

# Desenvolvimento de iniciadores para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja\*

Marta Helena Vechiato<sup>1</sup>; Antonio Carlos Maringoni<sup>2</sup>; Elza Maria Frias Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Cx. Postal 12.898, 04010-970, São Paulo, SP; <sup>2</sup>Depto. de Produção Vegetal, FCA, UNESP, Cx. Postal 237, 18.603-970, Botucatu, SP.

Parte da tese de doutorado da 1ª autora. Projeto financiado pela FAPESP.

Data de chegada: 27/10/2004. Aceito para publicação em: 05/10/2005.

1136

## ABSTRACT

Vechiato, M. H.; Maringoni, A. C.; Martins, E.M.F. Development of primers and method for identification and detection of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* in soybean seeds. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p.161-169, 2006.

In spite of the great variability of the *Diaporthe/Phomopsis* complex, the routine seed health testing, used for detection of the *Diaporthe*, is not reliable, taking consideration into that for its identification morphological characteristics of the colonies are used. By considering, this work had as objective to develop an accurate, fast and reliable method for *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) detection and identification in soybean seeds. A sample of seeds from cultivar IAS5, analyzed previously for sanity, without *Diaporthe* (SS) was inoculated with Dphm (S.I.). Samples were collected with the following SI:SS ratios: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 and 1:400. DNA mycelium extraction was necessary first to incubate, the seeds, during 3 to 7 days, using blotter test modified with 2,4 D and washing them

with buffer extraction (1% of SDS, 10 mM of TRIS/HCl and 25 mM of EDTA) for 20 min, on an orbital shaker (100 rpm). An aliquot of 350 µL of the supernatants was transferred to microcentrifuge tubes with 350 µL of silica resin gel of the Wizard kit (Promega) remaining in contact during one minute. DNA extracted was used as template in the reaction of PCR by using the following primers: DphLe (TCG GCC TTG GAA GTA GAA GAC) and DphRi (ACT GAA TGC GTT GCG ATT CT). Using these primers, it was possible to detect the presence of *D.phaseolorum* var *meridionalis* in soybean seeds, in the ratio of one infected seed with Dphm in samples of 400 seeds (0.25% of incidence), using blotter test modified with 2,4 D associated with the PCR technique.

Additional keywords: *Glycine max*, stem canker of soybean, molecular characterization.

## RESUMO

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.

Considerando a grande variabilidade apresentada pelo complexo *Diaporthe/Phomopsis*, os métodos rotineiros de sanidade de sementes, empregados na detecção do gênero *Diaporthe*, não são confiáveis visto que, para sua identificação são utilizadas as características morfológicas das colônias que se desenvolvem sobre as sementes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver iniciadores específicos, bem como um método confiável para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm), em sementes de soja. Amostra de sementes da cultivar IAS5, analisada previamente para sanidade, não portadoras de *Diaporthe* (SS) foram inoculadas com Dphm (SI), obtendo-se amostras com as seguintes proporções de SI:SS: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. Para a extração de DNA do micélio do patógeno das sementes foi necessário primeiro incubar as sementes por 7 dias, utilizando-se o método do papel de filtro

modificado com 2,4 D e, em seguida submetê-las à lavagem em tampão de extração (1% de SDS, 10 mM de TRIS/HCL e 25 mM de EDTA) por 20 min, sob agitação a 100 rpm. Em seguida, alíquotas de 350 µL do sobrenadante foram transferidas para novos microtubos contendo 350 µL de resina de sílica gel da Wizard/Promega permanecendo em contacto com a mesma por 1 minuto. Os DNAs extraídos foram utilizados como molde na reação de PCR com os iniciadores: DphLe (TCG GCC TTG GAA GTA GAA AG) e DphRi (ACT GAA TGC GTT GCG ATT CT) Utilizando-se estes iniciadores, foi possível detectar a presença de *D. phaseolorum* var *meridionalis* em sementes de soja, na proporção de uma semente infectada com o patógeno em amostras de 400 sementes (0,25% de incidência), utilizando-se o método do papel de filtro modificado com 2,4 D associado à técnica de PCR.

Palavras-chave adicionais: *Glycine max*, cancro da haste e da vagem da soja, caracterização molecular.

Entre os fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos da soja estão, sem dúvida, os de caráter fitossanitários, nos quais estão incluídas as doenças, que têm aumentado com a expansão da soja para novas áreas de cultivo. Entre as doenças de importância econômica para cultura da soja estão a queima da haste e da vagem e o cancro da haste da soja, causadas respectivamente por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, que também podem causar podridão de sementes (8, 12, 16).

No Brasil, o cancro da haste foi identificado pela primeira vez em 1989, nos municípios de Ponta Grossa, Palmeiras, Castro e Tibagi (PR) e Rondonópolis (MT), e espalhou-se para todas as regiões produtoras de soja no país, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul (24).

Apesar do cancro da haste da soja, no momento, não apresentar perigo à cultura da soja devido ao desenvolvimento e utilização de cultivares resistentes, a escassez de informações na literatura sobre *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* F.A. Fernández, no que se refere à morfologia e fisiologia, transmissão, bem como a ausência de métodos laboratoriais de rotina para detecção deste patógeno em sementes pode facilitar sua disseminação com conseqüentes perdas à cultura da soja.

Considerando a importância da semente como agente de introdução e disseminação do patógeno, bem como o intenso comércio de importação e exportação de sementes, aliado a exigências dos órgãos governamentais, no que se refere à sanidade das sementes, o desenvolvimento de uma metodologia para detecção e diferenciação de *D. phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes é de extrema importância para a diagnose do patógeno nos testes de rotina. Este método poderá ser utilizado também, em Programa de Certificação de Sementes para Sanidade, resultando na comercialização de sementes em boas condições fitossanitárias, com reflexos no controle do patógeno e na produção de sementes de soja.

Não existe, no momento, um método rotineiro que possa ser utilizado em laboratório para detecção e identificação de *D. phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes, visto que os métodos recomendados para detecção de fungos em sementes de soja, como o do papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros (9,14), não permitem a diferenciação da variedade *meridionalis* de outras espécies de *Diaporthe*.

Nestes métodos a identificação é baseada na morfologia dos fungos que se desenvolvem sobre as sementes. Sinclair & Backman (18) citam que sementes provenientes de campos altamente infectados apresentam a incidência baixa do patógeno, ao redor de 2%. Diante disso, a utilização dos métodos atualmente disponíveis podem não ser confiáveis, resultando em dados que não refletem a realidade.

Yorinori (23) relata que os estudos por ele realizados, sobre as características diferenciadoras entre *Phomopsis* do cancro e *Phomopsis* da semente, principalmente no que se refere à morfologia, coloração das colônias e picnídios, são consideradas preliminares, uma vez que há também grande variabilidade entre as colônias de *Phomopsis* da semente no método do papel de filtro e nenhum estudo intensivo e detalhado foi realizado no Brasil com os dois tipos de *Phomopsis*.

Apesar disso as características morfológicas têm sido freqüentemente utilizada subjetivamente para distinguir variedades de *D. phaseolorum*. Fernández & Hanlin (5) questionam a

confiabilidade da identificação quando se utilizam estas características, visto que, elas não têm sido estudadas e descritas em detalhes.

Com os recentes avanços na área de biologia molecular torna-se possível determinar diferenças, mesmo entre dois organismos bem próximos a nível molecular (2).

A técnica de RAPD tem sido empregada como ferramenta para elucidar aspectos problemáticos com relação à taxonomia e variabilidade de fungos. Esta técnica possui baixa reprodutibilidade o que limita sua utilização para fins de diagnose, entretanto tem sido utilizada como estratégia para selecionar fragmentos de DNA de isolados, que após clonagem e seqüenciamento, geram iniciadores específicos (4, 6).

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é considerada a mais adequada para a diagnose de fungos por sua especificidade, visto que confiabilidade e precisão dos métodos imunológicos e enzimáticos na diagnose podem ser afetados por amostras que contenham altos níveis de proteínas. Além disso, a técnica de PCR não é passível de variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo, do tipo de tecido utilizado e das condições ambientais (13). Esta técnica pode ser bastante promissora para a detecção e diferenciação *D. phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja, nos laboratórios de rotina de sanidade de sementes.

Em relação a sementes, estudos foram realizados visando projetar iniciadores específicos para diagnose de *Fusarium poae* e *Tilletia indica*, *Alternaria radicina* e *Phomopsis longicolla*, utilizando a técnica de PCR, nas culturas do trigo, cenoura e soja, respectivamente (15, 17, 19, 25).

Diante o acima exposto, este trabalho teve como objetivos: a) obter um par de iniciadores específico para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*; b) desenvolver um método eficiente, rápido e de fácil aplicação para a detecção e identificação deste patógeno em sementes de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados listados na Tabela 1, de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* foram identificados e cedidos pelo Dr. José Tadashi Yorinori, EMBRAPA-SOJA e pela Dra. Margarida F. Ito, do Instituto Agrônomo de Campinas. Os demais isolados foram obtidos de plantas de soja com sintomas de cancro da haste e de sementes.

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

Número	Isolado	Procedência
1	Dphm/06/9393 EMBRAPA (haste)	Londrina-PR
2	Dphm/CH8-EMBRAPA (haste)	Brasil
3	Dphm-03/99-EMBRAPA (haste)	Bolívia
4	Dphm-45/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel-PR
5	Dph-49/98-EMBRAPA (haste)	Argentina
6	Dphm-01/96-(IB semente)	GO
7	Dphm-01/96-IB (haste)	Orlândia-SP
8	Dphs-36/94-EMBRAPA (haste)	Uruçui-PI
9	Dph -03/96-IB (haste)	Avaré-SP

10	Dphm-04/97-IB (haste)	Avaré-SP
11	Dphm-05-IB/97-(haste)	Guairá-SP
12	Dph-06/96-IB- (semente)	Formosa-GO
13	Dph-07/96-IB (semente)	Formosa-GO
14	Dph-08/96-IB (semente)	Formosa-GO
15	Dph-09/96-IB (semente)	GO
16	Dph-10/96-IB (semente)	GO
17	Dph-11/96-IB (semente)	GO
18	Dph-12/96-IB (semente)	GO
19	Dph-13/96-IB (semente)	GO
20	Dph-14/96-IB (semente)	GO
21	Dph-15/96-IB (semente)	GO
22	Dph-16/96-IB (semente)	GO
23	Dph-17/96-IB (semente)	GO
24	Dph-18/96-IB (semente)	GO
25	Dph-19/96-IB (semente)	GO
26	Dph-20/96-IB (semente)	GO
27	Dphm-83/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
28	Dph. 99/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
29	Dphm-42/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel- PR
30	Dph.-96/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
31	Dphm-44/95-EMBRAPA (haste)	Guarapuava-PR
32	Dphm-109/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
33	Dphm-47/95-EMBRAPA (haste)	Ponta Grossa-PR
34	Dphm-59/97-EMRAPA (haste)	Brasil
35	Dphm-60/97-EMBRAPA (haste)	Brasil
36	Dphm-65/97-EMBRAPA (haste)	Luiziana-GO
37	Dph-21/97-IB (semente)	Formosa-GO
38	Dph-22/97-IB (semente)	Formosa-GO
39	Dph-23/97-IB (semente)	GO
40	Cerc.-23/99-IB (semente)	GO
41	Ph-24/99- IB (semente)	Formosa-GO
42	Colld-25/99-IB(semente)	Formosa-GO
43	Dphm/8498-IAC	Colômbia-SP
44	Dphm-8493-IAC	Colômbia-SP
45	Dphm-8497-IAC	Colômbia-SP
46	Dphm-8496-IAC	Fazenda Mundo Novo
47	Dphm-8505-IAC	Frutal-MG
48	Dphm-8509-IAC	Ipauçu-SP
49	Dphm-9093-IAC	Tarumã-SP
50	Dphm-9983-IAC	Assis-SP
51	Dphm-10057-IAC	Mococa-SP
52	Dph-89/99-IB (semente)	Dourados-MS
53	Dph-90/99-IB (semente)	Dourados-MS
54	Dph-91/99-IB (semente)	Formosa-GO
55	Dph-92/99-IB (semente)	Formosa-GO

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

\*Dphs- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*; \*Dph- *Diaporthe* spp.

\*Cerc-*Cercospora* sp.; \*Ph- *Phoma* sp.; \*Colld - *Colletotrichum dematium*.

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

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

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

O inóculo, previamente preparado em meio BDA, foi produzido em palitos de dente colonizados com os isolados listados no Tabela 1, segundo técnica descrita por Keeling (10), modificada por Yorinori (24). As plantas foram inoculadas no estágio V1 (3), cerca de dez dias após semeadura. As inoculações foram feitas inserindo-se o palito colonizado pelo micélio do fungo a 1cm abaixo das folhas cotiledonares das plantas, evitando a perfuração do caule, descartando a possibilidade de que a perfuração fosse responsável pela morte das plantas, mascarando os sintomas induzidos pelo patógeno.

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

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

#### Métodos de extração de DNA

##### a) trituração do micélio em nitrogênio líquido

Micélio de culturas monospóricas de isolados de Dphm, Dphs e Dph, bem como de outros fungos citados na Tabela 1 foram transferidos para placas de Petri descartáveis, de 3 cm de diâmetro contendo 5mL de meio líquido de batata dextrose, onde permaneceram durante três dias, a 25° C para o desenvolvimento do micélio. Após este período, o micélio foi coletado em um tubo de micro-centrífuga de 1,5 mL e sedimentado por centrifugação (17000 rcf/10 min). Após duas lavagens com 0,5 mL de água bi-distilada e 0,5 mL de acetona, o micélio foi liofilizado por 24 horas. Em seguida, o micélio liofilizado foi triturado sob nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e adicionado 350 µL de STE (1% de SDS, 10mM de Tris HCL e 25mM de EDTA). Após 15 min à temperatura ambiente, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e a mistura submetida à centrifugação (17000 rcf/ 10 min). Ao sobrenadante, transferido para novo microtubo, foram adicionados 1000 µL de etanol absoluto. Após 10 minutos, a -20°C, a mistura foi centrifugada (10000 rfc/10 min). O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 75%, seco por 5 min, em concentrador a vácuo. O sedimento foi eluído em 50 µL de TE pH 8,0 (TRIS-HCL 10mM-EDTA 1mM).

A concentração de DNA nas amostras foi estimada pelo espectrofotômetro GeneQuantII, Amersham Pharmacia Biote-

ch, e ajustada para 30ng/μL.

#### **b) utilizando-se resina de sílica gel Wizard (Promega).**

Isolados listados na Tabela 1 e de outros isolados obtidos de sementes de soja de diversos cultivares, foram transferidos para placas de Petri descartáveis de 9 cm de diâmetro contendo 25 mL de meio BDA, onde permaneceram durante três dias, a 27 °C. Após este período, o micélio de cada colônia foi coletado, com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática e depositado em microtubos de 1,5 mL, contendo 350 μL de STE (1% de SDS, 10 mM de TRIS/HCL e 25 mM de EDTA). Após 20 minutos de agitação à temperatura ambiente, foram centrifugados a 17000 rcf/10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos contendo 350 μL de resina de sílica gel da Wizard (Promega), misturados por inversão, permanecendo em contacto com a mesma por 1 minuto. Em seguida, as misturas foram transferidas para seringas de 2 mL acopladas às colunas. Os componentes solúveis foram removidos por pressão, com auxílio dos êmbolos das seringas, e DNAs adsorvidos à resina foram retidos no filtro. Procedeu-se a lavagem dos DNAs com 2 mL de isopropanol 80%. Após passagem do isopropanol pelas colunas, estas foram centrifugadas por 1 min a 6800 rcf para retirar o excesso de isopropanol. As colunas foram transferidas para um novo microtubo, adicionando-se 30 μL de TE pH 8,0 (TRIS/HCL 10mM-EDTA 1mM) para eluir os DNAs.

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

#### **DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso- RAPD**

Com a finalidade de determinar uma região do DNA diferenciadora entre os isolados de Dphm, Dphs e Dph. foram realizadas amplificações ao acaso do DNA destes isolados, utilizando-se o iniciador 425 (5' CGTCGGGCCT 3'), conforme trabalho de Fernández ; Hanlin (5).

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

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

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

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

Os fragmentos DNA dos isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 (Tabela 1), obtidos por amplificação em RAPD, foram eluídos do gel de agarose em 50 μL de água destilada, deiodonizada e esterilizada utilizando-se o quite “*QIA quick – Gel –Extraction*”, QIAGEN. A concentração de DNA eluído do gel foi estimada pela absorção em um espectrofotômetro de onda de 260 nm

Em seguida, os 50 μL foram reduzidos a 8 μL e a eles acrescentados 10 μL de tampão de extração 2x, 1 μL de T4 DNA-ligase (3U/μL) e 1μL do vetor pGEM-T Easy da Promega (50 ng/μL) para se chegar à proporção molar aproximada de 1:1 de

inserto: vetor. A mistura de ligação foi incubada por 24h, a 4 °C.

Para transformar 100 μL de células competentes de *Escherichia coli* (DH10B) foram utilizados 2 μL da reação de ligação. A transformação foi realizada por eletroporação utilizando-se o eletroporador *E. coli*, da “Life Technologies”. A mistura de 2 μL de vetor recombinado e 100 μL de células competentes de *E. coli* foi incubada por 20 min, a 0 °C. Em micro células de eletroporação de polipropileno, previamente geladas, foram pipetados 25 μL da mistura entre os dois eletrodos de alumínio da célula. Um pulso de 2,5 KV, 2 μF e 4 KΩ foi aplicado às células na câmara de micro-eletroporação, a 4 °C. Às células transformadas foram acrescentados 950 μL do meio SOC (bacto-triptona), extrato de levedura, NaCl e KCl, 20:5:0,5 p/v, acrescidos de glicose 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Após 1,5 h a 37 °C, sob agitação, 100 μL da suspensão foram semeados em meio 2YT (bacto-triptona), extrato de levedura, NaCl- 160: 10: 5 p/v, na presença de ampicilina (50μg/mL) e X-Gal (40μL a 20mg/mL) e incubados por 16 h, a 37 °C.

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

#### **Seqüenciamento do fragmento inserido no vetor**

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

Utilizou-se o seguinte programa de temperatura para o termociclador Perkin Elmer 2.400 ou M.J. Research Inc. 3 seg a 94°C de pré-aquecimento; 25 ciclos de 20 seg a 94°C, 30seg a 60°C, 60 seg a 72°C e uma pós-extensão de 7 min a 72°C.

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

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

As seqüências dos fragmentos de DNA obtidas foram alinhadas pelo programa “*Sequencer*” e as extremidades correspondentes às seqüências das pontas do vetor pGEM-T linearizado foram eliminadas. O par de iniciadores foi desenhado utilizando-se o programa *WWW Primer Picking (Primer3)* disponível no *site* da “Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research” ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

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

#### **Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados.**

Os DNAs de isolados de *Diaporthe* spp. listados na Tabela 1, bem como de 96 isolados de Dph obtidos de sementes da cultivar FT Jatobá, foram utilizados na reação de PCR com os iniciadores sintetizados DphLe e DphRi.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD) e projeção iniciadores.

A análise eletroforética, em gel de agarose a 2%, dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em RAPD, dos isolados de Dphm, um de Dphs e de isolados de Dph, com o iniciador 425, revelou a presença de 1 fragmento de aproximadamente 400 pb comum a todos os identificados como var. *meridionalis*. Entretanto, isolados não identificados como var. *meridionalis* (isolados 5 e 8), também apresentaram amplificação de fragmentos de tamanho semelhante. Estes resultados evidenciam que a técnica de RAPD não é adequada para a diagnose desse patógeno. (Figura 1).

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

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

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

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

### Detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR

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

Para obtenção dos diferentes níveis de incidência de Dphm, as sementes inoculadas (S.I.) bem como, as sementes isentas do fungo (SS), foram submetidas ao método de incubação (papel de filtro modificado com 2,4 D). Após o período de incubação as SI e SS foram retiradas das placas e misturadas, visando obter sub amostras com diferentes níveis de incidência de Dphm, (Tabela 2)

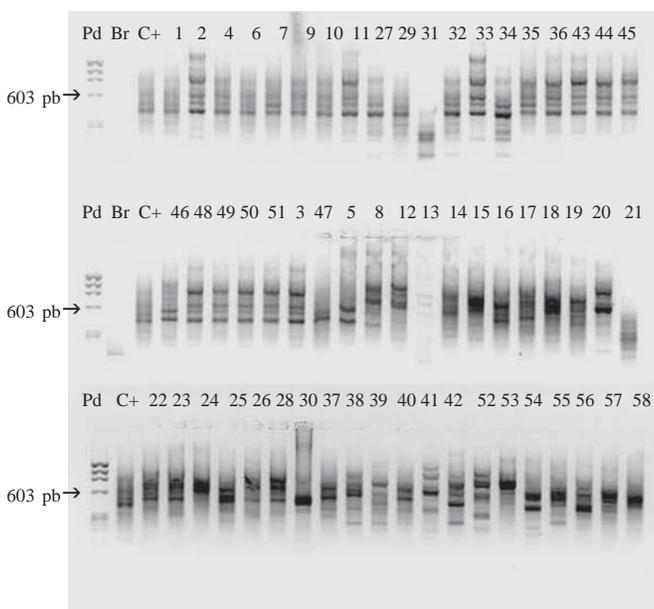
**Tabela 2.** Incidência (%) de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) em amostras de sementes de soja da cultivar IAS5, analisada para sanidade pelo método do papel de filtro.

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

\*S.I. - semente inoculada com Dphm.

\*\*S.S - semente sem Dphm.

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



**Figura 1.** Gel agarose 2%, do RAPD com o iniciador 425 de DNAs de micélio dos isolados listados no Quadro 1 e 3 isolados de *Diaporthe* sp., extraídos com STE sob agitação, purificados em resina de sílica gel da Wizard(Promega); C+(controle positivo)=DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8); Br-(branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR, com H<sub>2</sub>O destilada estéril no lugar de DNA; Pd-(Padrão) = ÖX174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 pb.

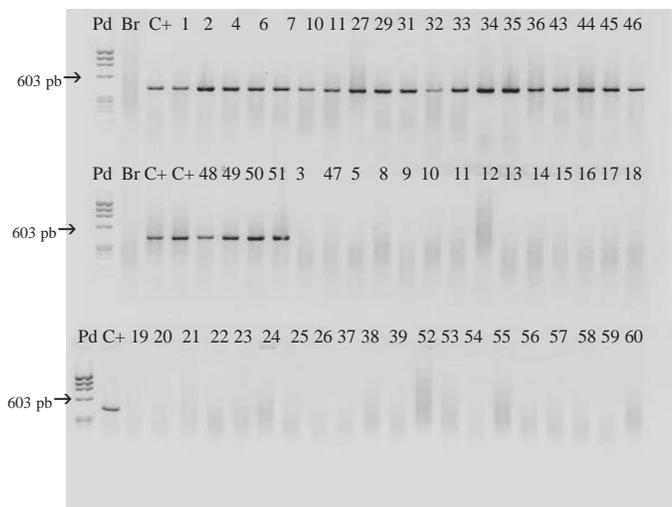
Esta técnica, segundo Kohn (11), é particularmente apropriada para estudar organismos abaixo do nível de espécie. Entretanto possui baixa reprodutibilidade que limita sua utilização para fins de diagnose e tem sido utilizada como estratégia para selecionar fragmentos de DNA de isolados, que após clonagem e seqüenciamento, geram iniciadores específicos.

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

iniciadores: DphmLe= TCGGCCTTGGGAAGTAGAAAG e DphmRi = CTGAATGCGTTGCGATTCT

### Comprovação da especificidade dos iniciadores projetados

A reação de PCR com DNAs genômicos de 25 isolados de Dphm, 1 de Dphs e 34 de Dph., com os iniciadores DphLe e DphRi, resultou na amplificação de um fragmento de 418 pb comum a todos os isolados identificados como variedade *meridionalis*, exceto para os isolados 3 (Dphm-03/99) e 47 (Dphm-8505) que não amplificaram, e ausente nos demais (Figura 2).



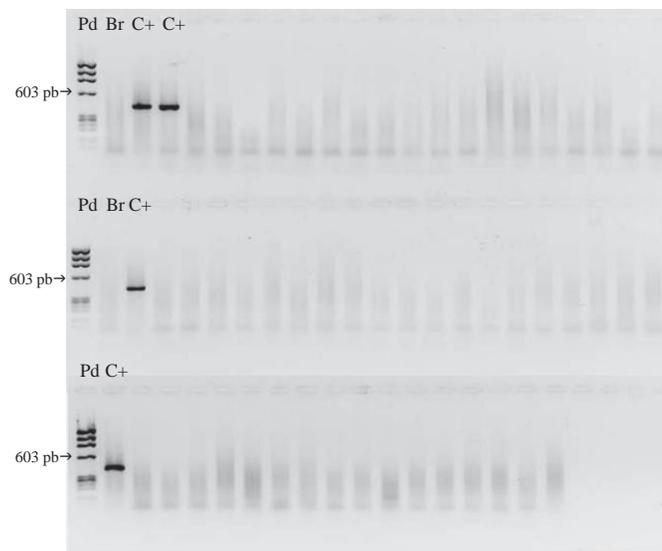
**Figura 2.** Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores DphLe e DphRi e DNAs de micélio, listados na Tabela 1 e 5 isolados de *Diaporthe* sp., extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-(Promega); **C+** (controle positivo)= DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8); **Br**-(Branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H<sub>2</sub>O destilada estéril no lugar de DNA.; **Pd** - (Padrão) = ÖX174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 pb.

Na Figura 3, observa-se que não houve amplificação dos fragmentos dos 96 isolados de Dph, provenientes de micélio e esporos de sementes, que possuíam diferentes características morfológicas, no que se refere à coloração e tipo de micélio. É importante ressaltar que, estes 96 isolados foram provenientes de sementes colhidas de plantas de soja, da cultivar Jatobá, considerada moderadamente resistente ao cancro da haste da haste e não foi constatada a ocorrência doença no campo.

Esses resultados reforçam a eficiência do método do papel de filtro modificado com 2,4D associado a PCR para diagnose do agente causal do cancro da haste em sementes de soja.

Os isolados, 3 e 47, não amplificaram com os iniciadores projetados. As plantas inoculadas com estes isolados apresentaram sintoma de cancro da haste, nos testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação, comportando-se de maneira bastante agressiva, com porcentagem de 90 a 100% de plantas mortas.

A não amplificação do DNA de isolados patogênicos, com iniciadores recomendados como específicos, também foi cons-



**Figura 3.** Gel agarose 2%, do PCR com os iniciadores DphLe e DphRi e DNAs de micélio de 96 *Diaporthe* sp., isolados de sementes, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-(Promega); **C+**(controle positivo) = DNA do micélio do isolado 2 (Dphm- CH8); **Br**-(branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H<sub>2</sub>O destilada estéril no lugar de DNA; **Pd**-(Padrão) = ÖX174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 pb.

tado em trabalhos desenvolvidos por outros pesquisadores. Vieira et al. (22) em estudos para verificar a viabilidade e especificidade do uso de PCR para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, utilizando 42 isolados provenientes de diversos locais, concluíram que apesar de não ter havido amplificação de alguns isolados, a técnica de PCR é adequada para identificação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, podendo ser utilizada em diagnose rotineira e em programas de certificação de sementes.

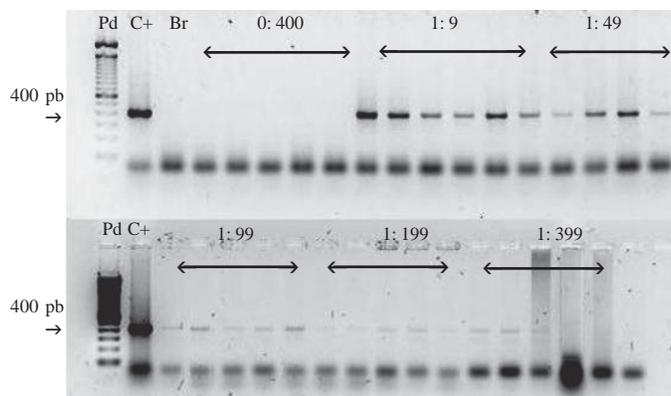
Souza et al. (20) constataram que não houve amplificação de fragmentos de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* quando utilizaram iniciadores desenhados por Guimarães et. al. (7). Em plantas de milho, Bianchini (1) não obteve amplificação de fragmentos de DNA na PCR, utilizando iniciadores universais, para a detecção de fitoplasmas.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, bem como de outros citados, onde não houve amplificação do DNA na PCR, a não amplificação dos isolados 3 e 47, não inviabiliza a utilização do método desenvolvido nas análises de rotina em laboratório de patologia de sementes.

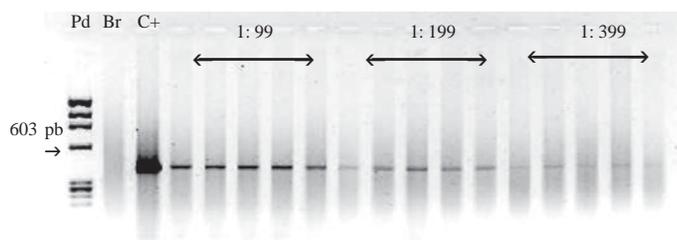
Conforme dados de seqüenciamento de fragmento de DNA genômico amplificado por iniciadores da região do ITS (ITS3 e ITS4), esses isolados apresentaram alta homologia tanto com *D. phaseolorum* var. *meridionalis* quanto com *D. phaseolorum* var. *caulivora*, levando à hipótese de que eles possam ser uma variação da var. *meridionalis* ou da *caulivora* Vechiato (21).

### Detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja.

Os resultados obtidos utilizando-se o método de extração de DNA do patógeno, com DNA purificado com sílica gel da Wizzard (Promega), estão expressos nas Figuras 4 e 5.



**Figura 4.** Gel agarose 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostras de sementes de soja incubadas por 5 dias, com os iniciadores DphLe e DphRi, com 0,00 (0 SS:400 SS); 0,25 (1 SI: 399 SS); 0,50 (1 SI:199 SS); 1,00 (1 SI:99 SS), 2,00 (1 SI:49 S.S) e 10% (1 SI:9 SS) de incidência de Dphm; **C+** (controle positivo) isolado 2. **Br** (Branco)= todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H<sub>2</sub>O destilada estéril no lugar de DNA; **Pd** (Padrão) 100pb DNA Ladder (Life Technologies).



**Figura 5.** Gel agarose 2%, do PCR de DNAs extraídos de amostra de sementes de soja, incubadas por 7 dias, com 1,00 (1 SI: 99 SS), 0,50 (1 SI : 199 SS) e 0,25 % ( 1 SI: 399 SS) de incidência de Dphm, submersas em STE (0,5 mL / semente) e o DNA foi purificado em resina de sílica gel da Wizzard-Promega; **C+** (controle positivo) isolado 2; **Br** (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo água destilada esterilizada no lugar de DNA; **Pd** (Padrão) = ÖX174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 pb.

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

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

Observa-se também uma melhor visualização das bandas com maior incidência de Dphm. Estes resultados evidenciam que existe uma relação direta entre incidência do patógeno e a quantidade de DNA extraído.

Considerando estes fatos, visando melhorar a eficiência de extração, o período de incubação das sementes de pelo menos sete dias, seria aconselhável para a obtenção de uma maior quantidade de micélio, sobretudo para as sementes com menor quantidade de inóculo, conferindo maior confiabilidade na detecção do patógeno alvo.

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

Assim, a utilização de PCR associado à incubação de sementes, com iniciadores específicos projetados para identificação de *Tilletia indica*, em sementes de trigo, em trabalho desenvolvido por Smith et al. (19) mostrou que em sementes infectadas artificialmente com teliósporos germinados, o fungo pode ser detectado em amostras com níveis de incidência de dez teliósporos em 50 g de sementes, enquanto que para teliósporos não germinados são necessários 1000, e que este nível de sensibilidade não tem aplicação prática quando se deseja detectar *T. indica*, em amostras de sementes de trigo contendo 10 ou menos teliósporos.

Pryor & Gilbertson (17) também detectaram *Alternaria radicina*, em sementes de cenoura, utilizando método de incubação de sementes e PCR, em amostras de 1g (aproximadamente de 800 a 1000 sementes), utilizando uma única placa de Petri descartável (100 x 15 mm), incubando-as em condições da alta umidade, por cinco dias a 28 °C. Neste sistema esses autores conseguiram detectar uma semente de cenoura infectada com *Alternaria radicina* em lotes de até 1000 sementes (0,1%) enquanto para o sistema soja/*Diaporthe* foi possível detectar um nível de infecção de até 0,25% (uma em 400 sementes).

Analisando os resultados acima, observa-se que há relação entre o tamanho da amostra e das sementes, na extração de fragmentos de DNA, com a sensibilidade do método. Para cenoura e para outras sementes de tamanho pequeno, 1 g corresponde cerca de 1000 sementes, que podem ser submersa em 5

mL de tampão extração de DNA, enquanto que com 5 mL seria possível cobrir somente sete a dez sementes maiores, como as de soja ou as de feijão (correspondente a 1g). Para 400 e 1000 sementes de soja seriam necessários respectivamente 200 e 500 mL de tampão, o que diluiria muito a concentração do DNA extraído do micélio do fungo, sobretudo quando houver somente uma semente infectada, afetando a qualidade do produto resultante da extração, dificultando a visualização dos fragmentos amplificados na reação da PCR no gel de agarose.

Levando-se em consideração que a proporção 1:99 (1% de incidência de Dphm) foi a que apresentou a melhor visualização dos produtos amplificados (figura 5), e a amostragem recomendada para análise de sementes de soja é de 400 sementes, a amostra a ser analisada poderá ser subdividida em 4 sub-amostras de 100, ou 8 sub-amostras de 50, para proceder à extração do DNA do patógeno. Esta estratégia permite obter uma concentração maior do DNA de Dphm, sendo possível detectá-lo em pelo menos uma das sub-amostras, resultando uma visualização melhor do fragmento amplificado na reação de PCR, no gel de agarose.

Apesar da metodologia desenvolvida ser eficiente na detecção e identificação de Dphm em sementes de soja, devido à especificidade do iniciador projetado e sensibilidade na detecção do patógeno de 1 semente infectada em uma amostra de 400 sementes, o método de extração de fragmentos de DNA do patógeno nas sementes deverá ser aprimorado, visando melhorar a qualidade do produto resultante da extração, refletindo na melhoria da visualização das bandas em gel de agarose, em amostras acima de 100 sementes.

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

Os resultados deste trabalho permitem concluir que: a) os iniciadores projetados DphLe e DphRi diferenciam *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* de outras espécies de *Diaporthe* e outros microrganismos e pode ser utilizado em testes de rotina de sanidade de sementes b) A sensibilidade do método para detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes foi de uma semente infectada em amostragem de 400 sementes.

#### AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto.

Dr. José Tadashi Yorinori, EMBRAPA/Soja e Dra. Margarida F. Ito, IAC/Campinas, pelo fornecimento dos isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*.

Dr. Ricardo Harakava, pesquisador do Instituto Biológico, pelo seqüenciamento do DNA genômico de *Diaporthe* spp. com iniciadores da região do ITS.

Elizabete Yuriko Kohara, Assistente Técnica à Pesquisa do Instituto Biológico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bianchini, L. **Identificação molecular de isolados do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho coletados no Estado de São Paulo**. 2001. 44f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
2. Brun, T.D.; Thomas, J.W.; Taylor, J.W. Fungal Molecular Systematics. **Annual Review Ecology Systematic**, Palo Alto, v. 22, p.525-564, 1991.
3. Costa, J.A., Marquezan, E. **Característica dos estádios de desenvolvimento da soja**. Campinas: Fundação. Cargill, 1982. 30p.
4. Dobrowolsky, M.P.; O'Brien, P.A. Use of RAPD-PCR to isolate a specie -specific DNA probe for *Phytophthora cinnamomi*. **Microbiology Letters**, Delfit, v. 113, n.1, p.43-47, 1993.
5. Fernandez, F.A.; Hanlin, R.T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. **Mycologia**, New York, v. 88, p.425-40, 1996.
6. Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEM, 1995. 220p.
7. Guimarães, P.M.; Palmano, S.; Smith, J.J.; Sá, M.F.G.; Saddler, G.S. Development of PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.80, p.1-10, 2001.
8. Hobbs, T.W. ; Phillips, D.V. A identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates from soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p.500, 1985.
9. International Seed Testing Association – ISTA. **International rules for seed testing**. Proc. Int. Seed Testing Assoc., v.31, p.1-152, 1966.
10. Keeling, B.L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p. 807-9, 1982.
11. Kohn, L.M. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. **Mycologia**, New York, v.84, p.139-53, 1992.
12. Morgan-Jones, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: taxonomic considerations. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. **Proceedings**. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1699-1706.
13. Neale, D.B.; Devey, M.E.; Jermstad, K. D. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New Forests**, London, n. 5. p. 1-17, 1992.
14. Neergaard, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1977. 839 p.
15. Parry, D.W.; Nicholson, P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. **Plant Pathology**, London, v. 45, p.383-391, 1996.
16. Ploffer, L. D. The *Diaporthe/Phomopsis* disease complex of soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. **Proceedings**. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1695-1697.
17. Pryor, B.M. ; Gilbertson, R.L. A PCR based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrots seed. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.18-23, 2001.
18. Sinclair, J.B. ; Backman, P.A. **Compendium of soybean diseases**, 3. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 69p.
19. Smith, O.P.; Peterson, G.L.; Beck, R.J.; Schaad, Nw.; Bonde,

- M.R. Development of a PCR-vasead method for identificação of *Tilletia indica*, causal agent of carnal bunt of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p.115-22, 1996.
20. Souza, V.L.; Maringoni, A.C.; Krause-Sakate R. Detecção via PCR de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.1, p. 89-90, 2004.
21. Vechiato M.H. **Detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR**. 2002, 115f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
22. Vieira, B.A.H.; Souza R.M.; Figueira, A.R.; Boari, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p.737-40, 2001.
23. Yorinori, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", FEALQ, 1991. p.109-113.
24. Yorinori, J.T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Circular Técnica: Embrapa Soja, n. 14, 1996.
25. Zhang, A. W. ; Hartman, G.L.; Riccioni, L.; Chen, W. D.; Ma, R.Z.; Pedersen, W. L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. **Plant Disease**, St. Paul v.81, p.1143-9, 1997.