C

*Tempo = 7 dias

Helmintosporiose / Mancha Parda - *Bipolaris oryzae* (syn *Drechslera oryzae*)



Valácia L. S. Lobo -
EMBRAPA

crescimento típico
micélio - não denso



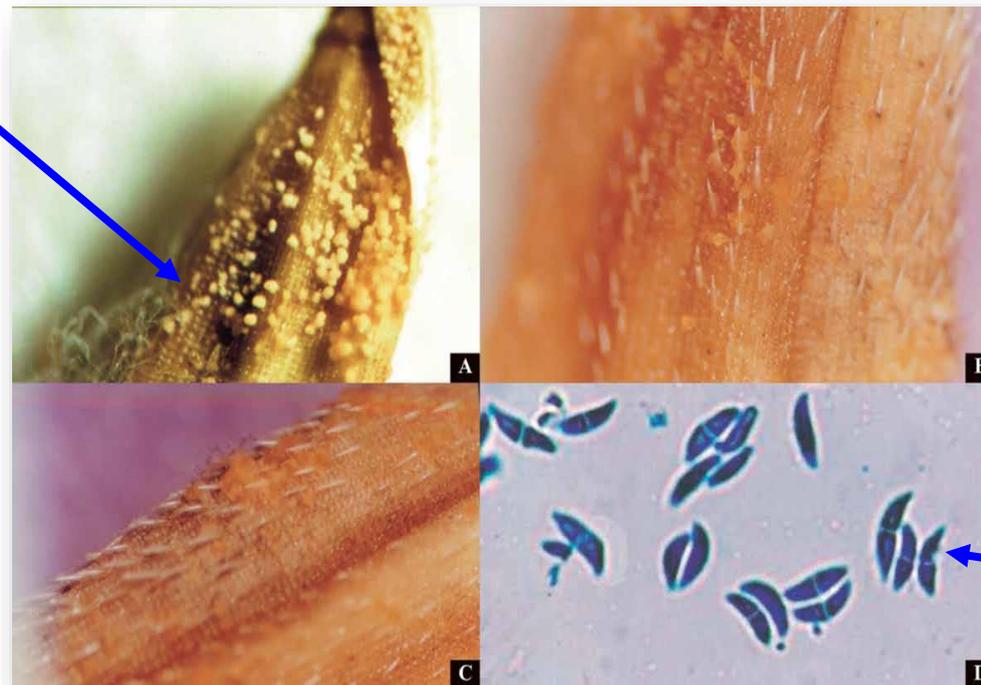
conídios levemente
curvos, hialino, longos

Bipolaris oryzae (syn *Drechslera oryzae*) em sementes (A); conídios em lâminas microscópicas(B)

Escaldadura - *Gerlachia oryzae*



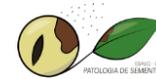
estruturas isoladas de formato oval a circular, de coloração laranja brilhante



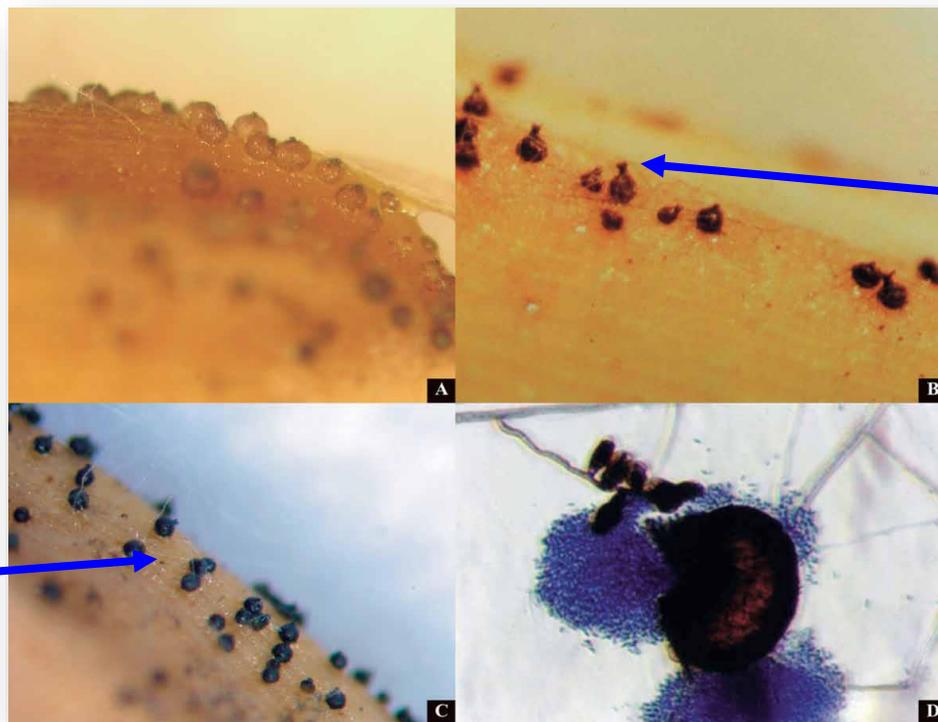
Conídios asseptados quando jovens e uni-septados quando maduros

Gerlachia oryzae em sementes (A,B,C) e conídios em lâminas microscópicas (D)

Queima das Glumelas - *Phoma* sp.



Valacia Lemes Silva-Lobo -
EMBRAPA



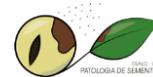
ostíolo bem evidente

Picnídio bem escuro e bem externo à semente

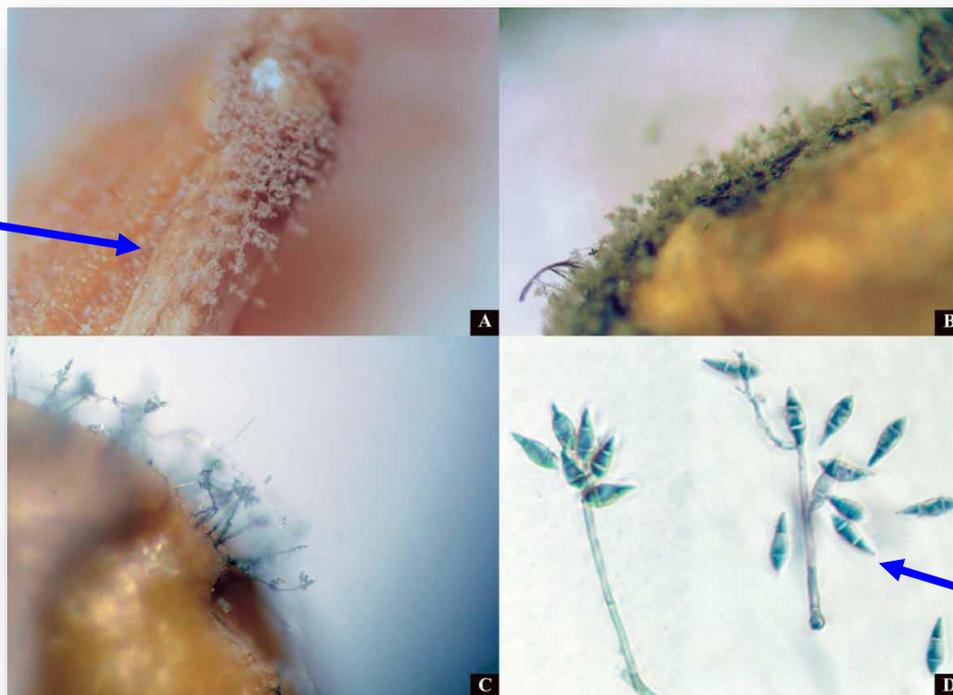
Phoma sorghina em sementes (A,B,C) e conídios em lâminas microscópicas (D)

Brusone - *Pyricularia grisea*



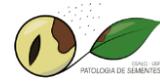


Colônia clara, cinzenta
brilhante



Conídios piriformes
típicos

Pyricularia grisea (oryzae) em sementes (A,B,C) e
conídios em lâminas microscópicas (D)



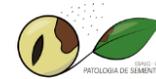
SANIDADE DE SEMENTES DE TRIGO



Principais patógenos transportados pelas sementes de trigo

Patógenos	Doença
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Mancha Marrom
<i>Drechslera tritici-repentis</i>	Mancha amarela
<i>Fusarium graminearum</i>	Giberela ou Fusariose da Espiga do trigo
<i>Pyricularia grisea</i>	Brusone
<i>Stagonospora nodorum</i>	Mancha da gluma

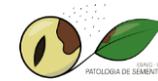
METODOLOGIA UTILIZADA PARA SEMENTES DE TRIGO



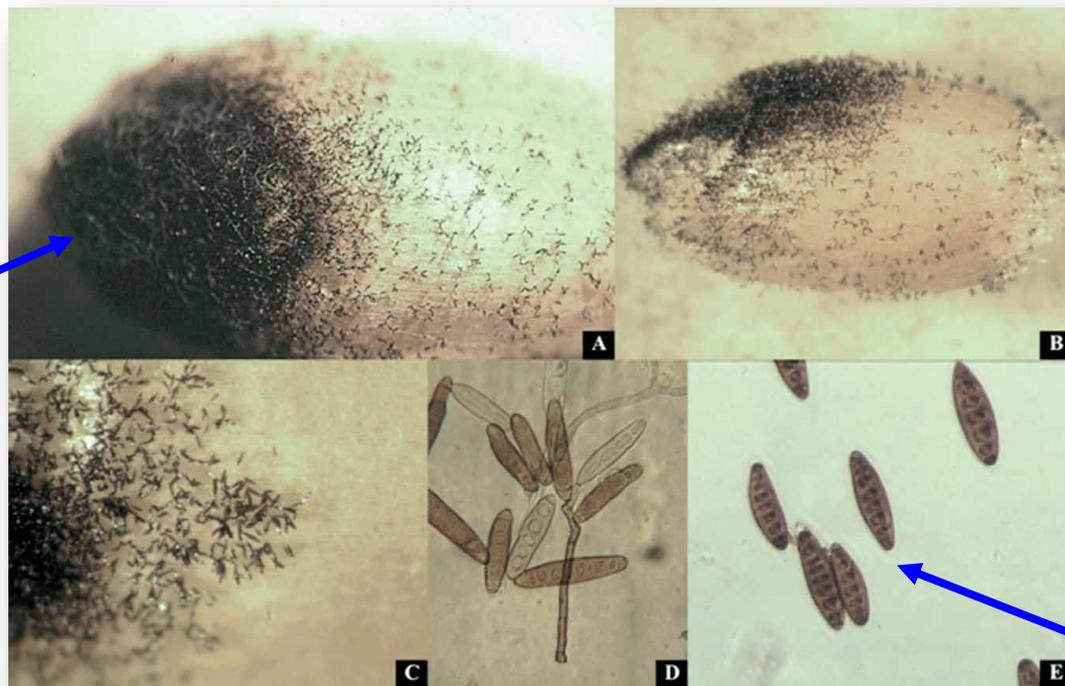
PAPEL DE FILTRO COM CONGELAMENTO

- *Plaqueamento – 25 sementes / placa
- *Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24h
- *Congelamento: freezer -20°C , por 24h
- *Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$
- *Tempo = 7 dias de incubação

Mancha Marrom - *Bipolaris sorokiniana*



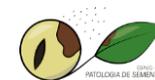
Colônia fica mais escura, diferente do arroz



esporos menores, mais escuros e mais retinhos

Bipolaris sorokiniana em sementes (A, B, C) e conídios (D, E) em lâminas microscópicas

Mancha Amarela - *Drechslera tritici-repentis*



Flávio Santana -
EMBRAPA



Micélio aéreo
cinza claro em
abundancia



conidióforos levemente
escuros, suportando
conídios individuais



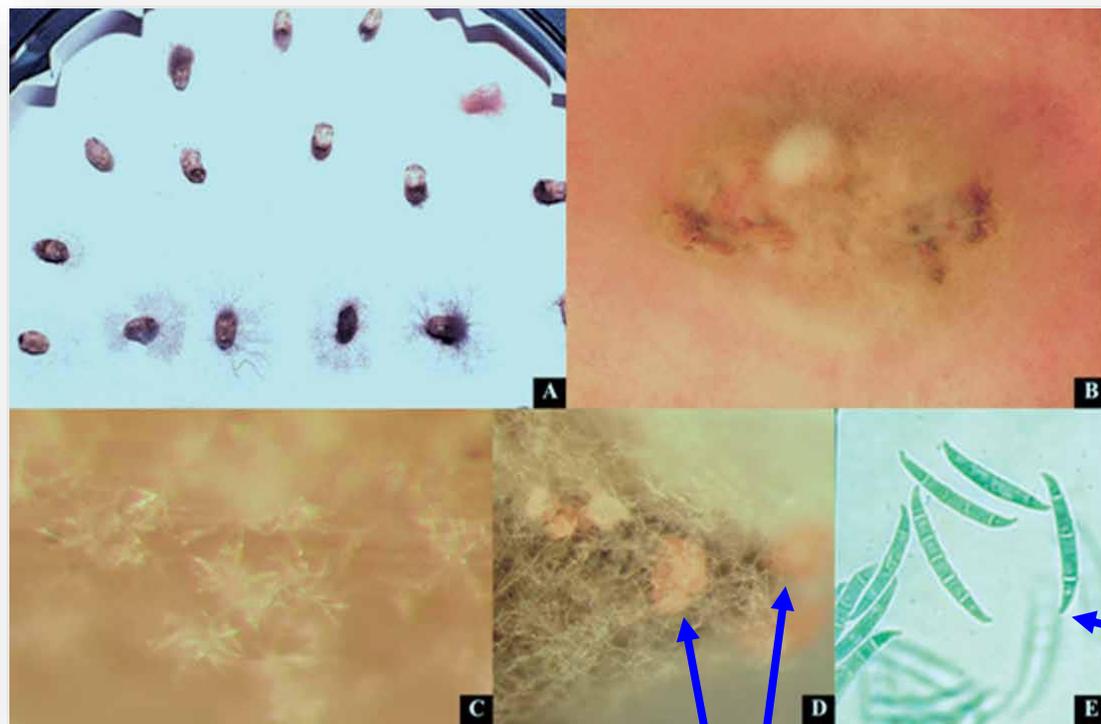
Conídios individuais
com 1-9 septos são
cilíndricos e possuem
ápice arredondado



Drechslera tritici-repentis em semente de
trigo (A e B) e conídios em preparação
microscópica (C e D).

Giberela ou Fusariose da Espiga do trigo - *Fusarium graminearum*





Fusarium graminearum em sementes (A, B, C, D) e macroconídios (E) em lâminas microscópicas

Macroconídios, cilíndricos, 3-7 septos e assimetricamente curvos

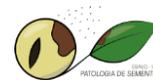
Aglomerados de esporos típicos (grumos)

J. C. Machado

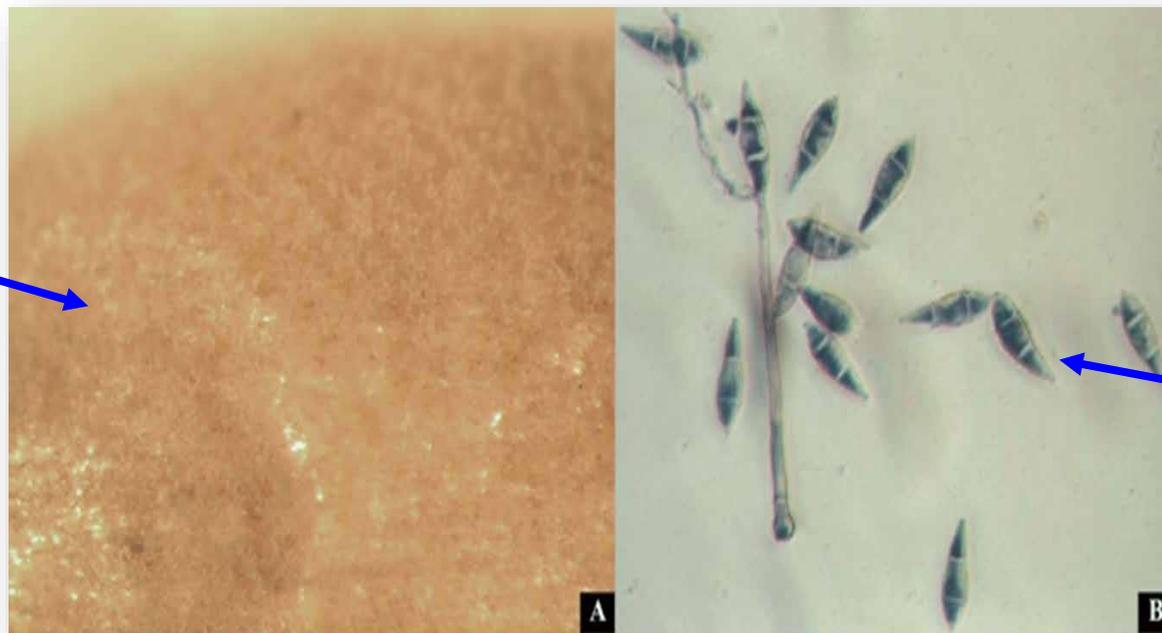
Brusone - *Pyricularia grisea*



Flávio Santana - EMBRAPA



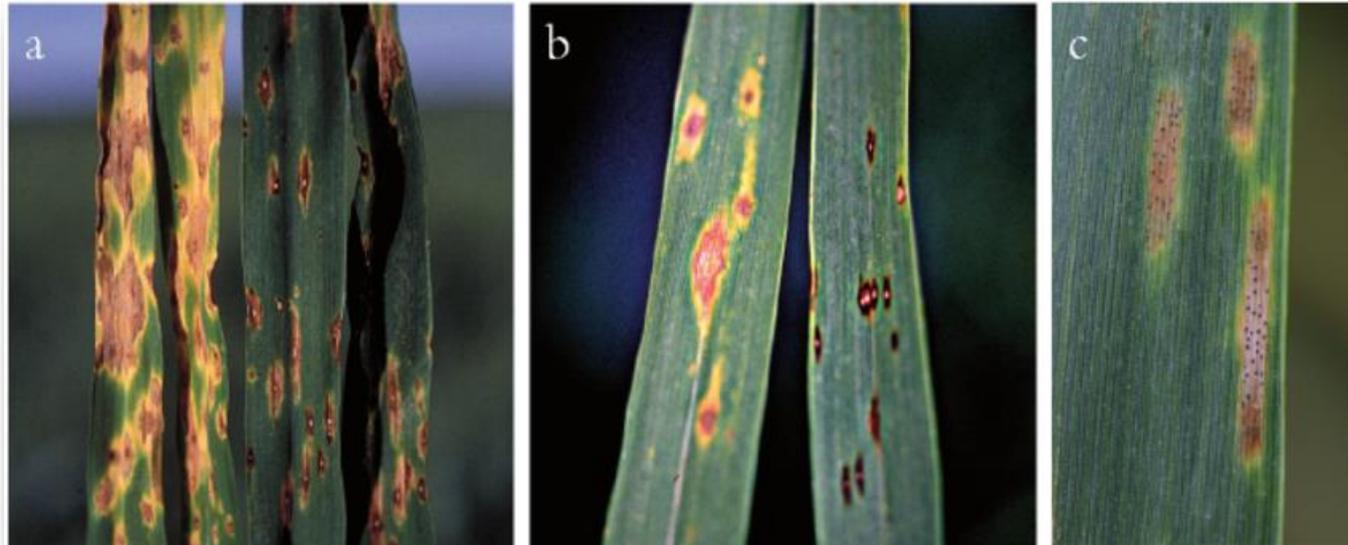
Micélio aéreo pouco denso
de cor cinza claro



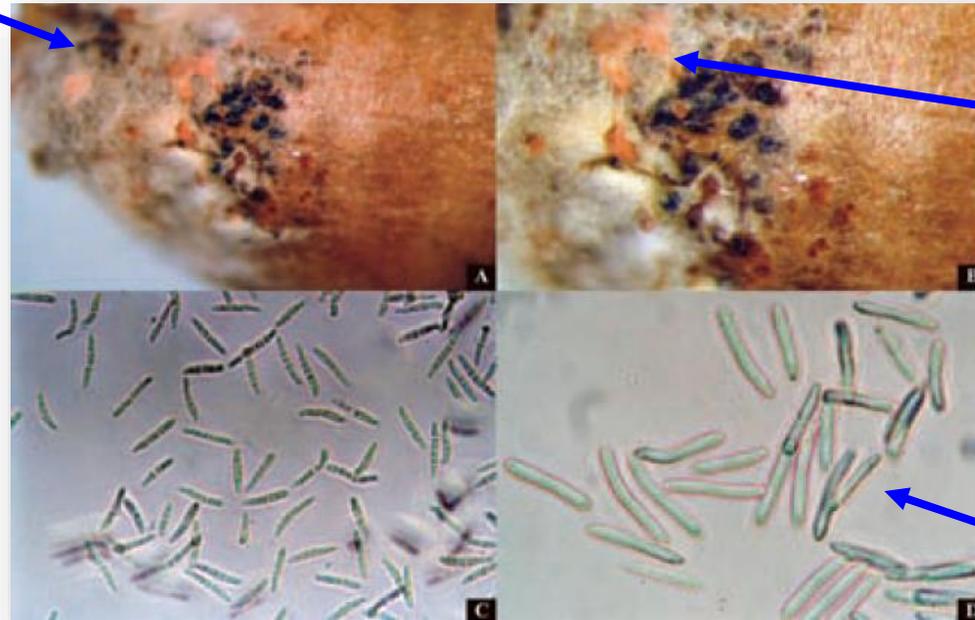
Conídios com 2
septos, piriformes

Pyricularia grisea em sementes (A) e conídios (B) em lâminas
microscópicas

Mancha da gluma - *Stagonospora nodorum*



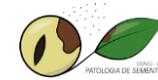
Micélio denso e branco acinzentado, com formação de picnídios negros imersos na superfície das sementes incubadas



exsudação cremosa de cor rosa claro saindo do ostíolo dos picnídios

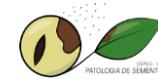
Conídios hialinos, 0-3 septos, alongados, extremidades arredondadas e muitos deles apresentando uma leve curvatura

Picnídios de *Stagonospora nodorum* em sementes de trigo (A e B) e conídios em preparações microscópicas (C e D).



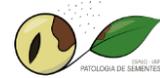
SANIDADE DE SEMENTES DE MILHO

Principais patógenos transportados pelas sementes de milho



Patógenos	Doenças
<i>Acremonium strictum</i>	Murcha
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Antracnose
<i>Drechslera turcica</i>	Helminthosporiose ou Mancha foliar
<i>Fusarium verticillioides</i>	Podridão Colmo/Espiga
<i>Fusarium graminearum</i>	Giberela (podridão-rosada da ponta da espiga)
<i>Stenocarpella</i> spp.	Mancha foliar e Podridão espiga

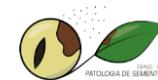
METODOLOGIA UTILIZADA



PAPEL DE FILTRO COM CONGELAMENTO

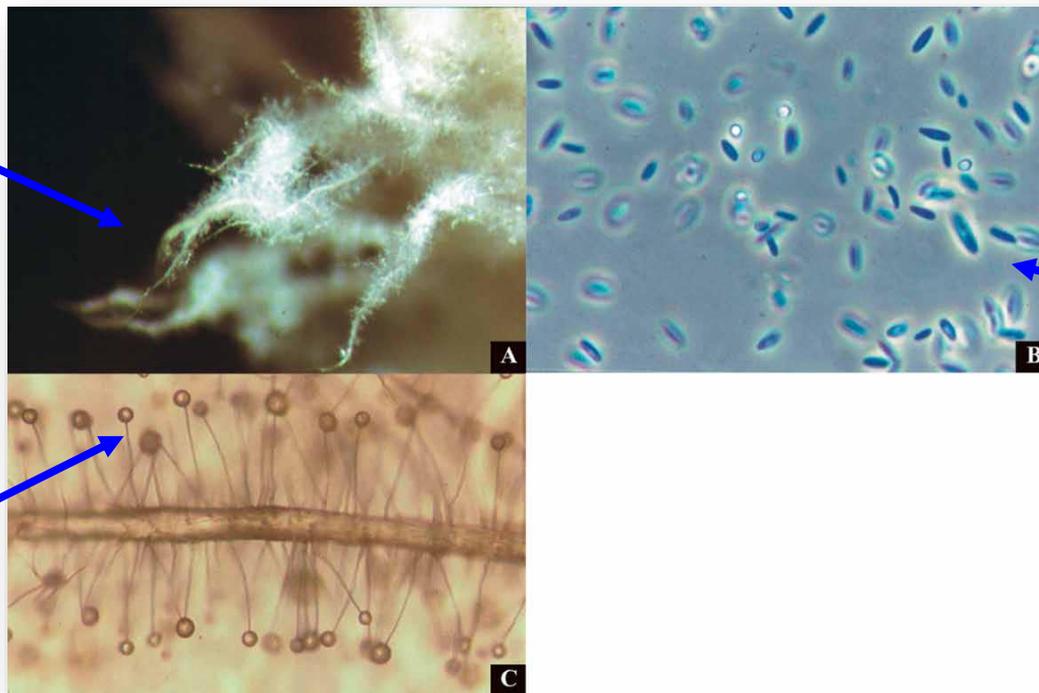
- Plaqueamento – 10 sementes / placa
- Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, 20±2°C, por 24h
- Congelamento: freezer -20°C, por 24h
- Incubação: 12 h de luz/12 h de escuro, 20±2°C
- Tempo = 7 dias de incubação (maioria dos fungos) e 14 dias para detecção de *Stenocarpella* spp.

Murcha - *Acremonium strictum*



Agronegócios

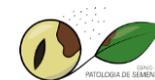
micélio superficial branco, bege
a alaranjado, com formações
filamentosas (agregação de
hifas) aéreas



numerosos agregados
esféricos de conídios

Conídios cilíndricos,
extremidade arredondada,
algumas vezes curvada

Acremonium (Cephalosporium) strictum em sementes:
“cordões” com formação lateral de fiálides (A, C) e
conídios em lâminas microscópicas (B)



Antracnose - *Colletotrichum graminicola*



Serenella Sukno

<https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/79825542/recombinacao-genetica-da-antracnose-do-milho-dificulta-medidas-de-controle-da-doenca>

Recombinação genética da antracnose do milho dificulta medidas de controle da doença

Photo: Serenella Sukno



Population Genetics | Research Article | 19 December 2022



Population Genomics Provide Insights into the Global Genetic Structure of *Colletotrichum graminicola*, the Causal Agent of Maize Anthracnose

Authors: Flávia Rogério , Riccardo Baroncelli , Francisco Borja Cuevas-Fernández, Sioly Becerra , JoAnne Crouch, Wagner Bettiol, M. Andrea Azcárate-Peril, Martha Malapi-Wight, Veronique Ortega, Javier Betran, Albert Tenuta, José S. Dambolena, Paul D. Esker, Pedro Revilla, Tamra A. Jackson-Ziems, Jürg Hiltbrunner, Gary Munkvold, Ivica Buhiniček, José L. Vicente-Villardón, Serenella A. Sukno  , Michael R. Thon   [SHOW FEWER](#) | [AUTHORS](#)

[INFO & AFFILIATIONS](#)

DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02878-22> •  Check for updates

 1 / 1,504



ABSTRACT

Understanding the genetic diversity and mechanisms underlying genetic variation in pathogen populations is crucial to the development of effective control strategies. We investigated the genetic diversity and reproductive biology

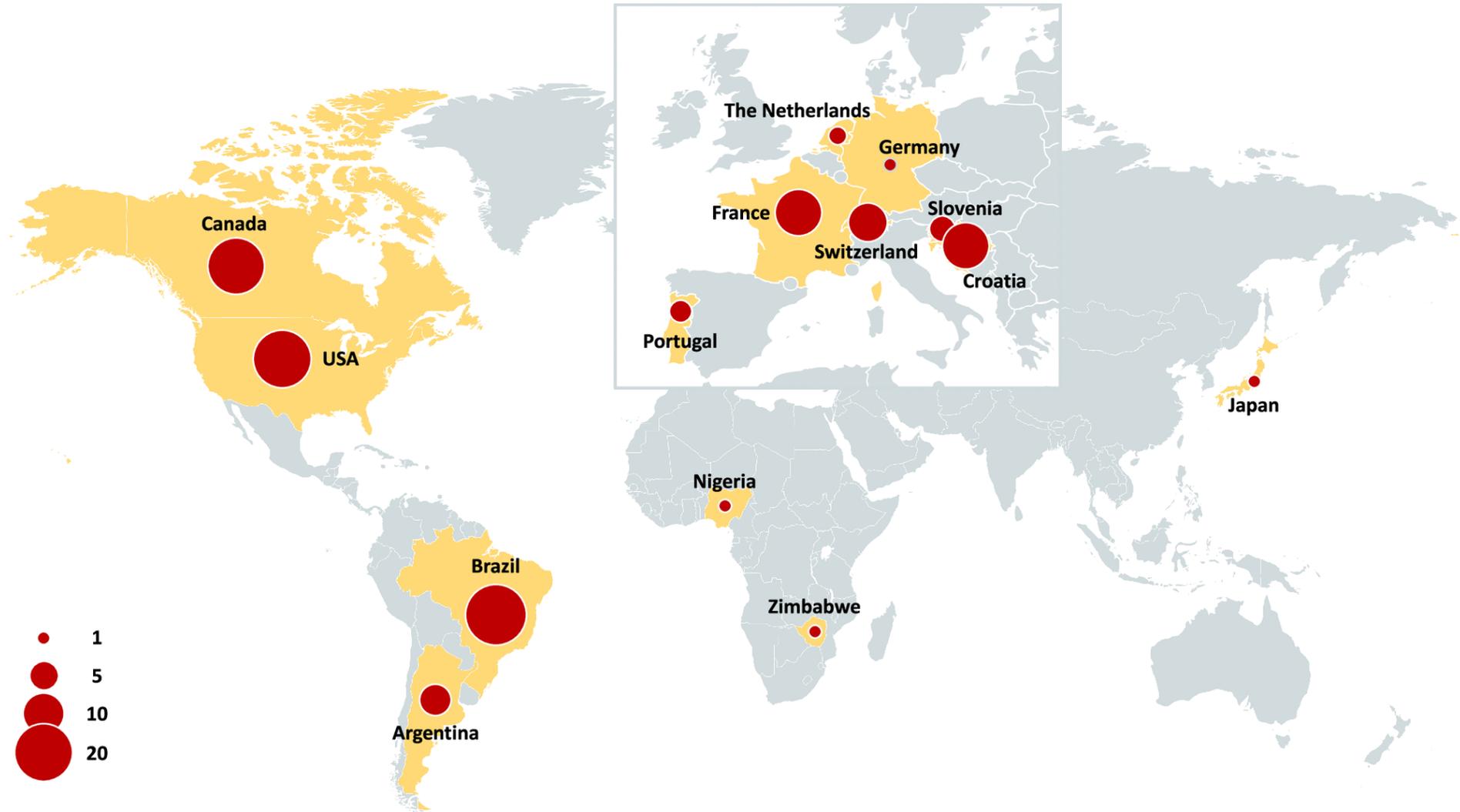
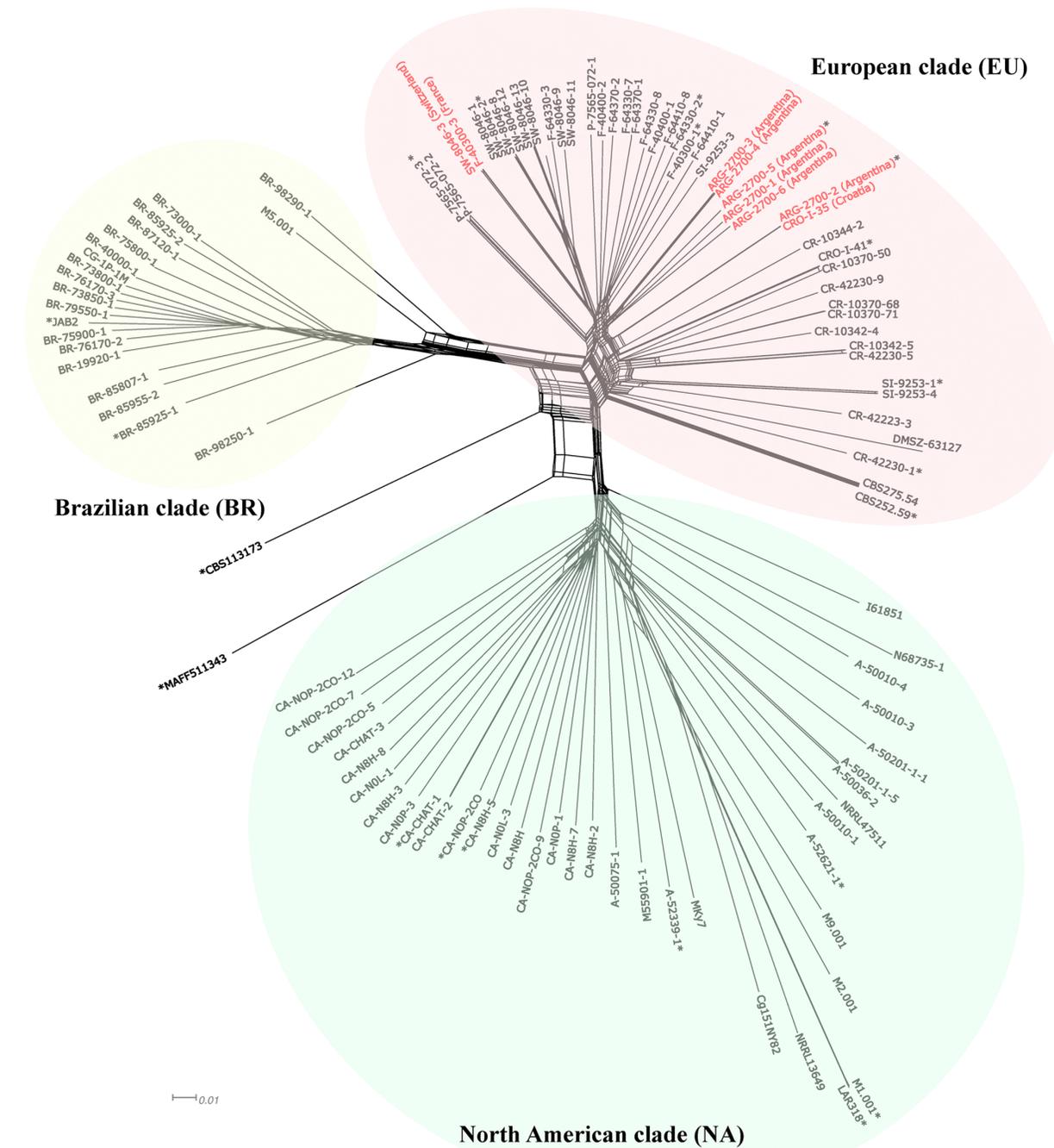


FIG 1 Worldwide *Colletotrichum graminicola* sampling. Red circles indicate the number of isolates sampled. Artwork created with mapchart.net.



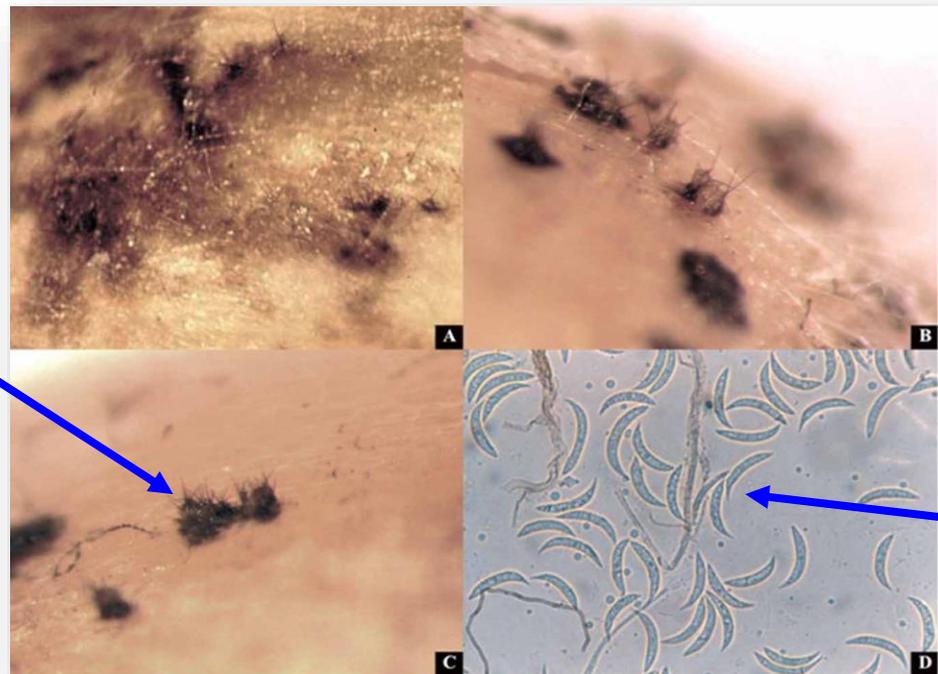
- Os três clados principais (América do Norte, Brasileiro e Europeu) apresentam diferentes níveis de diversidade genética, sugerindo que cada um tem uma história evolutiva única;
- Também encontramos evidências de migração recente de isolados entre a Europa e a Argentina, possivelmente devido à **importação de material vegetal infectado**;

FIG 3 Neighbor-net network showing relationships between *Colletotrichum graminicola* isolates. Red color indicates “migrant” isolates, i.e., isolates in the European clade. Isolates with pathogenic characterization are indicated by asterisks.

- Investigações em grande escala ao nível do genoma podem ser utilizadas para compreender o impacto real da recombinação e do fluxo génico na **diversidade genética** e adaptação desta espécie, com efeito direto nas medidas de controle e nos **programas de melhoramento** que visam a resistência;
- Por fim, alertamos que a antracnose do milho tem **potencial para se tornar muito mais significativa no futuro**, principalmente devido aos isolados altamente agressivos contra a cultivar avaliada, à expansão da distribuição geográfica do patógeno e ao aumento da suscetibilidade dos agroecossistemas acentuados pelas mudanças climáticas.



Acérvulos
isolados ou em
grupos,
apresentando
numerosas setas



Conídios são hialinos,
falcados, unicelulares,
ambas extremidades
pontiagudas

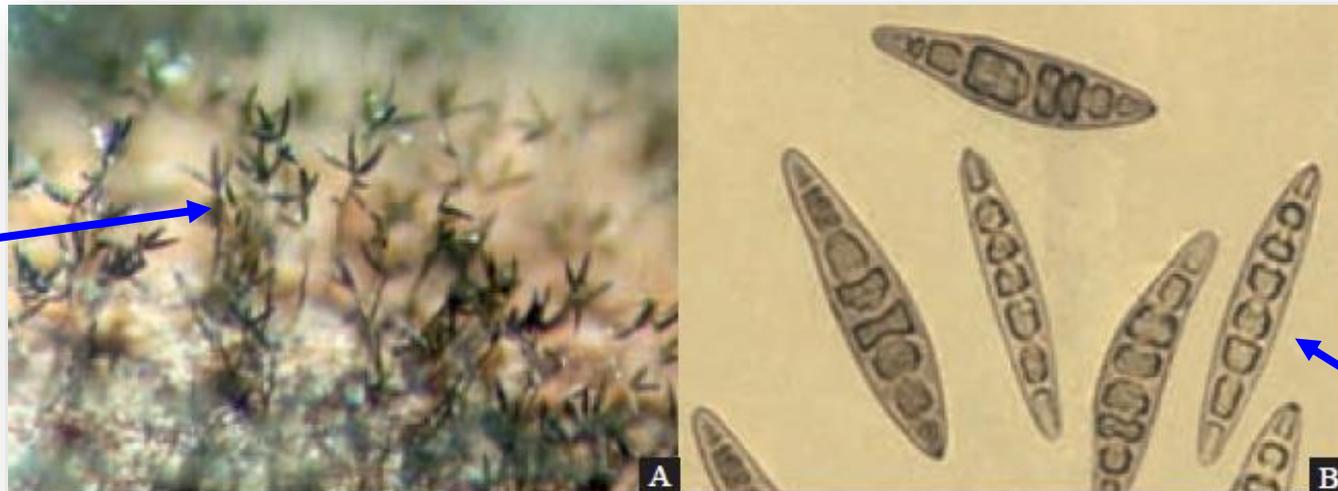
Colletotrichum graminicola em sementes de sorgo (A, B, C) e
conídios em lâminas microscópicas (D)

Helmintosporiose ou Mancha foliar - *Drechslera turcica*





Conidióforos de cor
marrom claro a
escuro



Drechslera turcica em sementes de milho (A) e conídios em preparação
microscópica (B)

Conídios fusiformes,
retilíneos ou ligeiramente
curvados, cor variável de
marrom claro a escuro

Podridão Colmo/Espiga - *Fusarium verticillioides*





Colônia com cadeias de microconídios

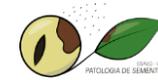
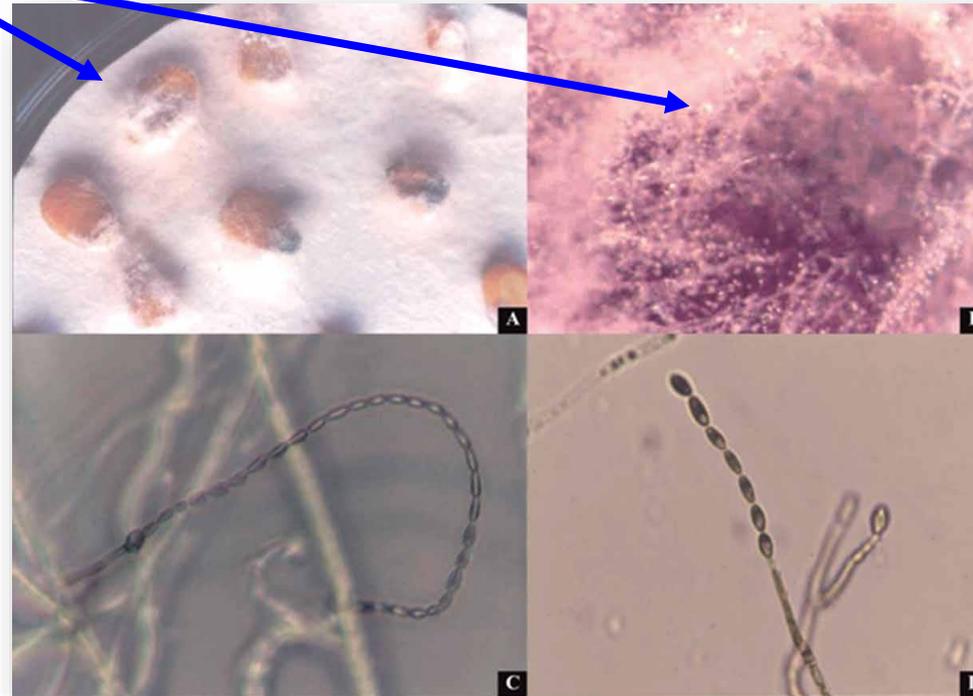


Colônia com micro e macroconídios (massa mucilaginosa)



Fusarium verticillioides em sementes de milho

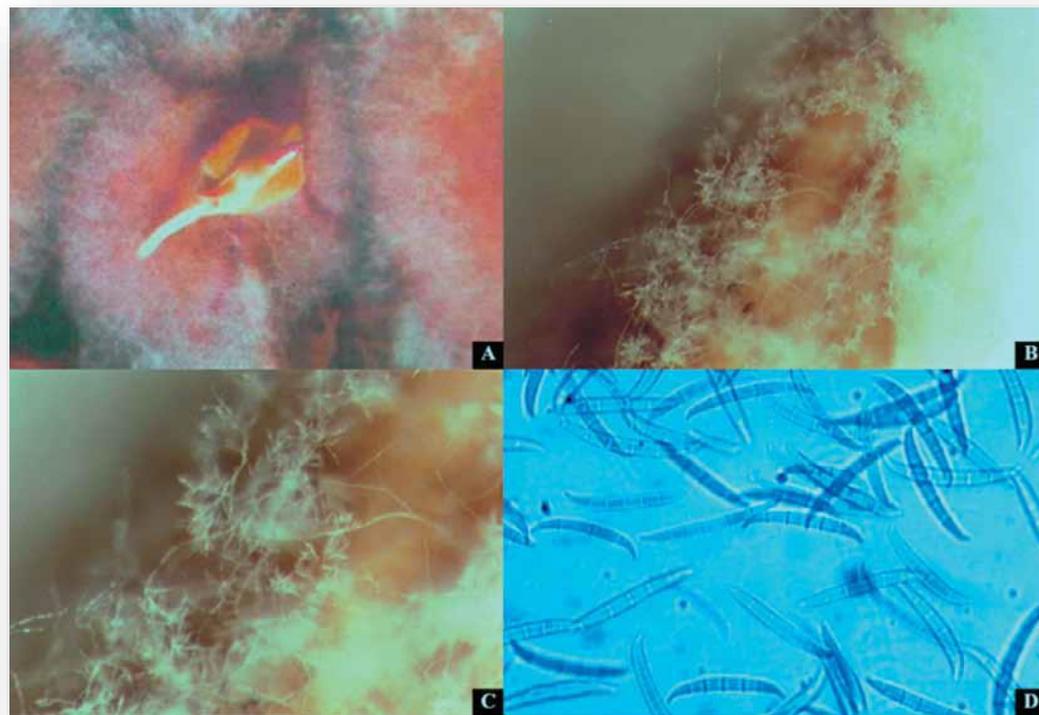
micélio branco cotonoso e falsas cabeças brilhantes no meio do micélio composto pelas cadeias de microconídios



Fusarium verticillioides em sementes (A,B) e cadeia de microconídios em lâminas (C,D)

Giberela (podridão-rosada da ponta da espiga) - *Fusarium graminearum*



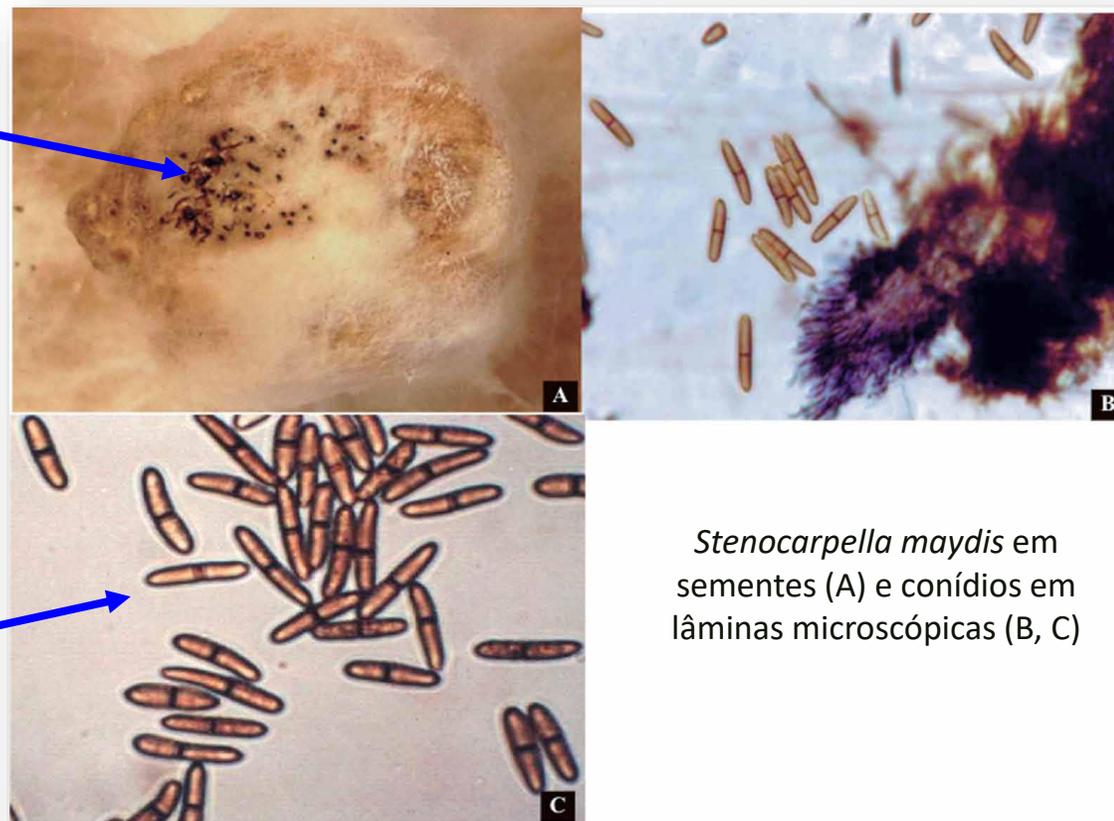


Fusarium graminearum em sementes (A - C) e macroconídios em lâmina (D)

Podridão branca da espiga (*Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*)

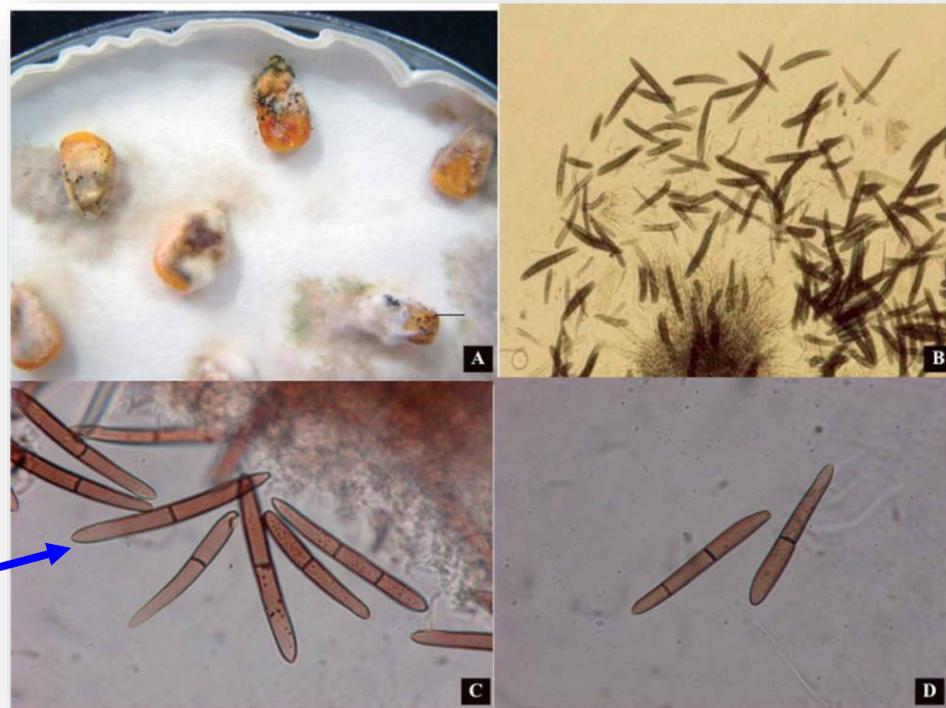


Picnídios sobre as
sementes

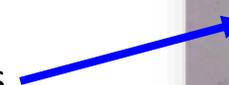


esporos a maioria tem
um único septo

Stenocarpella maydis em
sementes (A) e conídios em
lâminas microscópicas (B, C)

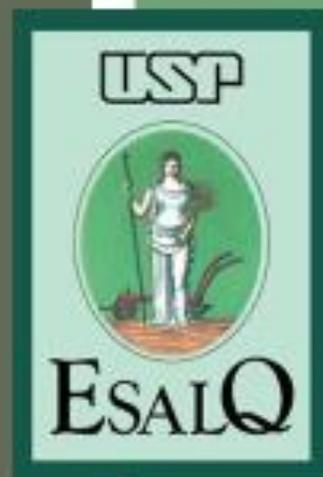


esporo mais longo e
maioria com dois septos



Stenocarpella macrospora em sementes (A) e conídios em lâminas
microscópicas (B, C, D)

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



**Juliana
Ramiro**

Orientador:
Nelson Sidnei
Massola
Júnior

FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE SOJA

Alternaria spp.

Cercospora kikuchii

Cercospora sojina

Colletotrichum truncatum

Corynespora cassicola

Fusarium spp.

Phomopsis spp.

Sclerotinia sclerotiorum

Detecção

❑ Métodos tradicionais

Papel de filtro (*blotter test*) - maioria dos fungos

Ágar-azul de bromofenol - *S. sclerotiorum*

Regras para
Análise de
Sementes

❑ Métodos moleculares

PCR convencional (apenas detecção)

PCR em Tempo Real (qPCR) (detecção e quantificação)

?

Detecção

Métodos tradicionais

Mais demorados e laboriosos;

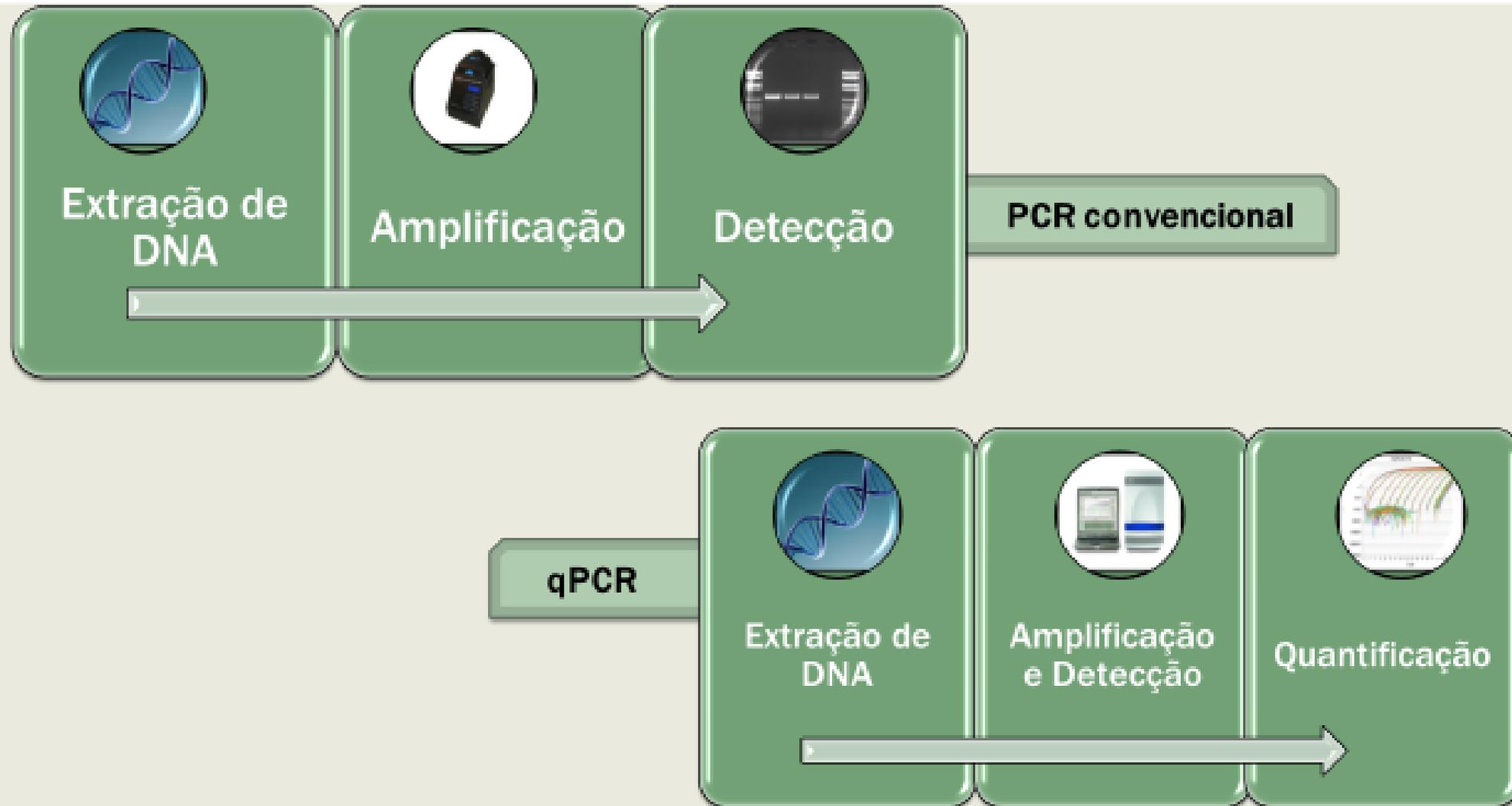
Exigem um conhecimento extenso de taxonomia clássica.

Métodos moleculares

Mais rápidos, mais sensíveis e mais precisos;

Podem ser realizados e interpretados por pessoas sem conhecimentos taxonômicos especializados.

PCR convencional X qPCR



Objetivo geral

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

Objetivos específicos

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

Obtenção dos iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan®

PHOMOPSIS SPP.

S. SCLEROTIORUM

C. TRUNCATUM

Obtenção de isolados fúngicos associados às sementes de soja

- Col1
- Col2
- Col3
- Col4
- Col 5

Colletotrichum truncatum



- Pho1
- Pho2
- Pho3
- Pho4
- Pho5

Phomopsis sp.



- Ss1
- Ss2
- Ss3
- Ss4
- Ss5

Sclerotinia sclerotiorum



- Cory1
- Cory2
- Cory3

Corynespora cassicola



- Fus1
- Fus2
- Fus3
- Fus4
- Fus5

Fusarium sp.



- Alt1
- Alt2
- Alt3

Alternaria sp.



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



termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System



7500 Software v 2.0.6 (Applied Biosystems)

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

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

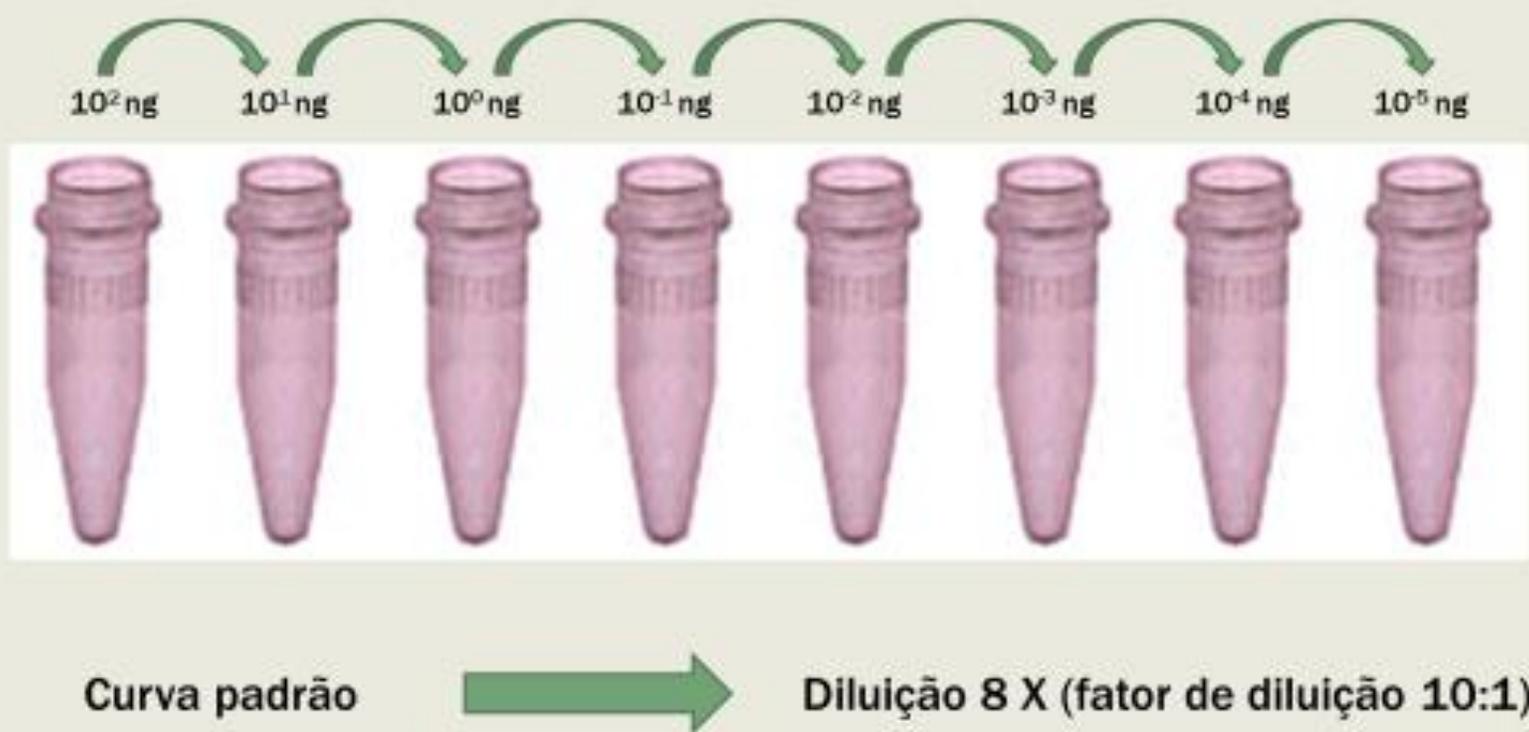
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp	Valores de C _t ^a Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>	Valores de C _t ^a Iniciadores e sonda de <i>C. truncatum</i>		Valores de C _t ^a Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp	Valores de C _t ^a Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>	Valores de C _t ^a Iniciadores e sonda de <i>C. truncatum</i>
<i>C. truncatum</i>				Outras espécies^b			
Col1	> 60 ± 0 ^b	> 60 ± 0	> 60 ± 0	Fus1	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Col2	> 60 ± 0	> 60 ± 0	26,26 ± 1,46	Fus2	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Col3	> 60 ± 0	> 60 ± 0	31,43 ± 5,52	Fus3	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Col4	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0	Fus4	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Col5	> 60 ± 0	> 60 ± 0	24,45 ± 4,47	Fus5	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
<i>Phomopsis</i> spp.				Cory1	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Pho1	31,91 ± 0,68	> 60 ± 0	> 60 ± 0	Cory2	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Pho2	34,12 ± 1,39	> 60 ± 0	> 60 ± 0	Cory3	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Pho3	30,21 ± 0,88	> 60 ± 0	> 60 ± 0	AH1	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Pho4	34,38 ± 0,65	> 60 ± 0	> 60 ± 0	AH2	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Pho5	29,64 ± 1,26	> 60 ± 0	> 60 ± 0	AH3	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
<i>S. sclerotiorum</i>				Controle negativo	> 60 ± 0	> 60 ± 0	> 60 ± 0
Ss1	> 60 ± 0	30,31 ± 0,78	> 60 ± 0				
Ss2	> 60 ± 0	32,71 ± 1,07	> 60 ± 0				
Ss3	> 60 ± 0	33,22 ± 1,35	> 60 ± 0				
Ss4	> 60 ± 0	30,82 ± 0,97	> 60 ± 0				
Ss5	> 60 ± 0	33,49 ± 1,89	> 60 ± 0				

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

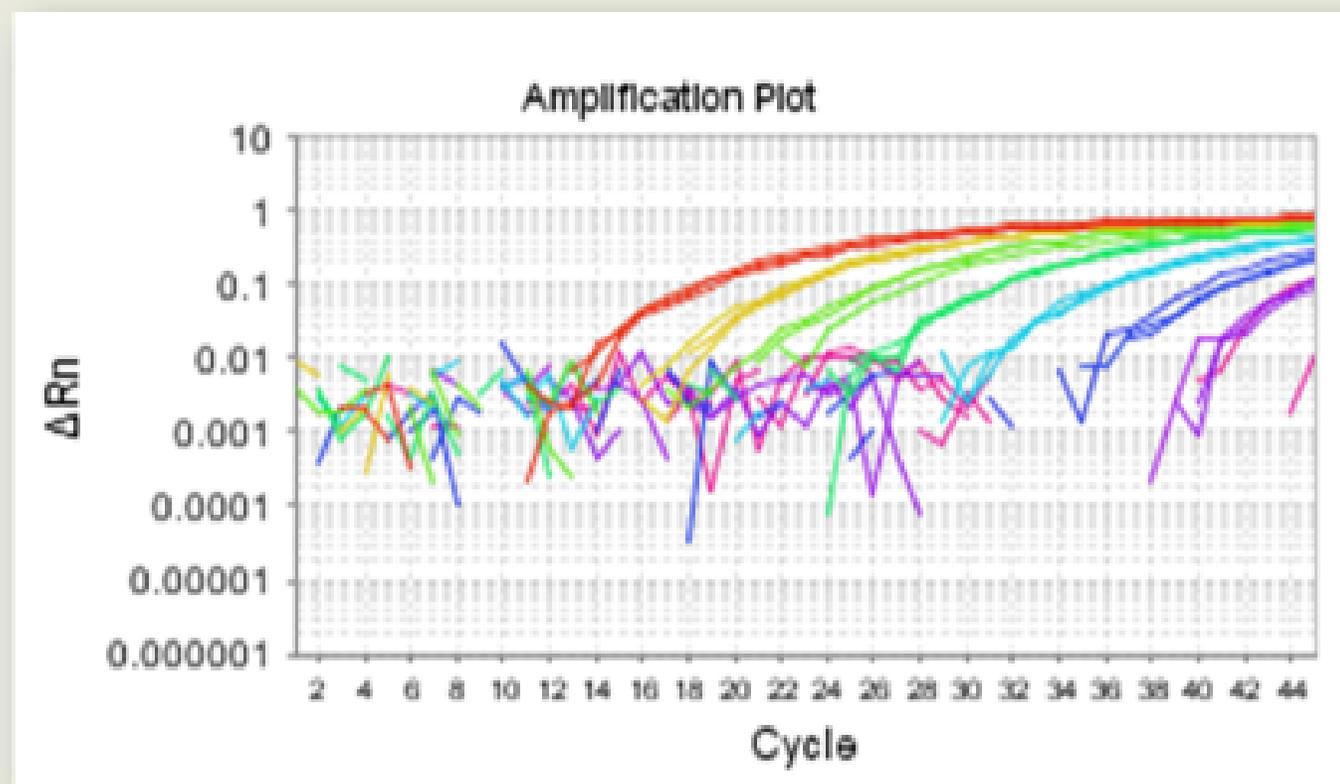
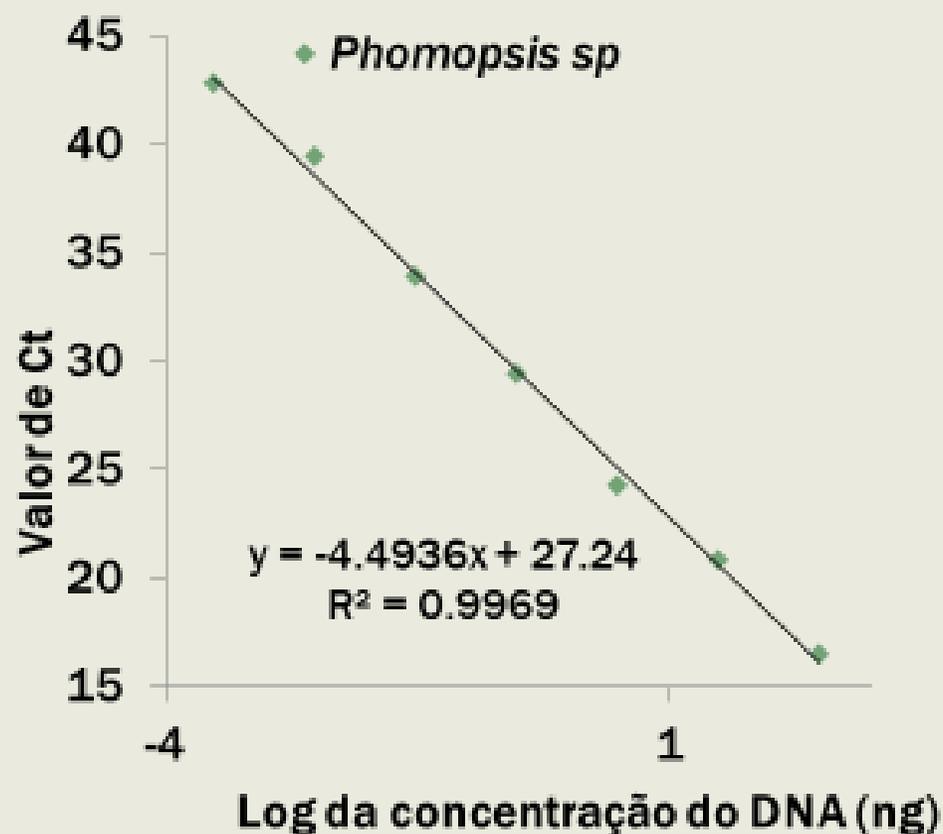
S. SCLEROTIORUM

PHOMOPSIS SPP.

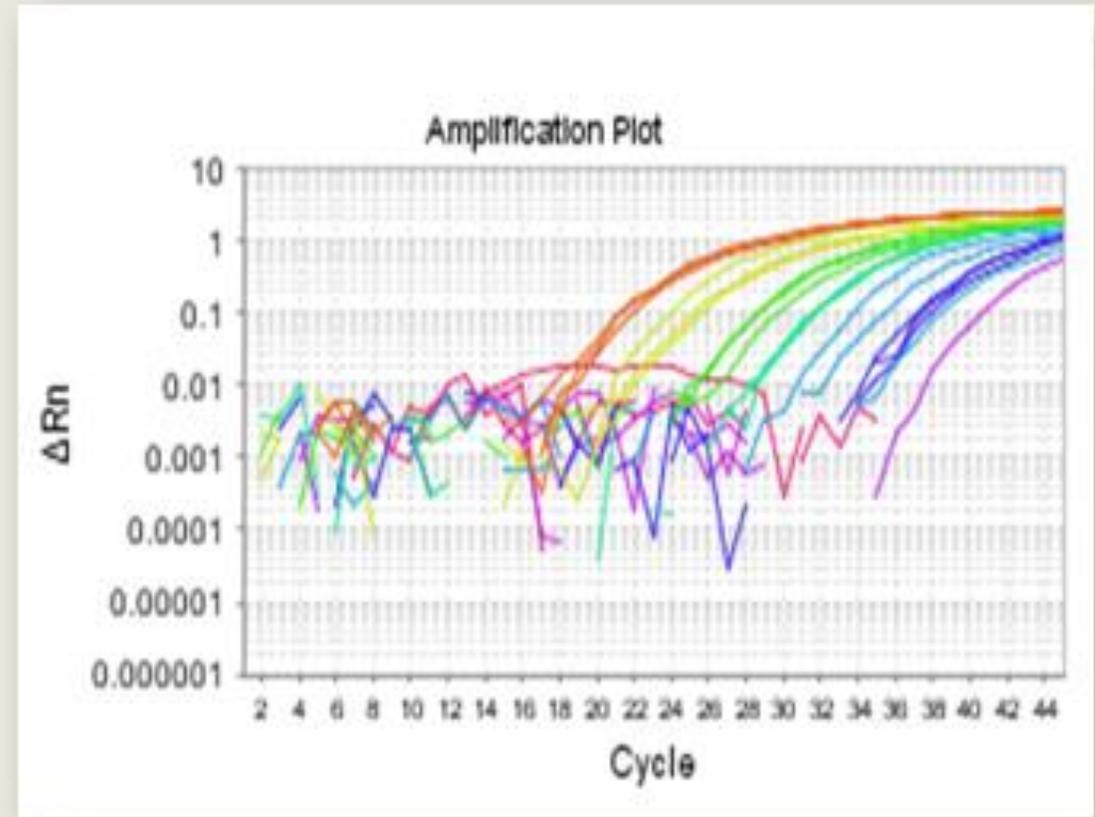
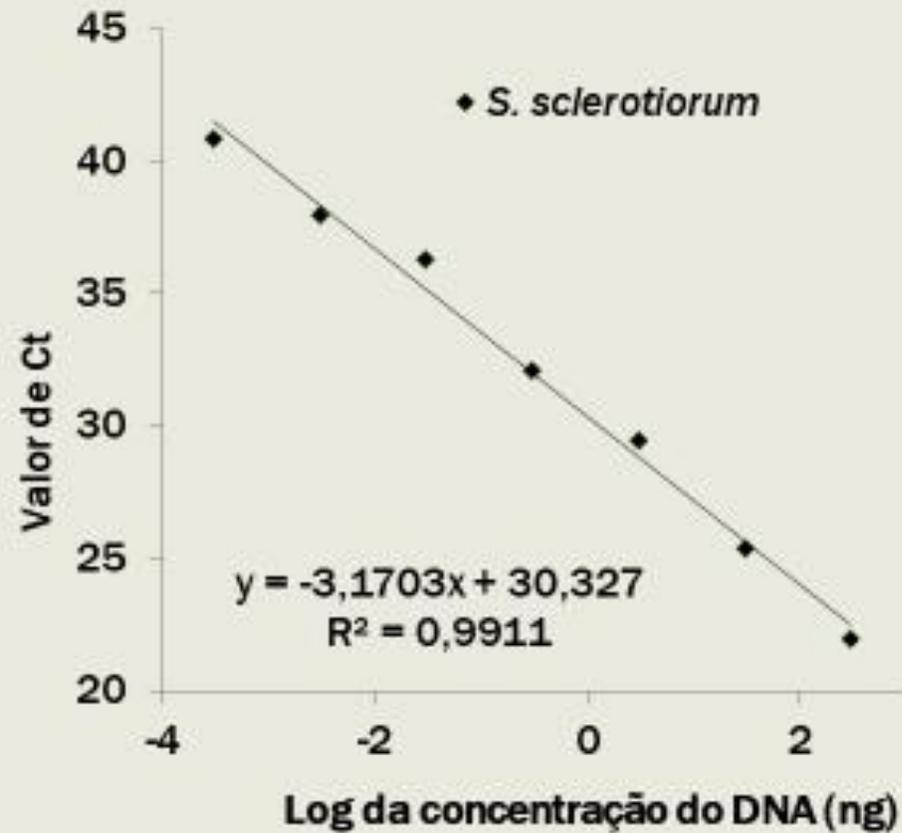
Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas



Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas



Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas



Avaliação da sensibilidade dos iniciadores e sondas obtidas

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

Quantidade de DNA de cada isolado	Valores de C_T^a	
	Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> sp.	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>
3×10^2 ng (300 ng)	16,47±0,26	21,94±0,32
3×10^1 ng (30ng)	20,86±0,23	25,35±0,91
3×10^0 ng (3ng)	24,24±0,34	29,42±0,58
3×10^{-1} ng (300 pg)	29,43±0,09	32,10±0,13
3×10^{-2} ng (30 pg)	33,88±0,18	36,26±2,39
3×10^{-3} ng (3 pg)	39,43±0,06	37,95±0,45
3×10^{-4} ng (300 fg)	42,82±0,10	40,86±1,34
3×10^{-5} ng (30 fg)	> 60 ± 0	> 60 ± 0

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

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

- Diluições das sementes (sementes inoculadas : sementes sadias) nas seguintes proporções:

1 : 399 (0,25%)

1 : 799 (0,125%)

1 : 1599 (0,0625%)

- Diluições em triplicata: método de maceração, método da embebição e métodos tradicionais.

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

❑ Maceração de sementes para extração de DNA



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

- Embebição de sementes em água ultrapura



100 mL de água ultrapura : 100 sementes

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

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

Incidência de sementes artificialmente inoculadas (%)	Sementes artificialmente inoculadas/total de sementes	Valores de C _T ^a	
		Iniciadores e sonda de <i>Phomopsis</i> spp.	Iniciadores e sonda de <i>S. sclerotiorum</i>
100	400/400	32,36 ± 0,02	38,04 ± 2,22
0,25	1/400	41,27 ± 2,31	42,24 ± 1,70
0,125	1/800	41,75 ± 1,15	> 60 ± 0
0,0625	1/1600	42,32 ± 1,27	> 60 ± 0
0,0	0/400	> 60 ± 0 ^b	> 60 ± 0

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

^b>60 - Nenhuma fluorescência foi detectada até 60 ciclos de amplificação

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

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

Incidência de sementes artificialmente inoculadas (%)	Sementes artificialmente inoculadas/total de sementes	Quantidade de DNA ²	
		<i>Phomopsis</i> sp.	<i>S. sclerotiorum</i>
100	400/400	72,42 pg	3,70 pg
0,25	1/400	753,43 fg	175 fg
0,125	1/800	591,16 fg	-
0,0625	1/1600	44,43 fg	-
0,0	0/400	-	-

² Dados representam a quantidade de DNA detectada em amostras (aliquotas) de 3µL retirada de sementes embebidas em água em cada nível de incidência

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

Blotter test



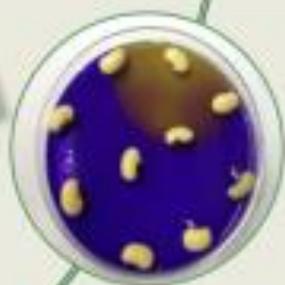
Ágar-azul de bromofenol



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



1 infectada/400 sementes
1 infectada/800 sementes
1 infectada/1.600 sementes



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

Phomopsis sp. (blotter test)



7 dias

S. sclerotiorum (NEON)



3 dias



7 dias

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

15 amostras (Goiás, Minas Gerais e Paraná)

400 sementes para:

- *Blotter test*
- Ágar-azul de bromofenol
- Embebição para qPCR



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

☐ *C. truncatum*



- acérvulos
- setas

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

☐ *Phomopsis* spp.



- picnídios
- cirros

Detecção por meio da qPCR

Valor de C_T → log da quantidade de DNA → quantidade de DNA em nanogramas em $3\mu\text{L}$ → **X ng em 400mL**

Valor padrão de referência

0,25% de incidência → 1 inoculada / 400 sementes → 753,43 fg
→ 0,00075343 ng em $3\mu\text{L}$ → **100,46 ng em 400mL**

$$x / 100,46 = n^\circ \text{ sementes infectadas}$$

Detecção de fungos fitopatogênicos por meio da qPCR

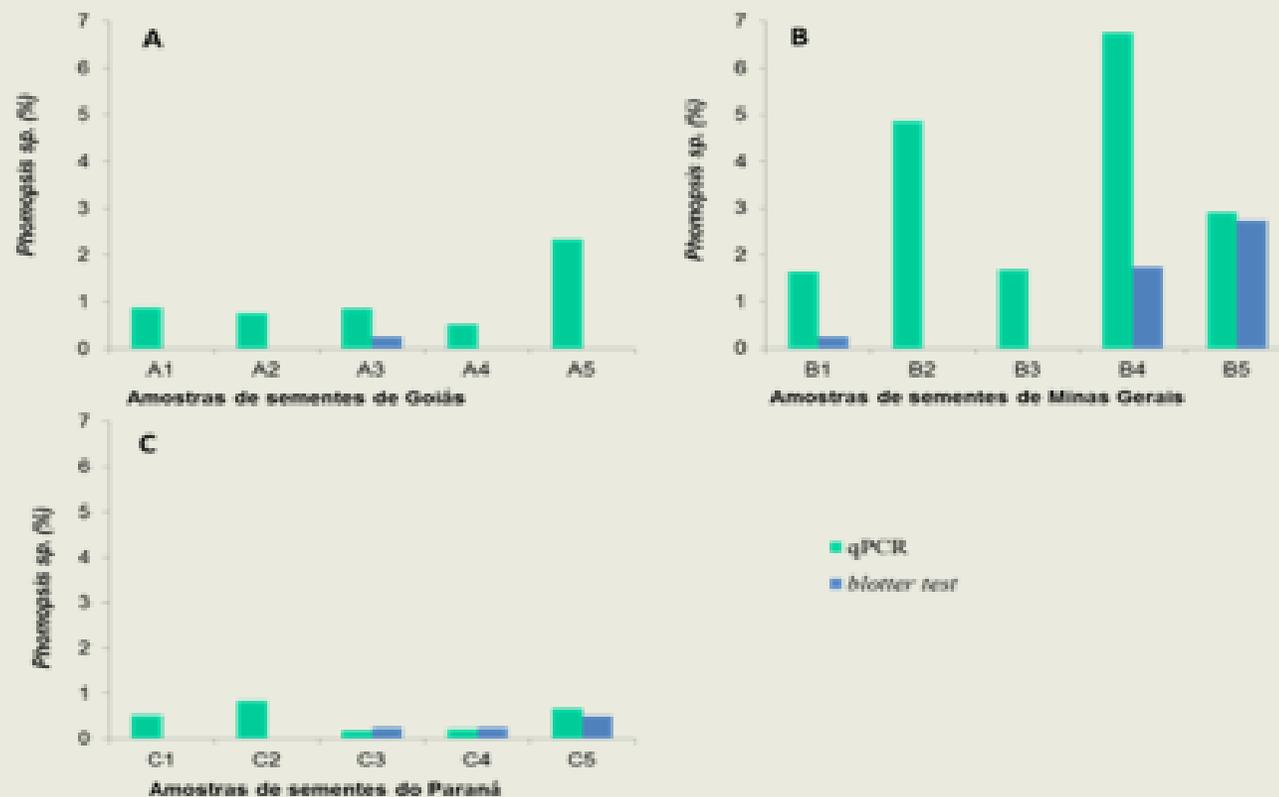


Figura 4 - Incidência (em porcentagem) de *Phomopsis* spp. em amostras de sementes de soja provenientes dos Estados de Goiás (A), Minas Gerais (B) e Paraná (C), avaliadas por dois métodos de detecção, qPCR e blotter test

Desafios

- ✓ Desenvolvimento de um método capaz de detectar o patógeno independentemente da sua forma de associação (Infecção; contaminação; contaminação concomitante) – Embebição ou maceração (inibidores);
- ✓ Tamanho da amostra (quantas sementes são necessárias para o método de molecular + sensível);
- ✓ Viabilidade do patógeno – testes moleculares detectam presença (ou quantidade) de DNA, não necessariamente patógenos vivos e capazes de provocar perdas no campo;
- ✓ Custos, estruturas e equipe técnica qualificada.

Obrigada!



Obrigado por tudo, Helô!

