

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

Uso do sal de Tetrazólio para detecção de *Fusarium semitectum* em sementes de soja.

Alice Beatriz Peña Medina

Pelotas, 2023

Alice Beatriz Peña Medina

Uso do sal de Tetrazólio para detecção de *Fusarium semitectum* em sementes de soja.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fitopatologia).

Orientador: Prof. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M491u Medina, Alice Beatriz Peña

Uso do sal de tetrazólio para detecção de *Fusarium semitectum* em sementes de soja / Alice Beatriz Peña Medina ; Cândida Renata Jacobsen de Farias, orientadora. — Pelotas, 2023.

54 f. : il.

Tese (Doutorado) — Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Métodos colorimétricos. 2. Fitopatógenos. 3. Viabilidade. 4. Inoculação. I. Farias, Cândida Renata Jacobsen de, orient. II. Título.

CDD : 633.349952

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Alice Beatriz Peña Medina

Uso do sal de Tetrazólio para detecção de *Fusarium semitectum* em sementes de soja.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fitossanidade (área do conhecimento: Fitopatologia) Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,

Data de defesa: 29 de março de 2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias (Orientadora)
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a Dra. Danielle Ribeiro de Barros
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Prof^a Dra. Maristela Rey Borin
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Vanessa Nogueira Soares
Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a Dra. Andreia da Silva Almeida
Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas

Ao grande Amor da minha vida e Mestre dos mestres “Jesus Cristo”. Aos meus pais e minha família, por ser o alicerce em meio das alegrias e tribulações.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e pelo cuidado com tanto amor.

A Virgem Maria, minha mãe celeste e meu socorro em meio das incertezas da vida e neste caminho percorrido.

In memoriam ao meu avô Miguel Medina (+12-02-2021) e aos meus avós (Miguela Marín, Manuel Peña), sempre estarão em minha memória.

Aos meus pais, Gustavo e Blanca, minha avó, Carmen Vera, meus irmãos Gustavo e Paola, minha afilhada Jesselyn e toda a minha família, nos momentos bons e ruins estiveram apoiando de perto e de longe.

À minha Diretora Espiritual Bettina, meu confessor Padre German e os irmãos da Fe, pelas orações e ao amor de Deus que nos une.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Cândida Renata Jacobsen de Farias, pelo acompanhamento neste estudo acadêmico e realização do experimento, além de aconselhar com simplicidade e proximidade ao longo do curso.

A Rosaria Machado do Laboratório de Patologia de Sementes, pelo ensino na rotina do laboratório e realização do experimento, além da amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Ing. Agr. José Sánchez (Decano), a Prof. Dra. Daisy Ramírez e profissionais da Facultad de Ingeniería Agronómica – Universidad Nacional del Este (FIA-UNE), pela recomendação e oportunidade profissional.

A Jorge Ramon Cantero Piñanez, M.Sc. em Bioinformática y doutorando em Química mención Bioinformática De la Universidad de la República (UdelaR), pelo auxílio na análise estatística, principalmente a criação dos scripts no RStudio.

A Professora Danielle Barros, pela identificação molecular do *F. semitectum*, e o Professor Leandro Dallagnol, pelo uso do Laboratório de Interação Planta-Patógeno.

A Mario Pinel e Luiz Lidoino, estudantes de doutorado e graduação da UFPel, pelo apoio em uma das atividades do experimento.

Ao Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, pelo ensinamento, colaboração e execução do experimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade (PPGF) da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade e formação profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade do PPGFs, professores e técnicos do PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes, colegas do curso de Pós-graduação, profissionais fora da UFPel e amigos, pelo ensino acadêmico, momentos compartilhados e colaboração ao longo do curso.

Aos membros da banca examinadora, pela aceitação do convite para integrar a mesa examinadora de defesa de tese.

A Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Me sinto muito grata a todos que de alguma forma fizeram parte da minha história nessa vitória.

"A boa semente que brota e cresce em solo fértil é capaz de produzir muitos frutos"

Anônimo.

Resumo

PEÑA MEDINA, Alice Beatriz. **Uso do sal de Tetrazólio para detecção de *Fusarium semitectum* em sementes de soja.** 2023. 54f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

O teste de qualidade sanitária de sementes para detecção de patógenos tornou-se uma ferramenta fundamental tanto no sistema de quarentena quanto na produção de sementes certificadas. Dessa forma, busca-se, cada vez mais, por métodos rápidos e eficientes de detecção de fitopatógenos. Métodos colorimétricos com sais de tetrazólio e resazurina vem sendo cada vez mais explorados para medir a atividade respiratória em fungos, bactérias e sementes em diversas áreas de pesquisa. Para o sucesso na testagem de novos métodos faz-se necessários sementes com diferentes níveis de infecção pelo patógeno. Para isso, protocolos de inoculação artificial de sementes tornam-se necessários. O objetivo desse trabalho foi, primeiramente desenvolver um protocolo de inoculação artificial de sementes de soja com *Fusarium semitectum* que proporcionasse uma boa produção de estruturas reprodutivas para posteriormente verificar a eficiência do uso de 2,3,5- trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) como método indireto para detecção rápida da viabilidade do fungo nas sementes. No primeiro estudo, foram testados os meios BDA e BSA para inoculação das sementes em diferentes tempos de incubação. Posteriormente, as sementes foram avaliadas pelo *Blotter test*, quanto a incidência e produção de conídios, sendo o meio BSA por 48 h indicado para o desenvolvimento de conídios. No segundo estudo, avaliou-se o TCT como método de detecção qualitativo e quantitativo, a partir do líquido de extração obtido das sementes inoculadas. No método qualitativo, os preditores determinantes na reação de redução do TCT foram tempo, dose e potencial de inóculo; sendo a melhor resposta com 72 h de incubação, em concentração mínima de TCT de 0,5 mg. mL⁻¹ e potencial de inóculo foi 10⁻¹. O desenvolvimento de um método analítico (quantitativo), UFC. mL⁻¹ e DO, testados não apresentaram resultados satisfatórios, acredita-se, entre outros fatores, que as próprias características do fungo quanto a produção de esporos interferiram no método.

Palavras-chave: métodos colorimétricos, fitopatógenos, viabilidade, inoculação.

Abstract

PEÑA MEDINA, Alice Beatriz. **Use of Tetrazolium salt for detection of *Fusarium semitectum* in soybean seeds.** 2023. 54f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

The sanitary quality test of seeds to detect pathogens has become a fundamental tool both in the quarantine system and in producing certified seeds. Thus, there is an increasing search for fast and efficient methods of detecting phytopathogens. Colorimetric methods with tetrazolium and resazurin salts have been increasingly explored to measure respiratory activity in fungi, bacteria and seeds in several areas of research. To successfully test new methods, seeds with different levels of pathogen infection are needed. For this, artificial seed inoculation protocols are necessary. The objective of this work was, firstly, to develop a protocol for the artificial inoculation of soybean seeds with *Fusarium semitectum*, which provides a good production of reproductive structures to later verify the efficiency of the use of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as an indirect method for rapid detection of fungus viability in seeds. In the first study, PDA and PSA media were tested for seed inoculation at different incubation times. Subsequently, the seeds were evaluated, blotter test, regarding the incidence and production of conidia, with PSA medium for 48 hours indicated for the development of conidia. In the second study, the TTC was evaluated as a qualitative and quantitative detection method, from the extraction liquid obtained from the inoculated seeds. In the qualitative method, the determining predictors in the TTC reduction reaction were time, dose and inoculum potential; the best response was 72 hours of incubation, in a minimum TTC concentration of 0.5 mg. mL⁻¹ and inoculum potential was 10⁻¹. The development of an analytical (quantitative) method, CFU. mL⁻¹ and DO, tested did not show satisfactory results, it is believed, among other factors, that the characteristics of the fungus in terms of spore production interfered with the method.

Keywords: colorimetric methods, phytopathogens, viability, inoculation.

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1. Inoculação de sementes (BSA): A Sementes inoculadas com *F. Semitectum*, B Massa Conidial e C conídios. 21

Artigo 2

- Figura 1. Fluxograma do protocolo: Desenvolvimento do método colorimétrico qualitativo. 46
- Figura 2. Teste triagem com TCT em função das microdiluições seriadas dos inóculos e dos Tempos de incubação observadas em microtubos na dose 0.5 mg. mL⁻¹. 46
- Figura 3. Curva ROC e AUC conforme predição do método qualitativo do modelo em microtubos, AUC=0,957. 53

Lista de Tabelas

Artigo 1

- Tabela 1. Matriz de classificação que avalia o modelo em função do meio de cultura, expressos em porcentagem. 20
- Tabela 2. Matriz de classificação que avalia o modelo em função do tempo de inoculação, expressos em porcentagem. 20

Artigo 2

- Tabela 1. Resultados dos controles sem concentração de TCT no Estudo I em função dos tempos incubação e microdiluições seriadas do inóculo observadas em microtubos e placas de Petri. 44
- Tabela 2. Resultados dos controles sem concentração de TCT e uso de cloranfenicol no Estudo I em função dos tempos incubação e microdiluição de inóculo (10^{-1}) observados em microtubos e placas de Petri. 44
- Tabela 3. Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função dos tempos de incubação expressos em porcentagem. 45
- Tabela 4. Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função das concentrações do sal expressos em porcentagem. 45
- Tabela 5. Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função dos potenciais de inóculo expressos em porcentagem. 45

Lista de Tabelas

- Tabela 6. Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 0 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA. 54
- Tabela 7. Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 48 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA. 54
- Tabela 8. Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 72 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA. 54

Sumário

1	Introdução geral	14
2	Artigo 1 - Protocolo para inoculação artificial de sementes de soja Fusarium semitectum.....	16
2.1	Introdução	17
2.2	Material e Métodos	18
2.3	Resultados.....	19
2.4	Discussão.....	21
2.5	Conclusão.....	22
2.6	Referências	22
3	Artigo 2 - Uso do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio para detecção de viabilidade de <i>Fusarium semitectum</i> em sementes de soja.....	26
3.1	Introdução	28
3.2	Materiais e Métodos	29
3.3	Resultados.....	33
3.4	Discussão	36
3.5	Conclusões.....	39
3.6	Referências	40
4	Considerações Finais.....	48
5	Referências gerais	48
	Anexos	52

1. Introdução geral

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais commodities de produtos agrícolas amplamente distribuída em diversos países do mundo, dada sua crescente demanda por retorno econômico e sua utilização como grão, farelo e óleo. Isso posiciona o Brasil como líder mundial na produção e exportação de soja, conquistando a liderança exercida pelos Estados Unidos nas safras 2019/2020 até 2022/2023. O estado de Mato Grosso se destaca como líder nacional de produção brasileira (BRASIL, 2023; CONAB, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023).

Estresses abióticos e bióticos são os fatores limitantes da produção e afetam negativamente o ciclo da soja. Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas por fungos ocorrem com maior frequência por transmissão via sementes, como foco primário de doenças em diversos países do mundo, causando perdas quantitativas ou qualitativas associadas à produtividade e qualidade fisiológica, respectivamente (KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018; SEIXAS et al., 2020).

Os principais fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja são *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Rizoctonia soloni*, *Sclerotinia sclerotinia*, *Fusarium semitectum*, além dos fungos de armazenamento *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (GOULART, 2018; HENNING, 2017). A maioria dos fitopatógenos colonizam sementes como meio de sobrevivência e disseminação em curtas e longas distâncias, servindo como fonte de inóculo primário em áreas livres (ou reintrodução) (BERGAMIM FILHO; AMORIM, 2018; DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009).

Diagnóstico preciso de patógenos em sementes pode ser utilizado como uma medida preventiva para definir o seu manejo em detrimento do controle de doenças, pois evita sua introdução e disseminação no campo. Nesse contexto, o teste de sanidade determina a qualidade sanitária das sementes, auxiliando os serviços de quarentena, comercialização de sementes certificadas e tratamento de sementes (BERGAMIM FILHO; AMORIM, 2018).

O *Blotter test* destaca-se por detectar inúmeros fungos e torna-se o teste padrão no comércio de sementes de soja. No entanto, a eficiência do método

depende da formação de estruturas fúngicas e do conhecimento da taxonomia clássica para as análises, muitas vezes demoradas e trabalhosas, o que limita a quantidade de amostras a serem realizadas por dia. Essas barreiras sinalizam a necessidade de novos métodos que agilizem o fluxo das amostras nos laboratório.

O advento de técnicas colorimétricas, como os sais de tetrazólio e resazurina, são indicadores de viabilidade e têm sido manipulados em substâncias antifúngicas ou antibióticas na análise de sensibilidade *in vitro* de fungos e bactérias, biotecnologia, biologia celular, farmacologia, cinética de crescimento bacteriano e sementes (ALONSO et al., 2017; BOMMER; WARD, 2016; CEN et al., 2018; GOODWIN et al., 1995; JAHN; STÜBEN; BHAKDI, 1996; MONTORO et al., 2005; PEREIRA et al., 2019; PUJOL et al., 2002; STOCKERT et al., 2018; SUTHERLAND; COHEN, 1983; TSUKATANI et al., 2008).

Um dos entraves na testagem de novas técnicas é a obtenção de sementes com diferentes incidências para testar a sensibilidade dos métodos. Dessa forma a inoculação artificial torna-se necessários para produzir ou manter o inóculo. No entanto, muitos meios induzem apenas o desenvolvimento vegetativo do fungo, dificultando o trabalho que exige a parte reprodutiva.

Por exemplo em sementes de soja podemos destacar alguns fungos como *S. sclerotiorum* (BOTELHO et al., 2015; DE FRANÇA et al., 2021; GRABICOSKI et al., 2015; HENNEBERG et al., 2012; RAMIRO et al., 2019), *Corynespora cassiicola* (DE SOUSA; SIQUEIRA; MACHADO, 2016) *C. kikuchii* e *Rhizoctonia bataticola* (SAJEESH; RAO; JAHAGIRDAR, 2014), *C. truncatum* (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007) e *Phomopsis* spp.(VECHIATO; MARINGONI; MARTINS, 2004, 2006).

Tendo em vista a ampla aplicabilidade do 2,3,5-trifenil cloreto tetrazólio (TCT) o presente trabalho teve como objetivo testar, esse sal, na detecção do fungo, *Fusarium semitectum*, como uma ferramenta de triagem em laboratórios de Patologia de Sementes eliminando as amostras que não apresentam viabilidade fúngica e conseqüentemente agilizando o fluxo de entrada e saída de amostra.

Protocolo para inoculação artificial de sementes de soja *Fusarium semitectum*

Protocol for artificial inoculation of *Fusarium semitectum* soybean seeds

RESUMO:

O fungo *F. semitectum* é patogênico em sementes de soja por afetar negativamente a germinação em laboratório e no campo. Uma das limitações dos métodos de inoculação de sementes é a redução na produção de esporos, o que muitas vezes dificulta o desenvolvimento de diversos estudos na área de fitopatologia. Diante da necessidade de esporulação fúngica, o estudo teve como objetivo induzir a produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja, inoculadas artificialmente, utilizando BDA e BSA em diferentes tempos de inoculação (6 h; 12 h; 24 h; 48 h e 72 h). Foram avaliados incidência do fungo através do Blotter test e a produção de conídios. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial duplo (meio e tempo) com níveis de 5 e 2 de cada fator, respectivamente, com 4 repetições. A melhor resposta na produção de conídios foi com meio BSA, às 48 e 72 h.

Palavras-chave: fungo, esporulação, incidência, BDA-BSA.

ABSTRACT:

The fungus *F. semitectum* is pathogenic in soybean seeds because it negatively affects germination in the laboratory and in the field. One of the limitations of seed inoculation methods is the reduction in spore production, which often hinders the development of several studies in the field of phytopathology. Given the need for fungal sporulation, the study aimed to induce the production of *F. semitectum* conidia in soybean seeds, artificially inoculated, using PDA and PSA at different inoculation times (6 h; 12 h; 24 h; 48 h and 72 h). The incidence of the fungus through the blotter tests and the production of conidia were evaluated. The design was completely randomized (CRD) in a double factorial arrangement (medium and time) with levels of 5 and 2 of each factor, respectively, with 4 replications. The best response in the production of conidia was with PSA medium, at 48 h and 72 h.

Keywords: fungus, sporulation, incidence, PDA-PSA.

Alice Beatriz Peña-Medina

Doutorado em Fitossanidade, Mestrado em Agronegócios, Graduação em Agronomia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão

E-mail: ecilabeatriz@gmail.com

Mario Fernando Pinel-Alvarez

Doutorando em Fitossanidade, Mestrado em Fitossanidade, Graduação em Agronomia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão

E-mail: mariopinel.agro@gmail.com

Luiz Guilherme Lidoino de Carvalho

Graduando em Agronomia, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”
Instituição: Universidade Federal de Pelotas
E-mail: guilhermelidoino2000@gmail.com

Cândida Renata Jacobsen de Farias

Doutorado em Fitossanidade, Mestrado em Fitossanidade, Graduação em Agronomia
Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Endereço: Avenida Eliseu
Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão
E-mail: jacobsencandida@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium semitectum* caracteriza-se por ser necrotrófico e habitante natural do solo, considerado patogênico em sementes de soja por causar apodrecimento durante a germinação em laboratório ou em campo (HENNING; FRANÇA NETO, 1980) semelhante ao fungo *Phomopsis* spp. (HENNING, 2004).

O patógeno produz conídios fusiformes e multiseptados formados em micélio aéreo, em conidióforos ramificados, com estruturas semelhantes a uma meia lua quando observados sob microscopia de luz. Algumas espécies de *F. semitectum* frutificam estruturas de resistência chamadas clamidósporos (AGRIOS, 2005; GOULART, 2005, 2018; HAWA; SALLEH; LATIFFAH, 2010). O conhecimento das estruturas fúngicas vegetativas e reprodutivas é essencial para identificação de patógenos.

Para o cultivo deste microrganismo são utilizados meios de cultura necessários para o seu crescimento e reprodução. O meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) é o mais comum na rotina de fitopatologia, pois abrange a maioria dos fungos, sendo basicamente usado para isolamento e manutenção de culturas (inóculo). Outro meio semelhante é a batata-sacarose-agar (BSA), recomendado para induzir a esporulação de *Fusarium* spp. (ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, 2007).

Métodos de inoculação de patógenos associados às sementes podem contribuir ao desenvolvimento em diversos estudos de controle, patogenicidade, resistência da planta, produzir inóculo, entre outros (GALLI; PANIZZI; VIEIRA, 2007; HU et al., 2022; KLINGELFUSS; YORINORI; DESTRO, 2007; LAI et al., 2020; MIGLIORINI et al., 2017; LES et al., 2020; HERNÁNDEZ et al., 2020). Em condições ideais de umidade e temperatura, o tempo mínimo de contato das sementes com o patógeno é determinante

para garantir nas sementes os diferentes níveis de incidência (ALFENAS, A.C.; FERREIRA, 2007; ARAÚJO et al., 2006).

Os métodos de inoculação são necessários para produzir ou manter o inóculo e outras aplicações que requeiram concentrações suficientes de esporos. No entanto, muitos meios induzem apenas o desenvolvimento vegetativo do fungo, dificultando o trabalho que exige a parte reprodutiva.

Dessa forma, a inoculação pela técnica de contato de sementes com o fungo desenvolveu-se em meio de cultura com o objetivo de induzir a produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja, utilizando BDA e BSA em diferentes tempos de exposição ao patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia de Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPeI), Campus Capão de Leão, RS. O isolado de *F. semitectum* foi obtido da coleção in vitro do LPSFF, sendo preservado em meio BDA a 5 °C, e reativados em folhas de *Typha* sp. antes da instalação do ensaio.

O fungo patogênico *F. semitectum* foi cultivado a partir de fragmentos de 10 cm de folhas de *Typha* sp. dispostos verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada, posteriormente esterilizados em autoclave, os micélios dos isolados foram repicadas nas folhas. Após 14 dias de incubação, observou-se a produção de conídios e o patógeno foi repicado para placas Preti contendo meio de cultura, colocadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 h a 23±2 °C por 5 dias.

O genótipo de soja utilizado foi a cultivar Valente I, oriundo de uma área de produção de sementes, sendo colhida na safra de 2022 e logo enviado ao laboratório para seu controle de qualidade. As sementes foram submetidas a análise sanitária, física e fisiológica conforme recomendações para as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009a), previamente a condução do experimento. As sementes foram desinfestadas antes de serem inoculadas, com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos, enxaguadas com água estéril três vezes e secas sobre papel filtro em temperatura ambiente por 48 h.

Para a inoculação artificial das sementes primeiramente foi feita a repicagem do fungo para placas de Petri contendo os meios de cultura a serem testados: BSA e BDA (15-20 mL), separadamente. Em seguida, foram adicionados, 5 discos de 5mm do inoculo por placa. As placas foram armazenadas na sala de incubação por 5 dias a 23+2 oC e fotoperíodo de 12 h luz.

Passado o período de incubação, as sementes desinfestadas foram depositadas em camada única sob os diferentes meios contendo o fungo (método de contato com o patógeno em meio de cultura), 100 sementes/placa e, novamente incubadas por diferentes períodos 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h. As sementes foram retiradas das placas e colocadas para secar em papel filtro por 3 dias em temperatura ambiente.

Foram realizadas duas avaliações: incidência do *F. semitectum*, através do *Blotter* test conforme metodologia do MAPA (BRASIL, 2009a) e produção de conídios. Para verificar a produção dos conídios as sementes foram colocadas em um béquer com volume suficiente de água estéril para cobri-las por 2 horas. Para visualização das estruturas reprodutivas (conídios), lâminas microscópicas foram confeccionadas a partir da água de imersão das sementes. Os resultados foram expressos na presença e ausência de *F. semitectum*.

O experimento adotou o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial duplo (tempo e meio) com níveis de 5 e 2 de cada fator respectivamente, com 4 repetições. Os dados da produção de conídios, foram analisados pelo modelo linear generalizado (MLG) com regressão logística binomial, matriz de classificação e o teste de qui-quadrado (teste χ^2), usando programas estatísticos Excel e software RStudio (R version 4.2.2).

3 RESSULTADOS

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que os meios BDA e BSA, 12 h após a inoculação, apresentaram incidência de 97% e 100% de *F. semitectum*, respectivamente, mas nenhuma estrutura reprodutiva foi visualizada, ou seja, não houve produção de conídios apenas aumentou o crescimento do micélio que cobria todas as sementes.

Para avaliar a produção de conídios (presença e ausência), em função do meio e tempo de inoculação, o experimento avaliou 40 observações de lâminas com um microscópio. As variáveis explicativas ou independentes (meio e tempo) obtiveram um odds ratio $OR > 1$, detectando casos positivos (conídios de *F. semitectum*) conforme o tipo

de meio e quando se aumentou o tempo de inoculação. Os resultados deste teste qui-quadrado (X²) foram altamente significativos (p-value = <0,001) para ambos os preditores.

A matriz de classificação que avalia a discriminação das classes tais como verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso negativo (FN) e falso positivo (FP), os resultados do modelo foi de acordo com o tipo de meio (Tabela 1), mostrou que a melhor resposta foi o uso do meio BSA, detectando a estrutura reprodutiva do fungo (conídios) com a presença de 22,5% de VP, com uma sensibilidade a 50,0% e especificidade de 100,0%. A precisão teve um valor de 100,0% e uma acurácia de 73,0%.

Tabela 1 - Matriz de classificação que avalia o modelo em função do meio de cultura expressos em porcentagem.

Produção de conídios				
Conídios	Meio (tipo)			
	BDA		BSA	
	P	A	P	A
Positivo	0,0 ^{VP}	0,0 ^{FP}	22,5 ^{VP}	0,0 ^{FP}
Negativo	50,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	27,5 ^{FN}	50,0 ^{VN}
Totais	50,0	50,0	50,0	50,0

VP= Verdadeiros positivos; FN= Falsos negativos; FP= Falsos positivos e VN= Verdadeiros negativos; P= presença; A= ausência

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 2 - Matriz de classificação que avalia o modelo em função do tempo de inoculação, expressos em porcentagem.

Produção de conídios										
Conídios	Tempo (h)									
	6		12		24		48		72	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
Positivo	0,0 ^{VP}	0 ^{FP}	0 ^{VP}	0 ^{FP}	6 ^{VP}	0 ^{FP}	25 ^{VP}	0 ^{FP}	25 ^{VP}	0 ^{FP}
Negativo	50,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	50,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	46,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	25,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	25,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}
Totais	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

VP= Verdadeiros positivos; FN= Falsos negativos; FP= Falsos positivos e VN= Verdadeiros negativos; P= presença de conídios; A= ausência de conídios.

Fonte: Elaboração do autor.

Considerando a Tabela 2, verificam-se os resultados da matriz de classificação com base nos tempos de inoculação. A Figura 1 mostra os resultados do crescimento no meio BSA após 48 h de contato, alta produção de esporos de *F. semitectum* nas sementes, detectando

a presença de conídios com 25% de taxas positivas (VP), portanto, tem sensibilidade de 50% e uma especificidade de 100%. A precisão teve um valor de 100% e a métrica que representa acurácia foi maior a partir desse tempo com 75%.

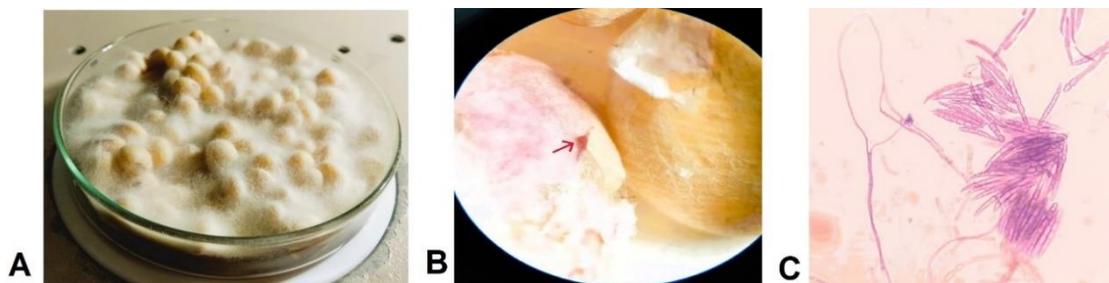


Figura 1. Inoculação de sementes (BSA): A Sementes inoculadas com *F. Semitectum*, B Massa Conidial e C conídios.

Fonte: Elaboração do autor.

4 DISCUSSÃO

O nível de incidência de *F. semitectum* foi confirmado no blotter test, sendo superior a 90% em apenas 12 h, o BDA e BSA, mas o patógeno não esporulou em nenhum dos tratamentos, apenas apresentou muito micélio que cobriu as sementes.

A produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja teve comportamento biológico diferenciado, dependendo do meio e tempo de inoculação a que foi submetida. Assim, a inoculação com meio BSA em 48 h de exposição foi favorável para a esporulação do fungo; entretanto, o BDA não apresentou conídios em nenhum dos tempos de inoculação, excluindo-o para estudo futuro.

De acordo com Silva e Teixeira (2012), a maior esporulação de *F. solani* ocorre quando cultivada em meio de cultura BDA seguida de meio BSA, mas em regime contínuo de luz. A presença de luz também favoreceu na produção de picnídios de *Diaporthe citri*, embora o meio utilizado tenha sido aveia-ágar (NOZAKI; CAMARGO; BARRETO, 2004). Entretanto, neste ensaio, o meio BDA não apresentou esporulação fúngica em fotoperíodo a 12 h.

Além disso, outros fungos fitopatogênicos tais como, *Alternaria solani* (LUKENS, 1963) e *Mycosphaerella fijensis* (HANADA; GASPAROTTO; PEREIRA, 2002) a ausência de luz favoreceu a produção de esporos, sendo este um foto-inibidor do crescimento micelial. De Mello et al. (2018), observaram que o crescimento micelial e a

produção de esporos foram indiferentes à presença e ausência de luz, só apresentaram esporulação quando combinada com estresse mecânico em *C. cassicola* em soja.

Estando as sementes por maior tempo em contato com o patógeno, influencia na quantidade do inóculo, indiferente aos patógenos estudados. À medida que o tempo aumenta é diretamente proporcional aos níveis de incidência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão (ARAÚJO et al., 2006), *C. cassicola* e (DE SOUSA, M. V.; SIQUEIRA; MACHADO, 2016b) e *S. sclerotiorum* (DE LOURDES BALLARIS et al., 2014; DA SILVA BOTELHO et al., 2015; DE FRANÇA et al., 2021; GRABICOSKI et al., 2015; HENNEBERG; GRABICOSKI; et al., 2012) em sementes de soja.

Diante do exposto torna-se necessário padronizar as condições de crescimento fúngico de acordo com o trabalho a ser realizado. Nesse estudo, uma das limitações para obtenção de produção em massa de conídios foi ajustar o tipo de meio e tempo adequado de inoculação.

5 CONCLUSÕES

A produção de conídios de *F. semitectum* em sementes de soja é induzida em meio BSA em 48 h após a inoculação.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, a Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. Nueva York: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F. A. Inoculação de Fungos fitopatônicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. (Org.). **Métodos em Fitopatol.** Editora UFV ed. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 117–137.
- ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da Temperatura

e do Tempo de Inoculação das Sementes de Algodão na Transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Autor para correspondência: Edson Ampélio Pozza. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000100006>

DE LOURDES BALLARIS, A.; DA CRUZ MACHADO, J.; DE CARVALHO, M. L. M.; CAVARIANI, C. Sequential sampling of soybean and beans seeds for sclerotinia sclerotiorum detection (Lib.) DeBary. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 295–304, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v36n3985>

DA SILVA BOTELHO, L.; BARROCAS, E. N.; DA CRUZ MACHADO, J.; DE SÁ MARTINS, R. Detection of Sclerotinia sclerotiorum in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 1, p. 55–62, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v37n1141460>

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

FRANÇA, S. K. S. D.; SIQUEIRA, C. D. S.; GUIMARÃES, M. D. R. F.; MACHADO, J. D. C. Quantification and conceptual validation of the inocupotential of sclerotinia sclerotiorum in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 43, p. 1–11, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v43236031>

MELLO, F. E. D.; SILVA, H. P. D.; CELESTINO, G. G.; LOPES, I. D. O. N.; BALBIPEÑA, M. I.; GODOY, C. V. Crescimento micelial radial e esporulação de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 4, p. 374–379, 2018. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/177612>

DE SOUSA, M. V.; SIQUEIRA, C. da S.; MACHADO, J. da C. Uso de PCR convencional para a detecção de *Corynespora cassiicola* em sementes de soja. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 2, p. 85–91, 1 abr. 2016. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n2152049>

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R. D. RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE SOJA À MORTE DE PLÂNTULAS CAUSADA POR COLLETOTRICHUM TRUNCATUM. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 163–165, jun. 2007. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v74p1632007>

GOULART, A. C. P. **Fungos em Semente de Soja - Detecção, Importância e Controle**. 2. ed. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018. v. 2. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/252202/1/LV20055.pdf>

_____. **Fungos em Sementes de Soja: Detecção, Importância e Controle**. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/252202/1/LV20055.pdf>

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M. L. C.; VRISMAN, C. M.; DABUL, A. N. G. Rapid PCR-based assay for Sclerotinia sclerotiorum detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 69–74, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0395>

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170–173, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000200008>

HAWA, M. M.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 273–284, 2010.

<http://www.academicjournals.org/AJB>

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; JACCOUD-FILHO; D.D.S.; PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600005>

HENNING, A. A. **Patologia e Tratamento de Sementes: Noções Gerais**. Londrina, PR: Embrapa Soja-CNPSo, Documentos, 235, 2004.

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/469530>

HENNING, A. A. .; FRANÇA NETO, J. de B. Problemas na avaliação da germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 9–22, 1980.

<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/444640>

HERNÁNDEZ, V. G.; ZABOT, G.; ALVAREZ, M. F. P.-.; ALVES, M.; ANTUNES, I. F.; FARIAS, C. R. J. de. Variabilidade patogênica de populações multiespóricas e monospóricas de *C. lindemuthianum* em plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) / Pathogenic variability of multispóric and monospóric isolates of *C. lindemuthianum* in common bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 88300–88315, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-303>

HU, X.; WANG, J.; LI, R.; WU, X.; GAO, X.; LI, M. Establishment of an Artificial Inoculation Method of *Ustilaginoidea virens* without Damaging the Rice Panicle Sheaths. **Plant Disease**, v. 106, n. 1, p. 289–296, 2022. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2746-RE>

KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 50–55, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000100007>

LAI, X.; QI, A.; LIU, Y.; MENDOZA, L.D.R.; LIU, Z.; LIN, Z.; KHAN, M.F. Evaluating inoculation methods to infect sugar beet with *Fusarium oxysporum* f. *Betae* and *F. Secorum*. **Plant Disease**, v. 104, n. 5, p. 1312–1317, 2020.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1895-RE>

LES, N.; HENNEBERG, L.; NADAL, V. G. R.; MULLER, M.; SZEMOCOWIAKI, A. G.; CARNEIRO, F. T.; FILHO, D. de S. J. Controle de *Rhizoctonia solani* com produtos biológicos no tratamento de sementes na cultura da soja/ Control of *Rhizoctonia solani* with biological products in the seed treatment in soybean. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 99919–99935, 2020. DOI:

10.34117/bjdv6n12-470. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-470>

LUKENS, R. J. Photo-Inhibition of Sporulation in *Alternaria Solani*. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 7, p. 720–724, 1963. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1963.tb12248.x>

MIGLIORINI, P.; DA ROSA DORNELES, K.; RODRIGUES, G. F.; DE PAULA PACIENCIA, G.; DE TUNES, L. V. M. Métodos de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão e danos em plântulas. 2017. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2017v30n1p37>

NOZAKI, M. de H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 429–432, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000400012>

SILVA, J. L. da; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@Mambiente on-Line**, v. 6, n. 1, p. 47, 2012.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. (Org.). . **Métodos em Fitopatol.** Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 23–50.

Artigo 2 – Journal of Seed Science

Tetrazólio detecção viabilidade

Uso do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio para detecção de viabilidade de *Fusarium semitectum* em sementes de soja

Alice Beatriz Peña Medina ¹ (0000-0002-0903-7403), Jorge Ramon Cantero Piñanez ² (0000-0002-2304-1396), Mario Fernando Pinel Alvarez ³ (0000-0003-4870-1001), Cândida Jacobsen de Farias ⁴* (0000-0002-3761-7165)

RESUMO: Técnicas colorimétricas como sais de tetrazólio e resazurina são indicadores de viabilidade (atividade respiratória) de fungos, bactérias e sementes amplamente utilizado em diferentes áreas de pesquisa. O objetivo foi desenvolver um protocolo com dois métodos, qualitativo e quantitativo, de triagem para detecção da viabilidade de *F. semitectum* em sementes de soja utilizando sal de tetrazólio (TCT). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial triplo (tempo, dose e potencial de inóculo) com níveis de 3, 5 e 5 de cada fator, respectivamente, com 3 repetições em ambos os métodos. Nas condições do ensaio, a sensibilidade foi mais satisfatória no tempo de 72 h, na concentração mínima de TCT de 0,1 mg. mL⁻¹ e o potencial de inóculo foi de 10⁻¹ a partir do método qualitativo. Por outro lado, não foi possível quantificar as UFC, não podendo ser comparado pela técnica de espectrofotometria, acredita-se que a própria biologia do fungo possa ter interferido no método. O uso do TCT possa ser utilizado na rotina do laboratório como método de triagem, a partir do método qualitativo, para detecção de *F. semitectum* em sementes de soja.

Termos para indexação: Técnicas colorimétricas, fitopatogênicos, viabilidade, TCT.

¹Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

²Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

³Área Bioinformática, Departamento de Experimentación, Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

⁴Centro de Investigaciones Médicas (CIM), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Este, UNE, Ciudad del Este, Paraguay.

* Autor para correspondência: jacobsencandida@gmail.com

ABSTRACT: Colorimetric techniques such as tetrazolium and resazurin salts are viability indicators (respiratory activity) of fungi, bacteria and seeds widely used in different areas of research. The objective of this work was to develop a screening protocol to detect the viability of *F. semitectum* in soybean seeds using tetrazolium salt (TTC). The objective was to develop a protocol with two screening methods, qualitative and quantitative, to detect the viability of *F. semitectum* in soybean seeds using tetrazolium salt (TCT). The experimental design used was completely randomized (DIC) in a triple factorial arrangement (time, dose, and inoculum potential) with levels of 3, 5, and 5 of each factor, respectively, with 3 replications in both methods. Under the assay conditions, the qualitative method showed more satisfactory sensitivity at 72 hours at the minimum TTC concentration of 0.1 mg. mL⁻¹ and the inoculum potential was 10⁻¹. On the other hand, it was not possible to quantify the CFU, and could not be compared using the spectrophotometry technique, it is believed that the biology of the fungus itself may have interfered in the method. The use of TCT can be used in the laboratory routine as a screening method, based on the qualitative approach, for the detection of *F. semitectum* in soybean seeds. On the other hand, it was not possible to quantify the CFU and could not be compared using the spectrophotometry technique, it is believed

that the biology of the fungus itself may have interfered in the method. The use of TTC can be used in the laboratory routine as a screening method, based on the qualitative method, for the detection of *F. semitectum* in soybean seeds.

Index terms: Colorimetric techniques, phytopathogens, viability, TTC.

Introdução

Um dos principais desafios do setor sementeiro é a produção de sementes de alta qualidade em condições climáticas tropicais e subtropicais. Dentre os fatores bióticos limitantes da produção de soja, as doenças causadas por fungos veiculados por sementes ocorrem com maior frequência, causando perdas qualitativas e quantitativas associadas à qualidade fisiológica e à produtividade, respectivamente (KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018; SEIXAS et al., 2020).

O correto diagnóstico de patógenos em sementes pode ser adotado como uma estratégia de controle preventivo dentro das medidas de manejo, pois evita sua introdução e disseminação no campo. Dessa forma, o teste de qualidade sanitária proporciona rastreabilidade tanto no sistema de quarentena quanto na produção de sementes certificadas (BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, 2018).

Dentre os métodos convencionais, o *Blotter test* se destaca por detectar inúmeros fungos e ser o teste padrão no comércio de sementes (BRASIL, 2009a; ISTA, 2023a). No entanto, apesar de ser um método eficiente exige conhecimento especializado em micologia, necessitando de mão de obra altamente qualificada e, ainda tempo para formação das estruturas reprodutivas para análise, limitando o número de amostras realizadas por dia. Métodos de triagem que detectem a viabilidade dos fungos

associados as sementes podem ser uma ferramenta viável para diminuir o número de amostras que serão encaminhadas ao blotter test e assim agilizar o fluxo de amostras no laboratório.

O advento das técnicas colorimétricas tem se desenvolvido em diversas áreas de pesquisa. Essa tecnologia, permite a análise rápida e simultânea de um grande volume de amostras, especialmente se ajustadas a um espectrofotômetro. Investigações realizadas em métodos colorimétricos com tetrazólio são amplamente utilizadas como marcadores da viabilidade celular de fungos, bactérias e sementes (ALONSO et al., 2017; CEN et al., 2018; GRELA; KOZŁOWSKA; GRABOWIECKA, 2018; ISHIKI et al., 2018; LALL et al., 2013; MELETIADIS et al., 2000, 2001; PEREIRA et al., 2019; STIEFEL et al., 2013; XU; MCCANNA; SIVAK, 2015).

O 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) é bastante utilizado no controle de qualidade de sementes de soja. Apesar de ser outra área de pesquisa, o princípio é o mesmo utilizado na ciência e tecnologia de sementes, formando uma reação de redução em células viáveis que formam um composto vermelho estável e não difusível chamado Trifenilformazan (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018; PEREIRA et al., 2019).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de triagem para detecção da viabilidade de *F. semitectum* em sementes de soja utilizando sal de tetrazólio (TCT).

Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia de Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPeI), Campus Capão de

Leão, RS. Para a condução dos estudos, foi utilizado sementes de soja inoculadas artificialmente com *F. semitectum*. A inoculação das sementes foi realizada utilizando meio BSA (Batata sacarose ágar). Sendo o contato das sementes com o fungo de 48 h, selecionado em estudo anterior.

Foram testados dois métodos para detecção da viabilidade de *F. semitectum* em sementes de soja a partir do TCT, um método qualitativo e um método quantitativo. Foram considerados o tempo de incubação das amostras, a concentração do TCT e concentração de inóculo para ambos os métodos.

Para extração do fungo foi realizado a imersão das sementes, subamostra de 200 sementes, água estéril. Para isso, as amostras foram acondicionadas em um recipiente de vidro hermético e estéril com água esterilizada, 2 cm acima do volume da camada superior de sementes. Os recipientes foram colocados sob agitação contínua na sala de incubação por 8 h a 23 °C, extraíndo-se uma subamostra (120 mL) e uma contra-amostra da suspensão do inóculo, descartando-se as sementes. O tempo escolhido para a incubação foi determinado com base em estudos realizados com *S. sclerotiorum* (GRABICOSKI et al., 2015; RAMIRO et al., 2019) e *Phomopsis* spp. (JACCOUD-FILHO et al., 2002; JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J.C.; YORINORI, 1996).

No controle negativo (C-) foi utilizado o líquido de extração a partir de sementes sadias selecionadas do *Blotter test* (5 dias), e como controle positivo (C+) o líquido de extração obtido de sementes inoculadas com *F. semitectum*, semeadas nos caldos BD (Batata dextrose) e BD com antibiótico nas concentrações de clorafenicol (0,025; 0,050; 0,075) mg. mL⁻¹, sendo seletivo no controle de bactérias. Os controles sem nenhuma adição do sal (TCT).

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 1,8 mL de caldo BD, posteriormente foram adicionadas diferentes concentrações de TCT (0.1; 0.5; 1.0; 5.0 e 10.0 mg. mL⁻¹) seguido da adição de uma alíquota 0,2 mL do líquido de extração (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵) separadamente. Os microtubos foram incubados a 25°C nos tempos 0 h, 48 h e 72 h, sendo acondicionados em agitadora e em escuro contínuo para posterior avaliação. A temperatura e o tempo de incubação foram determinados de acordo com o método descrito no documento padrão M38-A do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (LAGE et al., 2013; WAYNE, 2017) e (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2004; PUJOL et al., 1997) com algumas modificações para fungos filamentosos (*Fusarium* spp.).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial triplo (tempo, dose e inóculo) com níveis de 3, 5 e 5 de cada fator, respectivamente, com 3 repetições, para ambos os métodos. Os microtubos com os tratamentos foram utilizados para ambos os métodos qualitativo e quantitativo.

Para classificar os resultados do método qualitativo foram preditos dois casos diagnósticos (classes). Na qual, a variável dependente dicotômica (resposta), denominada reação colorimétrica, representou 1 caso com reação colorimétrica e 0 caso sem reação colorimétrica. As variáveis independentes (explicativas) foram relacionadas ao tempo de incubação e às doses de TCT.

A partir dos microtubos visualizados foram confirmados o crescimento do fungo, utilizando a técnica de semeadura *Pour-Plate* (derramamento na placa) do método clássico padrão e incubada em câmara em escuridão contínua e a 23 °C±2 por 5 dias. Os resultados binários são 0/1 (-/+), ou seja, presença/ausência de *F semitectum*.

Os resultados obtidos dos microtubos (método qualitativo) foram analisados pelo modelo de regressão logística binomial (função de ligação logit), matriz de

classificação (sensibilidade, especificidade, acurácia e precisão) e curva ROC (Característica de Operação do Receptor - *Relative Operating Characteristic*) (sensibilidade, especificidade e AUC: Área Sob a Curva - *Area Under the ROC Curve*). O qui-quadrado (χ^2) foi utilizada para verificar o nível de significância entre as variáveis explicativas. No método clássico padrão foram analisadas as placas com o modelo de regressão logística binomial e o nível de significância pelo teste do χ^2 .

Para o desenvolvimento de um método quantitativo de detecção de *F. semitectum* em sementes de soja a partir do uso do TCT foram avaliados a densidade ótica (DO) ou absorbância (A) e as unidades formadoras de colônia (UFC) seguindo a metodologia proposta para bactérias e fungos filamentosos por diferentes autores (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2004; STIEFEL et al., 2013; CERMEÑO; TORRES, 1998) adaptado para área agrícola.

A reta de calibração foi elaborada com 5 diluições seriadas da suspensão do inóculo de 10^{-1} a 10^{-5} em caldo BD (meio líquido) e o branco (mesma composição do caldo, sem inóculo). Cada uma dessas diluições seriadas, para posterior avaliação, foram primeiramente homogeneizadas por 30 minutos.

Os microtubos, contendo os tratamentos, formam quantificados indiretamente pela técnica de espectrofotometria, medindo-se a densidade ótica (DO) ou absorbância (A) em cubeta de espectrofotômetro (1,5 mL) a 550 nm. O valor de DO obtido foi expresso como a média dos valores observados em cada réplica.

Para verificar as UFC uma alíquota de 100 μ L foi semeada em uma placa de Petri vazia e, em seguida, o meio BDA foi vertido de acordo com o método clássico padrão da técnica de derramamento na placa (*Pour-Plate*) e incubado na câmara em escuridão contínua e a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 a 5 dias. As Unidades Formadoras de colônias (UFCs) nas

placas foram observadas quanto ao crescimento fúngico e os resultados expressos em UFC. mL⁻¹.

A variável dependente (resposta) foram os valores de DO produzido pelos fungos de cada microdiluição e a variável independente foram as UFC. mL⁻¹ das mesmas microdiluições quantificadas pelo método clássico (placas).

No método quantitativo os dados (UFC. mL⁻¹ e DO) foram submetidos à análise de regressão linear simples e ajustados a uma equação de regressão. A análise de variância (ANOVA) do modelo (entre as médias do grupo) foi realizada por meio do teste Fisher (com nível de significância, 0,05). O modelo e a variável resposta foi estimado com o coeficiente de determinação (R²).

Resultados

Foram avaliadas 225 observações em microtubos, para detectar a reação de redução do TCT, também denominado Trifenilformazan, na biomassa do fungo sendo determinado pela capacidade do método em detectar a mudança de cor para vermelho (micélio colorido) pois indica a viabilidade do inóculo de *F. semitectum* (Figura 1).

Para confirmar a viabilidade deste marcador colorimétrico foram visualizados controles com e sem crescimento fúngico, além da cor natural do micélio (C+) utilizando tempos de incubação e potenciais de inóculo sem TCT em microtubos e placas (Tabela 1). A adição do antibiótico cloranfenicol não teve efeito na reação dos casos positivos testados com a maior concentração de inóculo (controles) (Tabela 2).

No modelo de regressão logística binária do método qualitativo, observou-se que a variável explicativa ou independente (dose-TCT) tem uma razão de chances (*odds ratio*-OR) OR<1, indicando relações negativas com casos positivos, com o aumento da

dose houve uma redução na visualização da biomassa do fungo, embora os resultados não tenham sido significativos (p -value = n.s.).

Ao contrário, o tempo de incubação e o potencial de inóculo (variáveis explicativas) apresentam $OR > 1$, que indicam relações positivas com casos positivos. Portanto, as chances de um diagnóstico positivo são maiores quando se aumentam o tempo e inóculo, caso contrário, com a dose. Os resultados deste teste qui-quadrado (χ^2) foram estatisticamente altamente significativos (p -value = $< 0,001$) para ambos os preditores (tempo e inóculo).

Enquanto o método clássico padrão, $OR < 1$, indicou relações negativas de diagnóstico positivo na variável TCT, isso se deve ao fato de que as doses maiores reduzem consideravelmente os casos positivos. Este fato foi comprovado pelo padrão, dando resultados estatisticamente significativos χ^2 com p -value = $< 0,001$. A variável tempo tem $OR > 1$, isto indica relações positivas de diagnóstico positivo nos casos, e os resultados apresentam-se estatisticamente significativos (χ^2) com p -value = $< 0,01$, pois houve crescimento do fungo em quase todos os microtubos que foram semeados em placas.

Uma análise de curva ROC foi realizada com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade das predições do modelo testado em relação à variável resposta (dependente). Um total de 225 observações foram avaliadas, sendo 152 casos positivos e 73 casos não positivos. Note-se que a área sob a curva (AUC, medida discriminante) para o modelo foi $AUC = 0,957$, superior a 90% (uma capacidade preditiva quase perfeita).

A matriz de classificação que avalia a discriminação das classes tais como verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso negativo (FN) e falso positivo

(FP), os dados do teste foram definidos em função dos tempos 0, 48 e 72 horas de incubação em microtubos (Figura 2) (Tabela 3). O tempo 72 h teve melhor resposta, detectando corretamente 33,0% dos casos com a reação redução de TCT, resultando em uma sensibilidade de 65,0%, ou seja, uma proporção de VP. O número de casos corretamente detectados como sem reação de redução de TCT foi de 50,0% (VN), sendo também conhecida a proporção de VN como especificidade, teve um valor de 100,0%. A precisão apresentou um valor de 100,0%. Assim, a acurácia do modelo, métrica que representa a taxa (ou proporção) de acertos sobre o total, foi de 83,0%.

Os resultados da matriz de classificação em função das concentrações de TCT (Tabela 4) percebe-se que a reação de redução (micélios coloridos) varia de 0,1 a 1,0 (mg. mL⁻¹) nas concentrações de TCT, sendo maior em 0,5 com 27,0% (VP). Quando a dose aumenta em 5,0 mg. mL⁻¹ de TCT, há uma tendência de relação inversa de VP. Consequentemente, o maior percentual de sensibilidade foi de 62,0% em relação à proporção de VP corretamente preditos na dose 0,5 mg. mL⁻¹; e a métrica que representa a acurácia foi maior nesta concentração com 77,0%. A maior especificidade dos casos de VN foi de 96% e sua precisão foi superior às demais doses (1,0), sendo de 90%.

Os potenciais de inóculo representados em uma matriz de classificação determinam que quando as concentrações são muito diluídas, a sensibilidade diminui e os VP são menores que os FN (Tabela 5). Apenas aumentando a sensibilidade em 50,0% nos casos de VP (23,0%) com maior potencial de inóculo (10⁻¹). A especificidade ou taxa de verdadeiro negativo (VN) apresentou valor de 94,0%, acurácia de 73,0% e precisão de 88,0% neste potencial de inóculo.

Quando visualiza-se a reação de redução de TCT do tempo 0 h (Tabela 3), o inóculo não mudou de cor mesmo com sal, ficando 0,0% VP, caso contrário com alto valor de FN (50,0%) e originando uma sensibilidade de 0,0%. Isso se deve ao fato de que durante esse tempo o trifenilformazan não é produzido e para que ocorra a reação deve haver uma atividade biológica do fungo colocado em contato com o TCT por um período mínimo.

No método quantitativo, estudo II, determinado pelo método clássico padrão e espectrofotometria, UFC. mL⁻¹ e DO, respectivamente, não puderam ser analisados estatisticamente. A contagem de placas foi observada em função dos tempos 0, 48 e 72 horas de incubação em caldo nutritivo, concentrações de TCT, potenciais de inóculo e seus controles, tanto positivo (C+) quanto negativo (C-) (Tabelas 6, 7 e 8). Uma das limitações do método quantitativo, entre outros fatores, foi a dificuldade em padronizar as condições ideais de inoculação das sementes para concentrações de inóculo suficientes e a busca por maior porcentagem de sementes de soja sadias.

Discussão

Neste estudo, o método de triagem qualitativa foi desenvolvido como um protocolo rápido para detectar a viabilidade do fungo *F. semitectum*, com TCT, a partir de uma suspensão de amostra extraída de sementes. O Ensaio-TCT caracteriza-se por ser um método indireto eficiente e de baixo custo na detecção do fungo baseado na redução do sal de tetrazólio a trifenilformazan, como uma medida confiável de inspeção visual pela mudança de cor.

Considerando as condições do ensaio, a sensibilidade do método foi influenciada pela detecção da mudança de cor para vermelho (micélio colorido) em cada microtubo,

sendo o mais satisfatório o tempo (72 h) na concentração de TCT de 0,5 mg. mL⁻¹ e o potencial de inóculo foi de 10⁻¹ (Figura 3). A temperatura e o tempo de incubação dentro da faixa proposta pelo protocolo CLSI e outros autores foram tomados como referência (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2004; LAGE et al., 2013; PUJOL et al., 1997; WAYNE, 2017). No entanto, as mudanças nas condições de incubação foram adaptadas à rotina do laboratório de patologia de sementes (instalações e equipamentos).

Investigações realizadas por Vallejo et al. (2010) compararam dois tipos de sais, 2-(4-iodofenil)-3-(4-dinitrofenil)-5-fenil-tetrazolium cloreto (INT) e XTT, o INT apresentou formazan insolúvel e dificuldade de leitura, enquanto XTT observaram rápida redução (12 h) e solubilidade do sal. Neste experimento, a redução do TCT foi após 48 h em *F. semitectum*, considerando que a atividade biológica em bactérias é maior que em fungos.

Resultados em micologia clínica foram relatados por Levitz e Diamond (1985), em colorimetria, referindo-se à existência de uma relação linear entre inóculo e redução de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazolium brometo (MTT) de fungos filamentosos, mostrando >99,0% de viabilidade de hifas coloridas em vermelho de *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus oryzae* em comparação com 0,0% de hifas mortas. Isso explica que, à medida que a biomassa fúngica (micélio colorido) aumenta, o MTT e o 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) também são reduzidos nas hifas viáveis (FREIMOSER et al., 1999; LEVITZ; DIAMOND, 1985; LEWIS; WIEDERHOLD; KLEPSEK, 2005).

O Estudo demonstrou que MTT em concentrações de 0,125 mg/ml e abaixo não teve efeito sobre o crescimento fúngico, enquanto altas concentrações (>0,125 mg/ml)

de sal são tóxicas para *Scedosporium* spp. e *Fusarium* spp., apresentando níveis de citotoxicidade na biomassa fúngica (MELETIADIS et al., 2000).

Os resultados do experimento diferem com a concentração de referência (MTT), o TCT na concentração de 5,0 mg. mL⁻¹ observou que o crescimento foi inibido, indicando redução nos casos positivos (micélio corado). Vale ressaltar que a composição e o peso molecular do TCT são de diferentes tipos de sais, assim como a temperatura de incubação do método-MTT (48 h a 37 °C). Além disso, o tempo não influencia na sobrevivência, mas a aplicação de doses excessivas ao longo do tempo favorece o efeito da reação do tetrazólio, causando retardo do crescimento ou morte fisiológica.

A citotoxicidade em algumas bactérias dos sais de tetrazólio como INT, XTT e 5-ciano-2, 3-ditolil tetrazolium cloreto (CTC) tem sido reportado que na concentração recomendada, foi evidenciado um efeito negativo na densidade microbiana (BENSAID; THIERIE; PENNINGCKX, 2000; HATZINGER et al., 2003; MCCLUSKEY; QUINN; MCGRATH, 2005).

Os resultados do estudo II (método quantitativo) não seguem os critérios de aceitação descritos no método de contagem por protocolos internacionais, diluições na faixa de 30-300 (APHA, 1992) e 25-250 (COLLINS; LYNE, 1989) colônias por placa. Resultados inferiores a estes foram encontrados neste experimento durante o crescimento de UFC em placas, pois para maior precisão, são contadas apenas as placas com o número de colônias de referência nos protocolos.

O número de colônias ou células viáveis crescendo no meio foi contado pelo método clássico (*Pour-Plate*) para verificar a concentração inicial do inóculo. As dificuldades de contagem estão frequentemente relacionadas à fisiologia e morfologia

vegetativa e reprodutiva do gênero *Fusarium* (LAGE et al., 2013), além disso, a natureza filamentosa limita a formação de colônias para a quantificação da biomassa.

Neste estudo é apresentado como um método indireto para detectar a viabilidade fúngica e que pode ser extrapolado para outras culturas e patógenos. O tetrazólio é um reagente bastante estudado e utilizado em diversas investigações, o que aumenta o impacto no seu desenvolvimento como técnicas colorimétricas para detecção de viabilidade por espectrofotometria. Estudo relatado por Vallejo et al. (2010) indicam que a redução de sal é sensível a fatores tais como temperatura, tempo de incubação, pH do meio, tipo de microrganismo e concentração do sal.

Conclusões

Método de detecção utilizando 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) como teste de triagem para detectar a viabilidade de *F. semitectum* em sementes torna-se viável nas condições em que o estudo foi conduzido.

O tempo, a concentração e o potencial de inóculo interferem diretamente no resultado. Sendo o mais satisfatório o tempo (72 h), a uma concentração de TCT de 0,5 mg. mL⁻¹ e, o potencial de inóculo foi de 10⁻¹.

No método quantitativo não foi possível obter resultados satisfatórios. Sendo necessário ajustar a UFC. mL⁻¹ e DO do fungo.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, a Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

ALONSO, B.; CRUCES, R.; PÉREZ, A.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; GUEMBE, M. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, v. 139, p. 135–137, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.004>

APHA. COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. ed. Washington (USA): American Public Health Association, 1992. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>

BENSAID, A.; THIERIE, J.; PENNINCKX, M. The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. *Journal of Microbiological Methods*, v. 40, n. 3, p. 255–263, 1 maio 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701200001305>>. Acesso em: 21 fev. 2023. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00130-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00130-5)

BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L. Parte III Controle de doenças: 14. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org.). . Man. Fitopatol. 5. ed. ed. Ouro Fino: Agronômica CERES, 2018. p. 215–227.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes>

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal activity of amphotericin B and itraconazole against filamentous fungi: Comparison of the sensititre yeast one® and NCCLS M38-A reference methods. *Journal of Chemotherapy*, v. 16, n. 5, 2004. <https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.5.468>

CERMEÑO, J.; TORRES, J. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 155-7.

CEN, Y. K.; LIN, J. G.; WANG, J. Y.; LIU, Z. Q.; ZHENG, Y. G. Colorimetric assay for active biomass quantification of *Fusarium fujikuroi*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 155, n. November, p. 37–41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.009>

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. *Metodos microbiologicos*. 5. ed. Zaragoza: ACRIBIA, 1989.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina, PR: Embrapa, 2018. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193315/1/Doc-406-OL.pdf>

FFREIMOSER F.M.; JAKOB C.A.; AEBI M.; TUOR U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, 1999. <https://doi.org/10.1128/aem.65.8.3727-3729.1999>

GRABICOSKI, E. M. G.; FILHO, D. S. J.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M.L.C.; VRISMAN, M.C.;
DABUL, A.N.G. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. *Scientia Agricola*, v. 72, n. 1, p. 69–74, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0395>

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*. 1 maio 2018: Elsevier GmbH.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>

HATZINGER, P. B. et al. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 52, n. 1, p. 47–58, 2003.

ISHIKI, K.; NGUYEN, Q. D; MORISHITA, A; NAGAOKA, T. Electrochemical Detection of Viable Bacterial Cells Using a Tetrazolium Salt. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 18, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02404>

ISTA. International Seed Testing Association. Seed health testing. In: *International Rules for Seed Testing*. Int. Seed Test. Assoc. Zürichstr: ISTA, 2023. p. 7-1-7–6.

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

JACCOUD FILHO, D. S.; LEE, D.; REEVES, J.C.; YORINORI, J. T. A PCR-based test for detection of *Phomopsis phaseoli* f. sp. *Meridionalis* from soya bean seeds. In: HUTCHINS, J.D; REEVES, J. C. (Org.). . 2nd ISTA - PDC Symp. SEED Heal. Test. Towar. 21ST CENTURY. Cambridge: CAB International, 1996. p. 35.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. D. B.; HENNING, A. A. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. *Circular técnica*, v. 136, n. 1, p. 1–24, 2018.
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/177391/1/CT136-online.pdf>

LAGE, L.; PANIZO, M. M.; FERRARA, G.; REVIKINA, V. Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género *Fusarium*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, v. 33, n. 1, p. 46–52, 2013.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100010&lng=es&nrm=iso

LALL, N.; HENLEY-SMITH, C.J.; CANHA, M.N.; OOSTHUIZEN, C.B.; BERRINGTON, D. Viability Reagent , PrestoBlue , in Comparison with Other Available Reagents , Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/420601>

LEVITZ, S. M.; DIAMOND, R. D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *Journal of Infectious Diseases*, v. 152, n. 5, 1985. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.5.938>

LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; KLEPSE, M. E. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 3, p. 945–951, 2005. <https://doi.org/10.1128/aac.49.3.945-951.2005>

MCCLUSKEY, C.; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microbial Ecology*, v. 49, n. 3, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0012-z>

MELETIADIS, J.; MEIS, J.F.; MOUTON, J.W.; DONNELLY, J.P.; VERWEIJ, P.E. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 8, p. 2949–2954, 2000. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.8.2949-2954.2000>

MELETIADIS, J.; MOUTON, J.W.; MEIS, J.F.; BOUMAN, B.A.; DONNELLY, P.J.; VERWEIJ, P.E.; EUROFUNG, R.†. Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide}, for antifung. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 12, p. 4256–4263, 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4256-4263.2001>

PEREIRA, D.F.; BUGATTI, P.H. LOPES, F.M.; SOUZA, A.L.; SAITO, P.T. Contributing to agriculture by using soybean seed data from the tetrazolium test. *Data in Brief*, v. 23, p. 103652, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.12.090>

PUJOL, I.; GUARRO, J.; SALA, J.; RIBA, M. D. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 4, 1997. <https://doi.org/10.1128/aac.41.4.808>

RAMIRO, J.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; CALDAS, D. G. G.; MORAES, M. H. D.; BARBIERI, M. C. G.; PEREIRA, W. V.; MASSOLA, N. S. Quick and accurate detection of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phomopsis* spp. in soybean seeds using qPCR and seed-soaking method. *Journal of Phytopathology*, v. 167, n. 5, p. 273–282, 2019. <https://doi.org/10.1111/jph.12796>

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; Balbinot Junior, A.A; Krzyzanowski, F.C.; Leite, R.M.V.B. de C. Tecnologias de Produção de Soja. 1ª edição ed. Paraná: Londrina : Embrapa Soja, 2020. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/223209/1/SP-17-2020-online-1.pdf>

STIEFEL, S.; GUMIY, D.; CANALIS, M.; SIROSKI, P.; PICCO, E.; ORTEGA, H.; FORMENTINI, E. Desarrollo de un método colorimétrico en microplaca para determinar la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*. FAVE Sección Ciencias Veterinarias, v. 12, n. 1–2, p. 131–42, 2013. <https://doi.org/10.14409/favecv.v12i1/2.4551>

VALLEJO, E.; YANINE, H.; AUGUSTO, F. Aplicación De Sales De Tetrazolio De Nueva Generación (Xtt) Para La Estimación Del Número Más Probable. Acta Biológica Colombiana, v. 15, n. 3, p. 75–90, 2010. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027886006.pdf>>.

WAYNE, P. A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - 3th ed. CLSI standard M38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), v. 37, n. 15, p. 1–49, 2017. Disponível em: <https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf>.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 71, p. 1–7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.003>

Tabela 1 - Resultados dos controles sem concentração de TCT no Estudo I em função dos tempos incubação e microdiluições seriadas do inóculo observadas em microtubos e placas de Petri

Tempos	Controles					
	C+			C-		
	0 h	48 h	72 h	0 h	48 h	72 h
Inóculos	Microtubos					
10^{-5}	Turvo	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus
10^{-4}	Turvo	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus
10^{-3}	Turvo	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus
10^{-2}	Turvo	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus
10^{-1}	Turvo	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus
Inóculos	Placas					
10^{-5}	Aus	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
10^{-4}	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
10^{-3}	Aus	Aus	Pres	Aus	Aus	Aus
10^{-2}	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
10^{-1}	Aus	Aus	Pres	Aus	Aus	Aus

Pres: Presença do fungo, Aus: Ausência do fungo, C+: Controle positivo, C-: Controle negativo.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 2 - Resultados dos controles sem concentração de TCT e uso de cloranfenicol no Estudo I em função dos tempos incubação e microdiluição de inóculo (10^{-1}) observados em microtubos e placas de Petri

Tempos	Controles									
	Microtubos					Placas				
	C+					C-				
	Sem	Cloranfenicol			C-	Sem	Cloranfenicol			C-
25		50	75	25			50	75		
0 h	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Aus	Pres	Pres	Pres	Pres	Aus
48 h	Pres	Pres	Pres	Pres	Aus	Pres	Pres	Pres	Pres	Aus
72 h	Pres	Pres	Pres	Pres	Aus	Pres	Pres	Pres	Pres	Aus

Pres: Presença do fungo, Aus: Ausência do fungo, C+: Controle positivo, C-: Controle negativo As concentrações de cloranfenicol (0,025; 0,050; 0,075) mg. mL⁻¹, que representam em mg. L⁻¹ (25, 50, 75).

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 3 - Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função dos tempos de incubação expressos em porcentagem

Método qualitativo em microtubos						
Reagente	Tempo (h)					
	0 h		48 h		72 h	
	P	A	P	A	P	A
Positivo	0,0 ^{VP}	0,0 ^{FP}	16,0 ^{VP}	11,0 ^{FP}	33,0 ^{VP}	0,0 ^{FP}
Negativo	50,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	23,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	17,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}
Totais	50,0	50,0	39,0	61,0	50,0	53,0

VP= Verdadeiros positivos; FN= Falsos negativos; FP= Falsos positivos e
VN= Verdadeiros negativos; P= presença do fungo; A= ausência do fungo.
Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 4 - Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função das concentrações do sal expressos em porcentagem

Método qualitativo em microtubos										
Reagente	Doses (mg. mL ⁻¹)									
	0,1		0,5		1,0		5,0		10,0	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
Positivo	23,0 ^{VP}	10,0 ^{FP}	27,0 ^{VP}	7,0 ^{FP}	21,0 ^{VP}	2,0 ^{FP}	3,0 ^{VP}	0,0 ^{FP}	3,0 ^{VP}	0,0 ^{FP}
Negativo	17,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	17,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	27,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	47,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	47,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}
Totais	40,0	60,0	43,0	57,0	48,0	52,0	50,0	50,0	50,0	50,0

VP= Verdadeiros positivos; FN= Falsos negativos; FP= Falsos positivos e
VN= Verdadeiros negativos; P= presença do fungo; A= ausência do fungo.
Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 5 - Matriz de classificação que detecta a reação de TCT em *F. semitectum* em função dos potenciais de inóculo expressos em porcentagem

Método qualitativo em microtubos										
Reagente	Microdiluições seriadas (Inoculo)									
	10 ⁻⁵		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻²		10 ⁻¹	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
Positivo	8,0 ^{VP}	7,0 ^{FP}	17,0 ^{VP}	2,0 ^{FP}	13,0 ^{VP}	3,0 ^{FP}	17,0 ^{VP}	3,0 ^{FP}	23,0 ^{VP}	3,0 ^{FP}
Negativo	36,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	31,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	33,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	30,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}	23,0 ^{FN}	50,0 ^{VN}
Totais	43,0	57,0	48,0	52,0	47,0	53,0	47,0	53,0	47,0	53,0

VP= Verdadeiros positivos; FN= Falsos negativos; FP= Falsos positivos e
VN= Verdadeiros negativos; P= presença do fungo; A= ausência do fungo.
Fonte: Elaboração do autor.

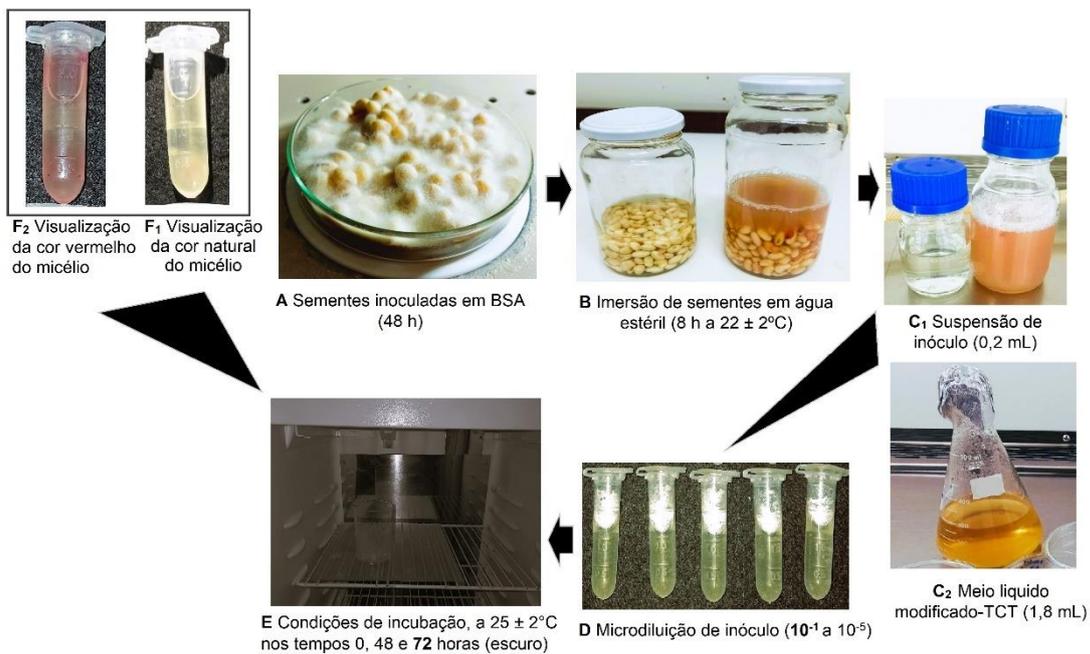


Figura 1 - Fluxograma do protocolo: Desenvolvimento do método colorimétrico qualitativo. Fonte: Elaboração do autor.

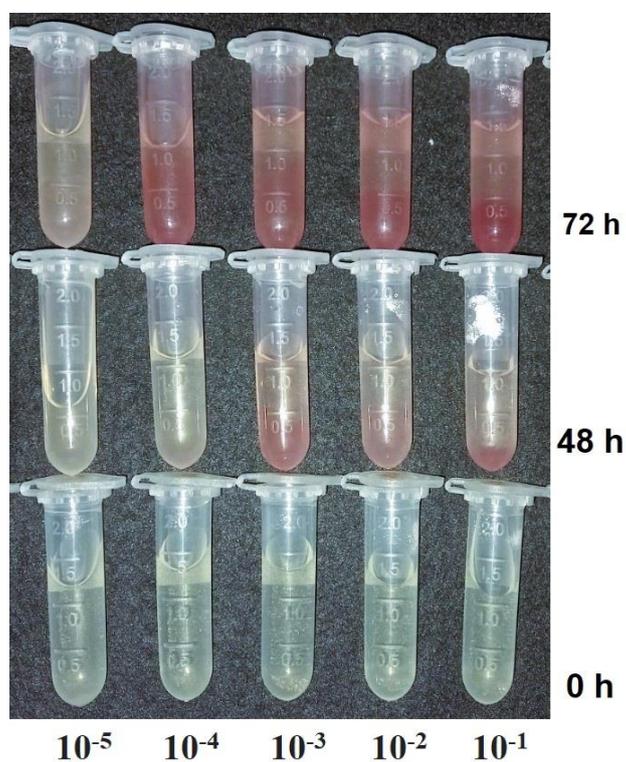


Figura 2 - Teste triagem com TCT em função das microdiluições seriadas dos inóculos e dos Tempos de incubação observadas em microtubos na dose $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Fonte: Elaboração do autor.

```
#Bibliotecas a utilizar
library(pROC)

#carga de dados
tabla <- read.csv('data_2.csv', sep=';')

head(tabla)

# Construção do modelo
modelo <- glm(test_binary ~ Tempo + Tetrazolio + Potencial de inóculo, data = tabla,
family =
'binomial')
summary(modelo)
exp(coef(modelo))

#Avaliação estatística
anova(modelo, test='Chisq')

#análise com kruskal-wallis
roc(tabla$test_binary, modelo$fitted.values, plot = TRUE, legacy.axes = TRUE,
percent = F, xlab = '1 - Especificidade',
ylab = 'Sensibilidade', col = '#377eb8', lwd = 2,
print.auc = TRUE)
roc_info <- roc(tabla$test_binary, modelo$fitted.values, legacy.axes = TRUE)
roc_info

#verificação
# Construção do modelo
modelo1 <- glm(Verification ~ Tempo + Tetrazolio + Potencial de inóculo, data = tabla,
family =
'binomial')
summary(modelo1)
exp(coef(modelo1))

#Avaliação estatística
anova(modelo1, test='Chisq')
```

4. Considerações Finais

A partir da pesquisa preliminar da inoculação de sementes, para a condução dos estudos foi utilizado lotes de soja inoculados artificialmente com *F. semitectum*, sendo o meio BSA e o tempo de 48 h (contato das sementes com o fungo) selecionado em estudos posteriores.

No estudo do método qualitativo, o uso de TCT como teste triagem para detectar a viabilidade de *F. semitectum* em sementes, torna-se viável seu desenvolvimento, nas condições em que o estudo foi conduzido. Enquanto, no estudo do método quantitativo, não foi possível obter resultados satisfatórios para o desenvolvimento por espectrofotometria.

O tetrazólio é um reagente bastante estudado e utilizado em diversas investigações, aumentando o impacto para o desenvolvimento. O TCT não é um método que possa substituir o teste padrão (*Blotter test*), mas sim complementá-lo como um processo de tomada de decisão para realizar ou não um lote para análise sanitária. No entanto faz-se necessário testar com outros patógenos e extrapolar para potenciais de inoculo com menor incidência direta nas sementes, pois aqui testou-se microdiluições seriadas.

5. Referências Gerais

- ALONSO, B. et al. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v. 139, p. 135–137, 1 ago. 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.004>. Acesso em: 5 jun. 2023.
- BERGAMIM FILHO, A. .; AMORIM, L. Parte III Controle de doenças: 14. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Org.). . **Man. Fitopatol.** 5. ed. ed. Ouro Fino: Agronômica CERES, 2018. p. 215–227.
- BOMMER, M.; WARD, J. M. Micromolar colorimetric detection of 2-hydroxy ketones with the water-soluble tetrazolium WST-1. **Analytical Biochemistry**, v. 493, p. 8–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.09.012>>.
- BOTELHO, L. da S. et al. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 1, p. 55–62, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v37n1141460>>.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROSTAT: Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro.** Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>.

CEN, Y. K. et al. Colorimetric assay for active biomass quantification of *Fusarium fujikuroi*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 155, n. November, p. 37–41, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.009>>.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. grãos Safra 2018/19 - Décimo segundo levantamento, Brasília**, v. 6, n. 12, p. 1–104, setembro, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. grãos Safra 2019/20 - Décimo segundo levantamento, Brasília**, v. 10, n. 12, p. 1–68, setembro, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra brasileira de grãos Safra 2020/21- Décimo segundo levantamento, Brasília**, v. 88, n. 12, p. 1–97, setembro, 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra brasileira de grãos Safra 2021/22 - Décimo segundo levantamento, Brasília**, v. 9, n. 12, p. 1–88, setembro, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra brasileira de grãos Safra 2022/23- Oitavo levantamento**, v. 10, n. 8, p. 1–106, maio, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

DE FRANÇA, S. K. S. et al. Quantification and conceptual validation of the inocupotential of sclerotinia sclerotiorum in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 43, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v43236031>>.

DE SOUSA, M. V.; SIQUEIRA, C. da S.; MACHADO, J. da C. Uso de PCR convencional para a detecção de *Corynespora cassicola* em sementes de soja. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 2, p. 85–91, 1 abr. 2016.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 163–165, jun. 2007.

GOODWIN, C. J. et al. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. **Journal of Immunological Methods**, v. 179, n. 1, p. 95–103, jan. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175994002774>>.

GOULART, A. C. P. **Fungos em Semente de Soja - Detecção, Importância e Controle**. 2. ed. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018. v. 2.

GRABICOSKI, E. M. G. et al. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 69–74, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0395>>.

HENNEBERG, L. et al. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de

soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600005>>.

HENNING, A. A. **Guia Prática Para Identificar Los Hongos Más Frecuentes En Semillas De Soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

JAHN, B.; STÜBEN, A.; BHAKDI, S. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: Comparison of menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide and Alamar Blue tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2039–2041, 1996. Disponível em: <[doi:10.1128/JCM.34.8.2039-2041.1996](https://doi.org/10.1128/JCM.34.8.2039-2041.1996)>.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. D. B.; HENNING, A. A. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. **Circular técnica**, v. 136, n. 1, p. 1–24, 2018.

MONTORO, E. et al. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 500–505, abr. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dki023>>.

PEREIRA, D. F. et al. Contributing to agriculture by using soybean seed data from the tetrazolium test. **Data in Brief**, v. 23, p. 103652, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.12.090>>.

PUJOL, I. et al. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2618–2621, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2618-2621.2002%0A>>.

RAMIRO, J. et al. Quick and accurate detection of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phomopsis* spp. in soybean seeds using qPCR and seed-soaking method. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 5, p. 273–282, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jph.12796>>.

SAJEESH, P. K.; RAO, M. S. L.; JAHAGIRDAR, S. Molecular detection, transmission and histopathological studies of seed-borne fungal infection of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Bioscan**, v. 9, n. 1, Suppl., p. 247–251, 2014. Disponível em: <[http://www.thebioscan.in/Journal Supplement/91Sup03 P. K. SAJEESH_2586.pdf](http://www.thebioscan.in/Journal%20Supplement/91Sup03%20P.%20K.%20SAJEESH_2586.pdf)>.

SEIXAS, C. D. S. et al. **Tecnologias de Produção de Soja**. 1ª edição ed. Paraná: Londrina: Embrapa Soja, 2020. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/223209/1/SP-17-2020-online-1.pdf>>.

STOCKERT, J. C. et al. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159–167, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>>.

SUTHERLAND, E. D.; COHEN, S. D. Evaluation of Tetrazolium Bromide as a Vital Stain for Fungal Oospores. **Phytopathology**, v. 73, n. 11, p. 1532–1535, 1983. Disponível em:

<https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Abstracts/Phyto73_1532.htm>.

TSUKATANI, T. et al. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 109–116, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.016>>.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E. M. Avaliação de métodos para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 4, p. 464–469, 2004. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/265235499%0A>>.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E. M. F. Desenvolvimento de iniciadores para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 161–169, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000200011>>.

ANEXO A– Código em RStudio

Ensaio A

```
### Scripts Regressão logística binomial
```

```
#Carregar o pacote que serão usados
```

```
library(pROC)
```

```
#Carregar os dados
```

```
tabla <- read.csv('data.csv')
```

```
head(tabla)
```

```
#Construção do modelo
```

```
modelo <- glm(test_binary ~ Tempo + meio, data = tabla, family = 'binomial')
```

```
summary(modelo)
```

```
exp(coef(modelo))
```

```
#Avaliação estatística
```

```
anova(modelo, test='Chisq')
```

ANEXO B– Curva ROC e AUC do método qualitativo

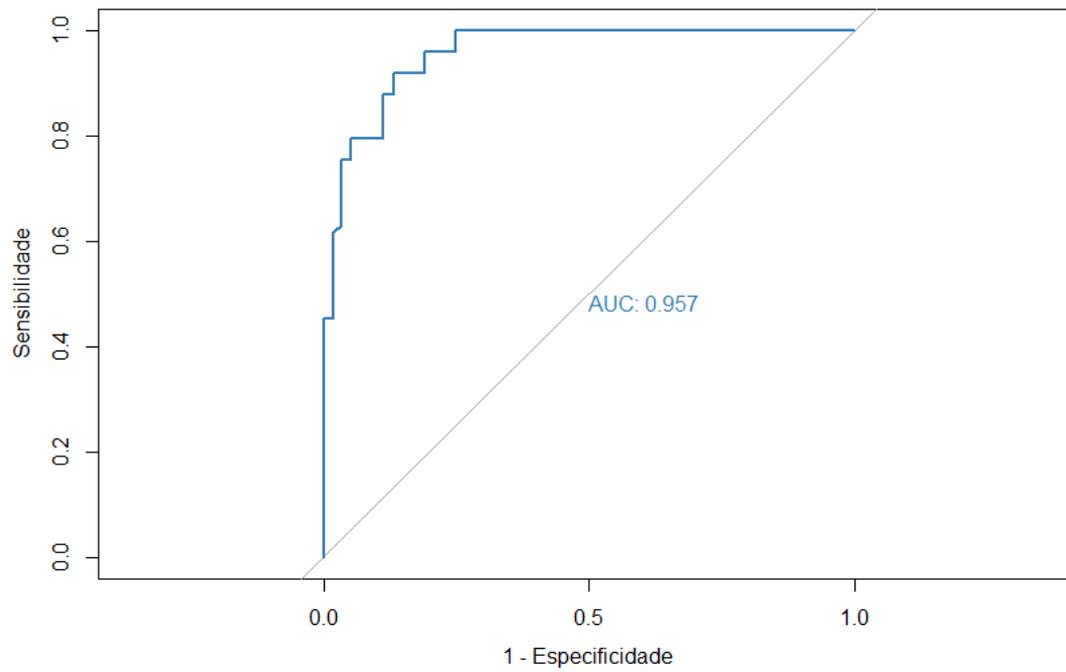


Figura 3 - Curva ROC e AUC conforme predição do método qualitativo do modelo em microtubos, AUC=0,957.

Fonte: Elaboração do autor.

ANEXO C– Resultados do Método quantitativo

Tabela 6 - Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 0 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA

Diluição seriada	0 h						
	Doses (mg. mL ⁻¹)					Controles	
	0,1	0,5	1,10	5,0	10,0	C+	C-
10⁻¹	ND	ND	INC	INC	INC	ND	Aus
10⁻²	INC	ND	ND	ND	ND	ND	Aus
10⁻³	ND	ND	INC	INC	INC	ND	Aus
10⁻⁴	ND	ND	INC	ND	ND	INC	Aus
10⁻⁵	ND	INC	ND	INC	ND	ND	Aus

ND (Não detectado), sem crescimento fúngico; INC (Incontável), Ausência do fungo, C+: Controle positivo, C-: Controle negativo.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 7 - Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 48 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA

Diluição semeada	48 h						
	Doses (mg. mL ⁻¹)					Controles	
	0.1	0.5	1.10	5.0	10.0	C+	C-
10⁻¹	ND	ND	INC	INC	INC	ND	Aus
10⁻²	INC	INC	INC	INC	ND	ND	Aus
10⁻³	INC	ND	INC	ND	ND	ND	Aus
10⁻⁴	INC	ND	INC	ND	ND	INC	Aus
10⁻⁵	INC	ND	INC	ND	ND	INC	Aus

ND (Não detectado), sem crescimento fúngico; INC (Incontável), Ausência do fungo, C+: Controle positivo, C-: Controle negativo.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 8 - Contagem de *F. semitectum* (UFC) em função do tempo 72 h, semeados pelo método clássico padrão (*Pour -Plate*) em meio BDA

Diluição semeada	72 h						
	Doses (mg. mL ⁻¹)					Controles	
	0.1	0.5	1.10	5.0	10.0	C+	C-
10⁻¹	ND	INC	INC	INC	ND	INC	Aus
10⁻²	INC	INC	INC	ND	INC	ND	Aus
10⁻³	ND	INC	INC	ND	ND	INC	Aus
10⁻⁴	ND	INC	INC	ND	ND	ND	Aus
10⁻⁵	INC	INC	INC	ND	ND	ND	Aus

ND (Não detectado), sem crescimento fúngico; INC (Incontável), Ausência do fungo, C+: Controle positivo, C-: Controle negativo.

Fonte: Elaboração do autor.