**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na
germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de
fungicidas**

Meyrielle Pires de Camargo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

Meyriele Pires de Camargo
Engenheira Agrônoma

***Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação,
tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Camargo, Meyriele Pires de

Sclerotinia sclerotiorum em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas / Meyriele Pires de Camargo. - - Piracicaba, 2013.

77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Mofo-branco 2. Patologia de sementes 3. Fungicida 4. Armazenamento
5. Amostragem I. Título

CDD 633.34
C172s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais,

Hélio de Líz Pires e Shirley Aparecida Camargo de Souza,

Por todo o amor, confiança e apoio em todos os momentos da minha vida.

Pela educação a mim concedida, pelos princípios ensinados e pelo caráter que hoje tenho.

Não há palavras para explicar o quanto vocês significam para mim e o quanto eu os amo.

Dedico.

À minha avó,

Celita Venina Camargo,

Pelo carinho e por me encorajar a nunca desistir, mesmo quando a saudade

era mais forte e quase impossível de suportar.

Dedico.

Ao meu irmão,

Antônio Pires de Camargo,

Pelo exemplo, amizade e incentivo em todas as horas.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Deus e São Francisco de Assis pela fé, por me ampararem nos momentos mais difíceis e me proporcionarem tantas alegrias.

À toda minha família, que mesmo de longe torceram pelo meu sucesso. Agradeço profundamente pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. José O. M. Menten pela orientação, incentivo e por todas as oportunidades oferecidas.

À Dra. Maria H. D. de Moraes a quem tenho grande admiração. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência e, principalmente, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado Leandro Oczkovski, pelo amor, companheirismo e pelo auxílio prestado no desenvolvimento dos meus trabalhos. Agradeço por acreditar nos meus sonhos e sempre permanecer ao meu lado, mesmo à distância. Amo você.

À Thiago A. de Melo pela grande amizade que construímos em tão pouco tempo. À você agradeço pela ajuda em meus experimentos, pelos conselhos e por todas as horas de alegrias e tristezas que juntos compartilhamos. Espero que nossa amizade dure até o fim de nossas vidas e que você alcance todo o sucesso que merece.

À Paula S. Panosso, minha amiga e companheira de pós-graduação, agradeço pelo apoio em todos os momentos e, principalmente, pela amizade. Obrigada pela paciência nas vésperas de provas e pela sua companhia durante esta jornada.

Às minhas amigas e colegas de pós-graduação Simone C. Brand, Dalila Rezende, Rafaela Roma, Juliana Baggio e Isabela Primiano pela companhia e amizade durante esses dois anos.

Aos meus amigos de longa data Peter Rosa e Cinthia Carvalho pelos conselhos em situações difíceis e pelos momentos de descontração.

Às alunas que colaboraram na execução dos meus trabalhos: Gabriele T. Rizzato, Thalita D. Chacon, Rachel Tonhati, Claudia E. Barendse e Mariane Ishizuka. Agradeço por tornarem os dias no laboratório mais alegres e pela prontidão em me ajudarem, mesmo quando haviam centenas de vidrarias a serem lavadas. Meu muito obrigada!

À Camila M. Costa, minha colega desde a graduação, pela convivência e momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço, em especial, à Prof. Dra. Lilian Amorim pelo apoio e oportunidades oferecidas, e ao Prof. Dr. Nelson Massola pela atenção e prontidão em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP pelo auxílio prestado sempre que necessário, especialmente ao Jeferson Brajão, Fabiana N. Wolak, Silvia Lourenço, José R. Groppo e Fernanda Y. B. Groppo pela atenção.

Ao Prof. Me. Luiz H. Carregal, Dr. Maurício Meyer, Dra. Vanessa C. Frare e ao Eng. Agrº Daniel M. Garcia pela atenção e disponibilidade de sementes necessárias para a realização dos trabalhos.

À Dra. Silvânia H. Furlan pelo apoio sempre que necessário.

À técnica do Laboratório de Análise de Sementes Ma. Helena M. C. P. Chamma pelo auxílio na etapa de armazenamento de sementes.

À Escola Superior “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade e estrutura disponibilizada para realização desta etapa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela formação, em especial ao Prof. Ricardo T. Casa, pelo exemplo de pessoa, pelos conhecimentos compartilhados e pelas contribuições realizadas desde a graduação.

À todos os professores do ensino fundamental e médio pela formação sólida e por me guiarem durante vários anos.

E, agradeço a todas as pessoas, que de alguma forma, me acompanharam e contribuíram na conclusão de mais esta etapa.

Muito obrigada!

“Dê liberdade para sua mente,
pensamentos limitantes servem
apenas para impedir seu crescimento.”

(Autor Desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 A cultura da soja.....	23
2.2 Mofo branco	24
2.2.1 Histórico	24
2.2.2 Etiologia	25
2.2.3 Sintomatologia.....	26
2.2.4 Ciclo da doença e epidemiologia.....	27
2.2.5 Importância da semente no desenvolvimento da doença	29
2.2.6 Métodos de manejo	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Sobrevivência de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja ao longo do armazenamento e seu efeito sobre a germinação.....	37
3.1.1 Obtenção do inóculo.....	37
3.1.2 Inoculação artificial de sementes de soja com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e armazenamento	38
3.1.3 Avaliação da incidência de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja.....	38
3.1.4 Avaliação da germinação das sementes de soja	39
3.1.5 Análise dos dados	40
3.2 Avaliação do tamanho de amostra de sementes de soja na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
3.2.1 Amostragem das sementes de soja	41

3.2.2	Avaliação da incidência de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42
3.2.3	Análise dos dados	42
3.3	Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a fungicidas.....	42
3.3.1	Obtenção do inóculo	43
3.3.2	Preparo das diluições e incorporação dos fungicidas ao meio de cultura.....	43
3.3.3	Avaliação do crescimento micelial e formação de escleródios	44
3.3.4	Análise dos dados	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Sobrevivência de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja ao longo do armazenamento e seu efeito sobre a germinação	45
4.2	Avaliação do tamanho de amostra de sementes de soja na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	51
4.3	Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a fungicidas.....	56
5	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

***Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas**

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, encontra-se disseminado em todo o país e afeta mais de 400 espécies de plantas, dentre elas a cultura da soja, causando danos consideráveis no rendimento. A transmissão do patógeno ocorre por meio de sementes contendo micélio dormente ou pela presença de escleródios no lote, os quais podem permanecer viáveis por um longo período, dificultando o manejo da doença. Este trabalho teve como objetivos verificar a viabilidade do patógeno em sementes durante o armazenamento e seu efeito sobre o poder germinativo; comparar tamanhos de amostras de sementes visando à detecção do fungo; e avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. sclerotiorum* a fungicidas. Para avaliação da sobrevivência do patógeno, sementes de soja foram inoculadas, artificialmente, com três isolados de *S. sclerotiorum*, e armazenadas em duas condições, câmara fria e seca (20 °C e 45% UR) e ambiente não controlado, durante oito meses. A cada dois meses foram realizados testes de sanidade pelo meio de cultura ágar-bromofenol (Neon), utilizando-se 4 repetições de 100 sementes, e testes de germinação, com 4 repetições de 50 sementes, pelo método do rolo de papel. No experimento de amostragem foram avaliadas dez amostras de sementes de soja pelo método do meio Neon, comparando-se quatro tamanhos de amostra: 400, 800, 1600 e 2400 sementes. Para avaliação da sensibilidade *in vitro* de *S. sclerotiorum* a fungicidas, foram utilizados 13 ingredientes ativos, em 7 doses e 5 repetições. Os valores da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e 100% (CI₁₀₀) foram estimados com base na percentagem de inibição do crescimento micelial. Além disso, realizaram-se a quantificação e pesagem dos escleródios formados após 15 dias de incubação. A presença do patógeno *S. sclerotiorum*, afetou negativamente a germinação das sementes, com redução média de 32% em relação à testemunha. Verificou-se diferença entre os isolados com relação à agressividade. O patógeno sobreviveu nas sementes em ambos os ambientes de armazenamento, porém, em ambiente controlado a redução na germinação das sementes foi de 14% e na incidência do fungo de 16%, enquanto que, em laboratório, esta redução foi de 23% na germinação e de 62% na incidência. Não houve diferença estatística com relação à quantidade de sementes amostradas na detecção de *S. sclerotiorum*, entretanto, constatou-se maior frequência de ocorrência do patógeno à medida que o número de sementes amostrado foi maior. Todos os fungicidas foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, bem como a produção de escleródios, sendo que os ingredientes ativos piraclostrobina, carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico, além de apresentarem CI₅₀ inferior a 1 mg L⁻¹, também inibiram totalmente a formação de escleródios em concentrações inferiores a 5 mg L⁻¹.

Palavras-chave: Mofo-branco; Patologia de sementes; Fungicida; Armazenamento; Amostragem

ABSTRACT

***Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds: survival, effect on germination, sample size for analysis and *in vitro* efficiency of fungicides**

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold is spread throughout the country and affects more than 400 species of plants, including soybean, causing considerable decrease in yield. The pathogen transmission occurs through seeds with dormant mycelium or by the presence of sclerotia in the lot, which can remain viable for a longer period, making hard the disease management. This study aimed to verify the viability of the pathogen in seeds during the storage period and its effect on germinative power; compare sizes of seed samples to determine the presence of the fungus; and to evaluate the *in vitro* sensibility of *S. sclerotiorum* to fungicides. To determine the pathogen survival, soybean seeds were inoculated artificially with three isolates of *S. sclerotiorum*, and stored into two conditions, cold and dry chamber (20 °C and 45% RU) and in uncontrolled environment, for eight months. Every two months health tests were performed by culture media bromophenol agar (Neon), using 4 repetition of 100 seeds, and germination tests, with 4 repetition of 50 seeds, by the method of the paper roll. During the experiment of sampling, ten samples of soybean seeds were evaluated by the method of media Neon, comparing four sample sizes: 400, 800, 1600 and 2400 seeds. To evaluate the *in vitro* sensibility of *S. Sclerotinia* to fungicides were used 13 active ingredients, in 7 doses and 5 repetitions. The values of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and 100% (IC₁₀₀) were estimated based on the percentage inhibition of the mycelial growth. In addition, it was performed the quantification and weighing of sclerotia formed after 15 days of incubation. The pathogen *S. sclerotiorum* in soybean seeds affected negatively the germination of seeds, with an average reduction of 32% compared to the control. There was difference between the isolates in relation to aggressiveness. The pathogen survived in seeds in both storage environments, however, under controlled environment, the decrease in the germination of the seeds was 14% and in its incidence was 16%, while in laboratory this reduction was 23% in the germination and 62% in the incidence. There was no statistical difference in the quantity of seeds sampled in the detection of *S. sclerotiorum*, however, a higher frequency of pathogen occurrence was verified as the number of sampled seeds was enlarged. All fungicides were able to reduce the mycelial growth of *S. sclerotiorum* and sclerotia production, and the active ingredients pyraclostrobin, carbendazim, thiabendazole and thiophanate methyl, besides having IC₅₀ of less than 1 mg L⁻¹ also completely inhibited the formation of sclerotia in concentrations less than 5 mg L⁻¹.

Keywords: White mold; Seed pathology; Fungicide; Storage; Sampling

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Plantas de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (A e B); sementes infectadas pelo fungo na vagem contendo escleródio (C); presença de escleródios acompanhando as sementes após a colheita (D). Fonte: adaptado de Esker et al., 201127
- Figura 2 - Ciclo e sintomatologia da doença mofo branco causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Adaptado de Agrios, 200529
- Figura 3 - Formação de halo típico indicativo da presença de *Sclerotinia sclerotiorum* em semente de soja (à esquerda) e crescimento de *Rhizopus* sp. (à direita) em meio ágar-bromofenol39
- Figura 4 - Amostragem de sementes de soja: homogeneização da amostra (A); esquema de distribuição das sementes horizontalmente (B) e verticalmente (C); finalizada a distribuição das sementes (D)42
- Figura 5 - Temperatura e umidade relativa do ar (%) durante o período de armazenamento (outubro de 2012 a junho de 2013) em laboratório47
- Figura 6 - Teste de germinação de sementes de soja pelo método do rolo de papel em sementes não inoculadas (A) e inoculadas com isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* obtidos a partir da cultura do nabo (B), da soja (C) e do feijão (D); plântula infectada pelo fungo com a formação de escleródios (E)49
- Figura 7 - Inibição do crescimento micelial (%) *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, por oito fungicidas, em seis concentrações (mg L⁻¹)61
- Figura 8 - Inibição do crescimento micelial (%) *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, por cinco fungicidas, em seis concentrações (mg L⁻¹)62
- Figura 9 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas65
- Figura 10 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas66
- Figura 11 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas67
- Figura 12 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de um fungicida68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência das amostras de sementes de soja submetidas à detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41
Tabela 2 - Germinação (%) das sementes de soja inoculadas e não inoculadas (testemunha) com três isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em cinco épocas de avaliação, armazenadas em dois ambientes	46
Tabela 3 - Incidência (%) do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de soja inoculadas artificialmente com três isolados, em cinco épocas de avaliação, armazenadas em dois ambientes.....	46
Tabela 4 - Incidência (%) e frequência de ocorrência (%) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em 10 amostras de sementes de soja, nas quantidades de 400, 800, 1600 e 2400 sementes analisadas	53
Tabela 5 - Fungicidas e respectivas equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) e 100 % (CI_{100}) do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	60

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja *Glycine max* L. (Merrill) é uma das mais importantes na economia mundial, sendo o Brasil um dos maiores produtores. Na safra brasileira 2012/13, a produção do grão estimada foi de 81,479 milhões de toneladas, com um aumento considerável em relação à safra anterior 2011/12, na qual a produção atingiu 66,383 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Os maiores estados produtores de soja são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, os quais contribuem com mais de 70% do total produzido no país (CONAB, 2013).

A ocorrência de doenças na soja é um dos fatores que mais afetam a produtividade, podendo causar prejuízos consideráveis. A importância dessas doenças varia anualmente, de acordo com o clima, a suscetibilidade das plantas e a ocorrência e disseminação de determinados patógenos.

Dentre as principais doenças da cultura da soja encontra-se o mofo branco, também conhecido como podridão de esclerotinia ou podridão branca da haste. Seu agente causal é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, o qual possui uma ampla gama de hospedeiros. É uma doença de importância mundial, podendo causar perdas superiores a 50% (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Sua ocorrência é favorecida em regiões que apresentam temperaturas mais amenas e umidade do solo e do ar altas (PAULA JÚNIOR et al., 2010), porém, mesmo em regiões com temperaturas elevadas a doença pode ocorrer.

O patógeno produz estruturas de resistência, chamadas escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por um longo período, garantindo sua sobrevivência. A germinação destes pode ser miceliogênica, produzindo hifas, ou carpogênica, originando apotécios nos quais são formados ascósporos, disseminados, principalmente, pelo vento (PAULA JÚNIOR et al., 2010). O fungo também pode ser disseminado por meio de sementes infectadas com micélio dormente ou pela presença de escleródios misturados a elas, sendo considerada a semente a principal fonte de inóculo primário da doença (GOULART, 2005).

Sementes infectadas com *S. sclerotiorum* podem apodrecer e não germinar, sobre as quais são formados os escleródios. Aquelas que germinam, na maioria das vezes, originam plantas doentes, indicando que a presença de micélio dormente nas sementes infectadas tem grande importância não só na disseminação do fungo, como também contribui para aumentar a intensidade da doença no campo, caso ocorra a transmissão da semente para a planta (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Depois de introduzido na área de cultivo, torna-se praticamente impossível a erradicação do patógeno, portanto, a principal medida de controle é a prevenção, evitando a sua entrada na

lavoura (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Após constatada a presença do patógeno, deve-se realizar o manejo integrado da doença, visando à redução da quantidade de inóculo na área. Dentre as medidas de controle usadas, recomenda-se o uso de sementes saudáveis e o tratamento de sementes com fungicidas.

Devido ao potencial de destruição do patógeno e dificuldade no seu controle, foi proposto pela Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009b), o nível de tolerância “zero” para *S. sclerotiorum*, em todas as categorias de sementes de soja a serem comercializadas. Entretanto, este índice é baseado apenas na presença de escleródios no lote, não sendo exigido testes de sanidade para detecção do patógeno em sementes.

Testes específicos na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes são fundamentais para garantir ou, pelo menos, diminuir a possibilidade de introdução do patógeno em áreas isentas. Dentre as metodologias recomendadas pelas Regras para Análises de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009a) para detecção do fungo, citam-se o método do papel de filtro, rolo de papel e meio ágar-bromofenol (Neon). Estes testes recomendam o uso de 400 sementes, porém, geralmente, este patógeno encontra-se em baixa incidência (HENNEBERG et al., 2012; HENNING et al., 2009; HOFFMAN et al., 1998), sendo possível que esta quantidade seja insuficiente para detecção segura, especialmente se a amostragem for realizada de maneira incorreta.

Dados relacionados a métodos de detecção, incidência e período de viabilidade do micélio dormiente em sementes, são fundamentais para elucidar a real importância da semente como forma de disseminação do fungo em lavouras de diferentes locais, bem como a sua possível introdução em áreas livres da doença e, dessa forma, estabelecer estratégias de controle adequadas.

O tratamento de sementes é uma alternativa na tentativa de erradicar o patógeno presente nas mesmas, além de outros benefícios por ele proporcionados, como proteção contra fungos de solo e uniformidade na germinação e emergência. Geralmente, o tratamento de sementes tem alta eficiência na erradicação do patógeno, além de apresentar um baixo custo. A dificuldade está na limitação do número de moléculas registradas para o tratamento de sementes no controle de *S. sclerotiorum*, evidenciando a importância de estudos na descoberta de outros ingredientes ativos que sejam eficazes no controle do patógeno.

Diante disso, este trabalho teve como objetivos: avaliar o comportamento do fungo *S. sclerotiorum* em sementes de soja ao longo do armazenamento, quantificando sua incidência e determinando o seu efeito sobre a germinação; comparar tamanhos de amostras de sementes

para uso em testes de detecção do patógeno em laboratórios de rotina e pesquisa; avaliar a sensibilidade de *S. sclerotiorum* a fungicidas pela inibição do crescimento micelial e formação de escleródios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à família Fabaceae, é originária da Ásia, sendo considerada uma das culturas mais antigas presentes na região (COSTA, 1996).

No Brasil, foi introduzida primeiramente no estado da Bahia, em 1882, e após 10 anos chegou ao município de Campinas, no estado de São Paulo (COSTA, 1996; GOMES, 1990). Contudo, foi no Rio Grande do Sul que esta leguminosa começou a ser cultivada em maior escala, em razão da suinocultura, servindo como um alimento rico em proteínas, e da triticultura, com a utilização da soja em sucessão ao trigo, possibilitando duas safras no mesmo ano agrícola (BLACK, 2000). Posteriormente, a leguminosa foi introduzida em Santa Catarina e Paraná e, a partir de 1950 ganhou importância no estado de São Paulo, difundindo-se para Minas Gerais (BLACK, 2000). Na década de 70, a soja começou a ser intensamente cultivada no Centro-Oeste do país, favorecida por diversos fatores, dentre eles a disponibilidade de terras a baixo custo e subsídios do governo (BLACK, 2000). Através de programas de melhoramento, com a geração de cultivares adaptadas a diversas condições de cultivo, foi possível a expansão da cultura para diversos locais e, atualmente, é cultivada em praticamente todas as regiões do país.

A semente da soja apresenta alto teor de proteína e ácidos graxos (GOMES, 1990). Após o seu processamento industrial, são originados diversos subprodutos. Dentre eles, os de maior consumo são o farelo, utilizado na formulação de rações para animais, e o óleo, para alimentação humana (BLACK, 2000).

A soja é considerada uma das principais “commodities” agrícolas, apresentando grande importância econômica a nível mundial e nacional. Em 2012, a produção mundial de soja foi superior a 253 milhões de toneladas, sendo que 86,27% desse valor foi produzido no continente americano, com destaque para os Estados Unidos, Brasil e Argentina como maiores produtores (FAO, 2013).

De acordo com a Conab (2013), a produção nacional do grão na safra 2012/13 foi de 81,479 milhões de toneladas, consideravelmente superior a safra de 2011/12, a qual foi de 66,383 milhões de toneladas. A estimativa de produção para a próxima safra 2013/14 é de crescimento, sendo de, pelo menos, 87,602 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Os maiores estados produtores são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, os quais contribuem com mais de 70% da produção do país (CONAB, 2013). O cultivo do grão vem aumentando, tanto em área, quanto em produtividade, ao longo dos anos. Na safra 2012/13, a área cultivada foi de 27,729 milhões de hectares e a produtividade média de 2.938 kg ha⁻¹, valores superiores

aos da safra anterior, que atingiram 25,042 milhões de hectares e 2.651 kg ha⁻¹, sendo que a expectativa para a safra de 2013/14 é de crescimento, para ambos os indicadores (CONAB, 2013).

Dentre os fatores limitantes na obtenção de maiores rendimentos, encontram-se as doenças, responsáveis por perdas anuais estimadas em cerca de 15 a 20%, contudo, algumas podem ocasionar a perda total da produção (ALMEIDA et al., 2005). Na cultura da soja, são relatadas no Brasil, mais de 40 doenças causadas por diversos patógenos, dentre eles fungos, bactérias, nematoides e vírus, sendo que a importância econômica de cada doença varia de uma safra para outra, como também de região para região, dependendo das condições climáticas de cada ano (ALMEIDA et. al., 2005). Entre essas doenças encontra-se o mofo branco, cuja ocorrência vem aumentando significativamente, tanto em relação à incidência quanto em extensão.

2.2 Mofo branco

2.2.1 Histórico

A doença mofo branco é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e vem ganhando importância nos últimos anos, devido aos prejuízos causados e às dificuldades no manejo. É um fungo polífago, tendo como hospedeiros mais de 400 plantas (BOLLAND e HALL, 1994), das quais não são incluídas gramíneas (ALMEIDA et al., 2005). Dentre as culturas suscetíveis, encontram-se espécies economicamente importantes, como soja, feijão, tomate, algodão, alface, repolho, amendoim e girassol, e plantas daninhas, como carrapicho, picão, caruru, mentrasto e vassoura (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O patógeno é um habitante do solo, necrotrófico e distribuído mundialmente. Estima-se que os danos causados pela doença sejam de 10 a 20%, porém, perdas superiores a 50% podem ocorrer em ataques severos (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). De acordo com Grau e Hartman (1999), para cada 10% de incidência da doença, os danos atingiram 250 kg ha⁻¹. Em outros trabalhos, a redução do rendimento variou de 170 a 335 kg ha⁻¹, para cada 10% de incidência da doença no campo (YANG et al., 1999), e de 147 a 263 kg ha⁻¹ (HOFFMAN et al., 1998), ocorrendo variação de acordo com a cultivar utilizada.

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em São Paulo, em 1921, na cultura da batata (CHAVES, 1964). Na cultura da soja, a doença foi relatada, pela primeira vez, em 1924, na Hungria, e desde então foi detectada em vários outros países (GRAU; HARTMAN, 1999). Os primeiros relatos da doença em soja, no Brasil, foram feitos em 1976 (CASSETARI NETO;

MACHADO; SILVA, 2010). No cerrado, a doença foi detectada, pela primeira vez, na década de 90 e, no Centro-Oeste apenas em 2000, sendo considerada uma doença de pouca importância, com ocorrência esporádica em regiões mais altas e em anos apresentando temperaturas mais baixas (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010).

Atualmente, o mofo branco é considerado uma doença emergente, de grande importância econômica, especialmente em regiões que apresentam clima mais ameno, como nas condições encontradas nas regiões Sul, Sudeste e em áreas elevadas do Centro-Oeste e Nordeste, onde ocorrem temperaturas noturnas mais baixas (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Os prejuízos diretos ocorrem em função da queda na produtividade da lavoura e, dentre as perdas indiretas, estão o aumento do custo de produção em função do emprego de métodos de controle e, o mais importante, a condenação de áreas para a produção de sementes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

2.2.2 Etiologia

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (sin. *Whetzelinia sclerotiorum*) pertence ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006), não possuindo ciclo assexual (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

Produz estruturas de resistência, denominados escleródios, que são constituídos por um enovelamento de hifas, de coloração inicialmente branca, tornando-se negros posteriormente. A coloração escura é resultado da presença de melanina, pigmento que possivelmente desempenha um papel importante na proteção contra condições adversas e na degradação microbiana (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Possuem formato e tamanho irregular, variando de acordo com o hospedeiro, sendo que em certas culturas, como no girassol, o escleródio pode cobrir todo o capítulo, atingindo mais de 35 cm de diâmetro, enquanto que, no feijão, o escleródio possui de 2 a 10 mm de diâmetro (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica, produzindo hifas, ou então carpogênicamente, com a produção de corpos de frutificação denominados apotécios. Para que ocorra a germinação carpogênica, os escleródios passam por um período de condicionamento no solo (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Cada escleródio é capaz de dar origem a mais de 20 apotécios, nos quais são formados milhares de ascos e, a partir destes, são liberados os ascósporos, sendo que durante o período funcional (5 a 10 dias), mais de dois milhões de ascósporos podem ser liberados de um único apotécio (PAULA JÚNIOR et al., 2010; STEADMAN, 1983).

Não há fase assexual do fungo, mas pode ocorrer a formação de microconídios a partir de hifas ou apotécios, entretanto, não ocorre germinação, sendo o seu papel na biologia do patógeno desconhecido (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

2.2.3 Sintomatologia

O patógeno pode atacar a planta de soja em qualquer estágio fisiológico, porém, os maiores danos acontecem em plantas adultas, sendo considerados os estádios de florescimento e formação de vagens os períodos de maior suscetibilidade (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Em geral, o processo de infecção se inicia na junção do pecíolo com a haste, cerca de 10 a 15 cm acima do solo, onde flores, pétalas e folhas senescidas se aderem (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999).

Os primeiros sintomas são manchas de anasarca que evoluem para coloração castanho-clara e em seguida, ocorre a formação de micélio branco e denso, o qual origina os escleródios (Figura 1) (ALMEIDA et al., 2005; CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). O sintoma de podridão branca da haste é caracterizado pela degeneração da medula, em partes da planta ou da planta toda, ocasionando murcha e seca (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Dependendo da extensão dos sintomas, a planta pode amarelecer e morrer (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999).

Sementes infectadas são pequenas, sem brilho, com descoloração, enrugamento e peso menor, ou também podem se apresentar assintomáticas (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Podem apodrecer e não germinar, ocorrendo a formação de escleródios (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Aquelas que germinam podem resultar em plantas doentes ou então morrerem logo em seguida, caracterizando o sintoma de tombamento (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Figura 1 - Plantas de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (A e B); sementes infectadas pelo fungo na vagem contendo escleródio (C); presença de escleródios acompanhando as sementes após a colheita (D). Fonte: adaptado de Esker et al. (2011)

2.2.4 Ciclo da doença e epidemiologia

A sobrevivência do patógeno ocorre na forma de micélio dormente em sementes, ou por escleródios presentes no solo ou acompanhando a massa de sementes, os quais podem germinar miceliogenicamente ou carpogenicamente (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999; PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Os escleródios presentes no solo, sob temperatura na faixa de 10 a 21°C e condições de alta umidade, germinam e desenvolvem os apotécios (ALMEIDA et al., 2005). Os apotécios, geralmente, são produzidos após o fechamento das entrelinhas, pois o sombreamento auxilia na manutenção de níveis elevados de umidade no solo, sendo este um fator primordial na sua formação, o que explica a associação entre o início da doença pela ejeção de ascósporos com períodos prolongados de chuva e irrigação (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Cada apotécio produz milhares de ascos, formando milhões de ascósporos que são ejetados no ar e disseminados, principalmente, pelo vento, os quais podem sobreviver por até duas semanas no campo, causando infecções primárias nas plantas (BOLTON; THOMMA;

NELSON, 2006; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Para germinação dos ascósporos e consequente infecção, é necessária a presença de água livre e de uma fonte de nutrientes exógena, fornecida por tecidos senescentes e necróticos presentes no solo ou retidos nas hastes das plantas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Dessa forma, o processo de infecção tem início, geralmente, no período de fechamento da cultura e florescimento, pois flores senescentes servem como substrato para germinação dos ascósporos (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999).

Após a penetração do hospedeiro, o patógeno se desenvolve inter e intracelularmente com o crescimento de hifas, as quais, posteriormente, se enovelam, dando origem a novos escleródios (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Após 72 horas do desenvolvimento do micélio, escleródios já podem ser formados (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Aqueles formados na mesma safra não têm a capacidade de germinarem carpogenicamente (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999), permanecendo no solo ou nos restos culturais, assegurando a sobrevivência do patógeno.

A germinação miceliogênica ocorre com a formação de hifas que penetram e colonizam diretamente o hospedeiro. Sementes infectadas podem apodrecer e não germinar, sobre as quais são formados escleródios (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Quando germinam, as plântulas podem morrer logo em seguida (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999) ou originar plantas doentes (PAULA JÚNIOR et al., 2010). O ciclo da doença pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Ciclo e sintomatologia da doença mofo branco causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Adaptado de Agrios (2005)

2.2.5 Importância da semente no desenvolvimento da doença

Em sementes, o patógeno pode estar aderido à superfície externa ou infectando internamente os seus tecidos, bem como acompanhando-as na forma de escleródios. Sementes infectadas com micélio dormente ou apresentado escleródios são consideradas a principal forma de disseminação do patógeno a longas distâncias (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999) e a mais importante fonte de inóculo primário da doença (GOULART, 2005). Diante disso, a detecção do fungo em sementes e a determinação da taxa de transmissão são primordiais no estabelecimento de medidas de controle.

Hoffman et al. (1998) verificaram 0,3 a 0,7% de incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, colhidas em áreas com incidência da doença de 0 a 95%. Henneberg et al. (2012) analisaram sementes de soja provenientes de áreas com mofo branco e observaram incidência de, no máximo, 1,5%. Apesar da baixa incidência de *S. sclerotiorum* em sementes, aquelas que apresentam o patógeno podem germinar e morrer rapidamente por tombamento, originar plantas doentes (PAULA JÚNIOR et al., 2010) ou nem mesmo germinar, podendo, nestas, ocorrer a formação de 3 a 7 escleródios (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Estes escleródios, quando no solo ou nos restos culturais, podem ser disseminados por água de enxurrada e de irrigação, implementos agrícolas e animais (PAULA JÚNIOR et al., 2010),

contribuindo na dispersão da doença dentro da área de cultivo ou para outros locais, além da possível introdução em áreas nas quais a doença não ocorre. O mesmo acontece quando se detecta a presença de escleródios acompanhando as sementes. Neste caso, entretanto, o beneficiamento pode ser eficiente na eliminação de escleródios, especialmente as etapas de pré-limpeza e limpeza, realizadas pela máquina de ventilador e peneiras, operações que reduzem significativamente o número de escleródios do lote de sementes (TELES, 2012).

O período de sobrevivência do patógeno em sementes com micélio dormente no tegumento e nos cotilédones, pode ser superior a 5 anos, dependendo das condições de armazenamento (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Na cultura do feijão, Tu (1988) observou que o fungo pode sobreviver em sementes infectadas na forma de micélio dormente por mais de três anos e que, após esse período, o micélio foi capaz de infectar as plantas de feijão originadas a partir dessas sementes. Este fato evidencia a importância da semente como fonte de inóculo e de transmissão do patógeno. Diante da importância da doença e dificuldade de controle após a sua introdução em uma área, a detecção do patógeno em sementes e o uso de sementes saudáveis são medidas indispensáveis. Neste contexto, testes de sanidade são essenciais na detecção segura do patógeno em sementes.

Dentre os métodos recomendados para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes pelas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009a), encontram-se o meio de cultura ágar-bromofenol (Neon), incubação em rolo de papel e em papel de filtro. A detecção do patógeno, por esses métodos, em sementes naturalmente infectadas, nem sempre origina resultados confiáveis. Henneberg et al. (2012) verificaram que, em sementes inoculadas artificialmente, com alta incidência, o patógeno pôde ser detectado em 100% das sementes, entretanto, em amostras provenientes de áreas com a ocorrência da doença, a detecção foi mais difícil, sendo que os resultados não apresentaram repetibilidade.

O número de sementes recomendado pelas RAS (BRASIL, 2009a) para análise de sanidade, é de 400 sementes. Entretanto, devido à inconsistência de grande parte dos resultados gerados na detecção de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes, este padrão utilizado pode não ser um número suficiente para a detecção segura e confiável. Consequentemente, amostras com a presença do patógeno podem apresentar resultado falso negativo e serem levadas para o campo como se fossem isentas, contribuindo na disseminação do inóculo.

As sementes podem ser consideradas o veículo mais eficiente de disseminação dos patógenos, pois as mesmas constituem-se em um abrigo seguro à sobrevivência e eficiente transporte do patógeno a distâncias consideráveis (DHINGRA, 2005). A presença dessas sementes infectadas, além de contribuírem na disseminação do fungo para novas áreas, também

assumem papel importante no aumento da intensidade da doença, quando ocorre a transmissão do patógeno da semente para a parte aérea, originando plantas doentes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

2.2.6 Métodos de manejo

O mofo branco é uma doença de difícil controle, devido, principalmente, à formação de estruturas de resistência que garantem a sobrevivência do patógeno por longos períodos no solo. Diante disso, a principal medida de controle da doença é a prevenção, evitando a entrada do patógeno na área, pois, após introduzido no local, é praticamente impossível erradicá-lo (ALMEIDA et al., 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Após detectada a doença no campo, a utilização de diferentes técnicas de controle, realizadas em conjunto, são essenciais para a manutenção do inóculo em baixos níveis.

Dentre as medidas de exclusão, o uso de sementes saudáveis é um aspecto fundamental no manejo da doença. O uso de sementes infectadas com micélio dormente ou contaminadas com escleródios tem sido o principal veículo de introdução do fungo em novas áreas (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Por ser um fungo polífago, o mesmo pode estar associado às sementes de outras espécies de plantas além da cultura da soja, podendo, através destas, ser introduzido na lavoura. Assim, atenção à qualidade sanitária dessas sementes também deve ser dada.

A utilização de sementes certificadas não é garantia que as mesmas apresentam-se livres do patógeno (PAULA JÚNIOR et al., 2010), pois testes de sanidade que garantiriam a qualidade sanitária dessas sementes não são um parâmetro obrigatório na sua comercialização. Entretanto, constitui-se na melhor alternativa para o produtor (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Exigir teste de sanidade do lote de sementes a ser adquirido e não utilizar sementes de áreas com histórico da doença, são medidas essenciais na exclusão do patógeno. Além disso, em alguns casos, o rebeneficiamento das sementes adquiridas pode contribuir na redução do inóculo (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O tratamento de sementes com fungicidas é, também, uma alternativa no manejo da doença. É uma tecnologia de baixo custo, pouco risco ambiental e, em geral, apresenta efeito significativo na produtividade (MENTEN et al., 2005). Rashid e Swanson (2008), comparando os ingredientes ativos tiofanato metílico, vinclozolin, azoxistrobina e fludioxonil, observaram redução da incidência da infecção inicial por *S. sclerotiorum*, evitando perdas no rendimento na proporção de 60 a 84% na cultura do girassol. Mueller, Hartman e Pedersen (1999) avaliaram o crescimento micelial, a partir de sementes tratadas quimicamente, e verificaram que os

fungicidas fludioxonil, captana + PCNB + tiabendazol, carboxina + tiram e tiabendazol + tiram inibiram completamente o crescimento micelial, enquanto os tratamentos tiabendazol, tiram e tiabendazol + tiram reduziram em 90%. Os mesmos autores constataram redução superior a 98% na formação de escleródios, a partir de sementes tratadas com fludioxonil, tiram e captana + PCNB + tiabendazol.

Além do efeito direto sobre o controle de patógenos associados às sementes, o tratamento de sementes pode auxiliar no controle de patógenos foliares iniciais, habitantes do solo e fungos de armazenamento, protegendo as sementes durante o processo de germinação e nas fases iniciais de desenvolvimento, assegurando um estande inicial uniforme, com a formação de plantas mais vigorosas, além de atrasar o início de epidemias no campo (MACHADO, 2000; MENTEN; MORAES, 2010).

Deve-se lembrar que o tratamento não substitui o emprego de sementes sadias, como também necessita do uso integrado com outras medidas de controle para ser eficaz, principalmente com a rotação de culturas, pois o bom desempenho desses produtos é dependente da população de fungos presentes no solo, ou seja, são influenciados pela pressão de inóculo do patógeno no solo (GOULART, 2005). Apesar dos benefícios proporcionados pelo tratamento de sementes, existem poucos produtos registrados para este fim no controle do mofo branco. Para o tratamento de sementes na cultura da soja, existe um único produto registrado com nome comercial Certeza, mistura de fluazinam + tiofanato metílico (AGROFIT, 2013). Diante da importância da semente como fonte de inóculo do patógeno *S. sclerotiorum*, pesquisas com relação à eficiência de moléculas para o tratamento de sementes e o registro desses produtos para o uso comercial, são de extrema necessidade.

A fungitoxicidade é a propriedade que uma substância química apresenta em ser tóxica aos fungos ou estramenópilas, em baixas concentrações (REIS; BRESOLIM, 2007; REIS; REIS; CARMONA, 2010). A toxicidade de uma determinada substância química é definida com base na CI_{50} , a qual corresponde à concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial ou da germinação de 50% dos esporos viáveis de um microrganismo (REIS; BRESOLIM, 2007; REIS; REIS; CARMONA, 2010). Além da CI_{50} , outros parâmetros também são utilizados para definir a toxicidade da substância, como DE_{50} (dose efetiva) ou CE_{50} (concentração efetiva) (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Para definir se uma substância é fungicida, ela deve ser classificada de acordo com os critérios propostos por Edgington e Klew (1971), nos quais compostos químicos que apresentam CI_{50} menor que 1 mg L^{-1} são altamente fungitóxicos, aqueles com CI_{50} entre 1 e 50 mg L^{-1} , moderadamente fungitóxicos, e os que exibem CI_{50} superior a 50 mg L^{-1} são

considerados não tóxicos. Portanto, quanto maior o valor estimado da CI_{50} , menos fungitóxico é o fungicida ao patógeno em questão. A unidade de 1 mg L^{-1} corresponde a $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o mesmo que 1 ppm (parte por milhão).

Blum (2009) propôs uma nova classificação para o patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, na qual CI_{50} menor que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, a substância é altamente fungitóxica, CI_{50} entre $0,1$ e 20 mg L^{-1} , fungitóxica, CI_{50} entre 21 e 100 mg L^{-1} moderadamente fungitóxica, e CI_{50} maior que 100 mg L^{-1} não tóxica. A CI_{50} é estimada *in vitro*, sendo específica para uma substância química e para um determinado patógeno (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Além do tratamento de sementes, aplicações de fungicidas na parte aérea podem auxiliar no controle do mofo branco. Entretanto, a redução da incidência da doença pelo uso de fungicidas varia de 0 a 60%, não sendo possível o controle absoluto da doença (ESKER et al., 2011). Dessa forma, o controle químico não deve ser utilizado isoladamente, e sim como um dos componentes do manejo integrado do mofo branco.

Para a obtenção de máxima eficiência do produto, a cobertura e o momento de aplicação são fatores fundamentais. As pulverizações devem ser realizadas preferencialmente no estágio R1 (início do florescimento), sendo que a eficácia decai rapidamente após os sintomas serem visíveis nas plantas (ESKER et al., 2011). A cobertura deve ser realizada de tal modo que as partes mais baixas das plantas sejam atingidas, pois são nas partes inferiores que as infecções se iniciam. Devem ser utilizadas gotas de tamanho médio e volumes de calda maiores podem trazer melhores resultados (ESKER et al., 2011). Para a cultura do feijão, é recomendável a utilização de 500 L ha^{-1} de calda (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Existem registrados no mercado 14 produtos comerciais para o controle químico do mofo branco na cultura da soja (AGROFIT, 2013), tendo como ingredientes ativos fluazinam, carbendazim, tiofanato metílico, cloreto de benzalcônio e procimidona. Os fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis têm sido amplamente utilizados, além dos ingredientes ativos procimidona, iprodiona, fluazinam e fluopyram, os quais têm apresentado resultados satisfatórios a nível experimental no controle de mofo branco (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010).

Não existem cultivares de soja completamente resistentes ao mofo branco, porém algumas podem apresentar resistência parcial (DORRANCE; MILLS, 2008; ESKER et al., 2011; FARIAS NETO et al., 2008). Período de floração mais curto, reduzindo o período crítico da doença, porte mais ereto e produção de pouca folhagem são características das cultivares que podem contribuir para menor suscetibilidade das plantas, pois permitem maior aeração e penetração de luz (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Apesar da ampla gama de hospedeiros suscetíveis a *Sclerotinia sclerotiorum*, a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, principalmente gramíneas, pode auxiliar na redução do inóculo na área. Além da degradação natural dos escleródios por microrganismos (LEITE, 2005), a utilização de culturas não hospedeiras permite que escleródios germinem, formando apotécios e ascósporos, os quais não conseguem infectar as plantas, ocorrendo redução na quantidade de escleródios presentes no solo (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

A escolha da época de cultivo deve ser realizada de forma a evitar períodos chuvosos durante os estádios mais críticos da cultura, durante o florescimento e a formação de vagens, pois esta é uma condição favorável ao desenvolvimento da doença. Da mesma forma, o controle da água de irrigação deve ser feito, principalmente nesses períodos de maior suscetibilidade das plantas (ESKER et al., 2011). Com relação ao local de semeadura, deve-se dar preferência para áreas sem histórico da doença, sendo esta medida essencial para campos de produção de sementes, além de priorizar o cultivo em locais bem drenados e ensolarados (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O aumento do espaçamento entre plantas e a diminuição da densidade de plantas proporcionam maior aeração (ESKER et al., 2011; FURLAN, 2012; LEITE, 2005), evitando a formação de microclima favorável à doença, além de diminuir a possibilidade de contato entre plantas doentes com plantas saudáveis que estão nas proximidades (LEITE, 2005). Contudo, esta prática nem sempre resulta em incremento no rendimento (ESKER et al., 2011). Deve-se evitar adubações excessivas de nitrogênio em áreas com histórico da doença, pois os tecidos das plantas podem se tornar mais suscetíveis ao patógeno (LEITE, 2005).

O sistema de plantio direto desfavorece a ocorrência da doença mofo branco quando comparado ao plantio convencional. A presença da palhada, no plantio direto, impede o contato da planta com o solo contaminado, dificulta a formação de apotécios e dispersão de ascósporos, favorece a ação de microrganismos antagonistas e, dependendo do tipo de palhada utilizado, substâncias tóxicas são liberadas, as quais atuam diretamente sobre os escleródios, reduzindo sua viabilidade (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O uso de determinados herbicidas pode apresentar efeitos benéficos no controle do mofo branco, apresentando diferentes mecanismos de ação. Alguns ingredientes ativos induzem a planta a produzirem compostos antimicrobianos, outros estimulam a germinação de escleródios, tendo efeito positivo quando utilizados com culturas não hospedeiras pela diminuição do inóculo na área ou também podem causar efeito contrário, e inibir a germinação dessas estruturas de resistência, formando apotécios anormais ou não produzindo ascósporos (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O controle biológico pode fazer parte do manejo integrado da doença, apresentando resultados promissores. Existem mais de 30 espécies de agentes de controle biológico estudadas, dentre as quais encontram-se fungos, bactérias, insetos e outros microrganismos, que agem como parasitas ou antagonistas do fungo *S. sclerotiorum* (STEADMAN, 1979). Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam-se como potenciais agentes de biocontrole, por diversas características, dentre as quais pode-se citar o rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de substâncias antimicrobianas e a capacidade de sobreviver como saprófita, simbiote ou como micoparasita (ALVARENGA et al., 2007). O fungo *Coniothyrium minitans* é considerado um importante agente de controle biológico em diversos países, entretanto, nas condições brasileiras, não existem estudos sobre sua utilização no controle do mofo branco (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Outras medidas podem ser utilizadas no manejo da doença, como: eliminação de plantas daninhas, as quais podem ser hospedeiras do patógeno (DORRANCE; MILLS, 2008; ESKER et al., 2011); a solarização do solo, por ser eficiente na eliminação de escleródios, diminuindo o potencial de inóculo, porém seu uso é limitado para pequenas áreas, sendo inviável em áreas extensas (PAULA JÚNIOR et al., 2010); e utilização de substâncias capazes de induzir resistência em plantas ao ataque de *S. sclerotiorum* (MARCUCCI et al., 2010; MOLLOY; CHEAH; KOOLAARD, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes e Laboratório de Micologia, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, e no Laboratório de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, em Piracicaba, SP.

3.1 Sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja ao longo do armazenamento e seu efeito sobre a germinação

Sementes de soja foram inoculadas artificialmente com três isolados de *S. sclerotiorum* obtidos a partir de soja, nabo e feijão, as quais foram armazenadas em dois ambientes, sob câmara fria e seca (20°C e 45% umidade relativa) e em laboratório, ambiente onde a temperatura e umidade foram monitoradas diariamente com auxílio de termohigrômetro. A temperatura máxima média ocorrida no período de armazenamento em laboratório foi de 26 °C, a temperatura mínima média foi de 24 °C e a umidade máxima e mínima foram de 52% e 36%, respectivamente.

O período de armazenamento foi de 8 meses e a cada 2 meses avaliações quanto à incidência do patógeno e germinação das sementes, foram realizadas de acordo com o método do meio ágar-bromofenol (Neon) e rolo de papel, respectivamente.

3.1.1 Obtenção do inóculo

Os isolados do patógeno foram obtidos a partir de amostras de soja, nabo e feijão provenientes de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente.

O isolado de soja foi obtido a partir do crescimento micelial de sementes infectadas. A partir destas, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (15g de ágar, 20g de dextrose e 200g de batata para um litro de água destilada), incubadas por 6 dias a 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro. Dessas colônias, discos foram retirados e colocados em novas placas com meio BDA, incubadas nas mesmas condições, para obtenção de colônias puras.

Para os isolados de nabo e feijão, coletaram-se os escleródios presentes na fração impura das amostras de sementes, os quais foram inicialmente mergulhados em hipoclorito de sódio 1% durante 3 minutos, lavados em água destilada e esterilizada e parcialmente secos em papel para retirada do excesso de umidade. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e colocados em câmara de incubação, durante 6 dias, à temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro. Para a obtenção de

colônias puras, após o crescimento miceliogênico obtido a partir dos escleródios, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das margens das colônias e transferidos para placas de Petri com meio BDA, incubadas por 6 dias à $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro.

Para preservação dos isolados, utilizou-se o método de Castellani e o armazenamento sob baixa temperatura de placas de Petri contendo colônias do fungo.

3.1.2 Inoculação artificial de sementes de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* e armazenamento

Para inoculação, utilizaram-se sementes de soja da cultivar Energia, safra 2011/12, apresentando germinação inicial acima de 90% e isentas de *S. sclerotiorum*. A análise sanitária, para detecção de outros patógenos foi realizada pelo método do papel de filtro, de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009a) e detectou-se a presença de outros fungos, nas seguintes proporções: 3% de *Penicillium* sp., 2% de *Aspergillus* sp., 1% de *Phomopsis* sp. e 1% de *Cercospora kikuchii*.

As sementes foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio 1% durante 2 minutos, lavadas em água destilada e esterilizada e secas ao ar, sobre papel, por 24 horas.

A partir de colônias puras dos isolados, discos de micélio foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de Petri 150 x 15 mm de diâmetro contendo meio BDA (2 discos/placa), as quais foram incubadas em câmara por 6 dias, fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro e temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as sementes foram colocadas em contato com as colônias, dispostas em uma única camada. A testemunha constituiu-se de sementes colocadas em BDA sem a presença do fungo. Após 24 horas, foram secas ao ar, sobre papel. Como o objetivo era a detecção do inóculo presente internamente às sementes, as mesmas foram submetidas, novamente, ao procedimento de assepsia com hipoclorito de sódio 1% durante 1 minuto, lavadas em água destilada e esterilizada e secas ao ar em papel absorvente por um período aproximado de 7 dias, até as sementes apresentarem teores de água próximo de 12%, valor considerado adequado para sua conservação. Posteriormente, as sementes foram embaladas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria e seca e em laboratório.

3.1.3 Avaliação da incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja

Para avaliação da incidência de *S. sclerotiorum* utilizou-se o meio ágar-bromofenol (Neon). Este meio constitui-se por BDA, acrescido de 0,15 g/l de azul de bromofenol, 0,15 g/l de sulfato de estreptomicina e 0,30 g/l de penicilina G, semelhante ao recomendado por Brasil (2009a). Ajustou-se o pH do meio BDA para 4,7, utilizando-se HCl ou NaOH e, em seguida,

este foi autoclavado a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Posteriormente, após o seu resfriamento à temperatura próxima de 50°C, foram adicionados o corante azul de bromofenol e os antibióticos sulfato de estreptomicina e penicilina G, com agitação constante até a homogeneização dos produtos e, então, vertidos em placas de Petri 90 x 15 mm. Após solidificação e um período de 12 horas de repouso, foram colocadas 10 sementes por placa contendo meio Neon, mantidas em câmara de incubação sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 8 dias, na ausência de luz.

Durante o período de incubação, realizaram-se observações diárias para verificar a formação de halos amarelo avermelhados, ao redor das sementes infectadas com *S. sclerotiorum*, e a presença de micélio superficial de coloração branca típica do fungo, como também a formação de escleródios. Apesar deste método ser específico para detecção de *S. sclerotiorum*, existem fungos capazes de alterar a coloração do meio, como espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Sclerotium* e *Rhizopus* (BRASIL, 2009a). Nestes casos, a formação de frutificações típicas dessas espécies permitem distinguí-los de *S. sclerotiorum* (Figura 3).

Figura 3 - Formação de halo típico indicativo da presença de *Sclerotinia sclerotiorum* em semente de soja (à esquerda) e crescimento de *Rhizopus* sp. (à direita) em meio ágar-bromofenol

3.1.4 Avaliação da germinação das sementes de soja

O método empregado para avaliação da germinação das sementes foi o rolo de papel, realizado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009a). Entretanto, uma pequena alteração foi necessária no número de sementes utilizadas, a qual foi modificada para 25 sementes/rolo. Esta medida foi necessária para evitar contaminações nas linhas em função do próprio patógeno, *S. sclerotiorum*.

As sementes foram colocadas para germinar entre papel, duas folhas abaixo e uma acima, umedecidas com água destilada e dobradas, formando rolos, contendo cada um 25 sementes. A quantidade de água adicionada correspondeu a 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida, os rolos foram acondicionados em germinador regulado para a temperatura de 25°C e umidade relativa próxima de 100%.

Realizaram-se duas avaliações, a primeira ao 5º dia após a instalação do teste e a segunda ao 8º dia, como recomendado por Brasil (2009a) para a cultura da soja. Na primeira avaliação, foram contabilizadas plântulas normais, anormais infeccionadas e sementes mortas com a presença de micélio ou escleródios de *S. sclerotiorum*. A retirada das plântulas anormais e sementes mortas, nesse caso, foi realizada com o intuito de prevenir a contaminação de plântulas sadias presentes nos rolos. Na segunda contagem, verificou-se a presença de plântulas normais, anormais e sementes mortas. A quantidade de plântulas normais somadas nas duas contagens resultou na percentagem de germinação.

3.1.5 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3x2 (épocas, isolados, ambientes), com 4 repetições de 100 sementes, nas avaliações da incidência de *S. sclerotiorum*, e 4 repetições de 50 sementes para os testes de germinação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$) pelo programa estatístico Assistat Versão 7.7 beta.

3.2 Avaliação do tamanho de amostra de sementes de soja na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*

Utilizaram-se 10 amostras representativas de lotes de sementes de soja, provenientes de áreas com histórico da doença mofo branco, todas da safra 2012/13, com exceção de uma amostra da safra 2011/12. Avaliaram-se tamanhos crescentes do número de sementes para detecção do fungo, constituindo quatro tratamentos: 400, 800, 1600 e 2400 sementes, divididas em 4 repetições de 100 sementes, 4 repetições de 200, 4 repetições de 400 e 4 repetições de 600, respectivamente.

A relação das amostras avaliadas, juntamente com suas respectivas cultivares, locais de cultivo e safra, estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1 - Procedência das amostras de sementes de soja submetidas à detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*

Referência da amostra e cultivar	Local de cultivo	Safra
(1) Coodetec 219 RR	Santo Antônio de Posse - SP	2011/12
(2) BRS 284	Itararé - SP	2012/13
(3) NK 7059	Campos Novos - SC	2012/13
(4) M 9144 RR	Oeste da Bahia	2012/13
(5) Emgopa 313 RR	São Miguel do Passa Quatro - GO	2012/13
(6) M 7739/PRO	São Miguel do Passa Quatro - GO	2012/13
(7) M 8210/PRO	São Miguel do Passa Quatro - GO	2012/13
(8) NA 7337 RR (lote 224)	Leopoldo dos Bulhões - GO	2012/13
(9) NA 7337 RR (lote 228)	Leopoldo dos Bulhões - GO	2012/13
(10) M 7908 RR	Goianira - GO	2012/13

3.2.1 Amostragem das sementes de soja

O método de amostragem foi baseado no “método modificado de redução pela metade” (MATHUR; KONGSDAL, 2003). Primeiramente, as sementes foram misturadas em um recipiente plástico até completa homogeneização. Sobre uma estrutura de metal, contendo bandejas plásticas (30 x 22 x 8 cm), dispostas duas a duas, as sementes foram colocadas em ziguezague, horizontal e verticalmente, como exemplificado na Figura 4. Após todo o conteúdo ser disposto nas bandejas, de cada uma, retirou-se com auxílio de um Becker, cerca de 40 mL de sementes, em diferentes pontos e, em seguida, armazenadas em sacos de papel, formando as amostras de trabalho. A quantidade a ser amostrada foi estimada de acordo com o número de sementes que constituíram os tratamentos (400, 800, 1600 e 2400 sementes).

Figura 4 - Amostragem de sementes de soja: homogeneização da amostra (A); esquema de distribuição das sementes horizontalmente (B) e verticalmente (C); finalizada a distribuição das sementes (D)

3.2.2 Avaliação da incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*

As sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% durante 3 minutos, passadas em água destilada e esterilizada e parcialmente secas em papel absorvente. Utilizou-se para quantificação da incidência do patógeno o meio ágar-bromofenol. O procedimento é o mesmo descrito no item 3.1.3.

3.2.3 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de significância, pelo programa Assistat Versão 7.7 beta. Em função da natureza dos dados, utilizou-se a transformação raiz quadrada de $x + 0,5$.

3.3 Sensibilidade *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas

Para avaliação da sensibilidade de *S. sclerotiorum* a fungicidas, utilizou-se um único isolado do patógeno. Os fungicidas utilizados foram selecionados com base nos ingredientes ativos registrados para o tratamento de sementes de soja, como também aqueles recomendados no controle do mofo branco para esta mesma cultura. Assim, os fungicidas avaliados foram: fluazinam (Frowncide 500 SC), tiabendazol (Tecto SC), piraclostrobina (Comet), metalaxil-M (Apron XL 350 FS), captana (Captan SC), carbendazim (Derosal 500 SC), difenoconazol

(Spectro), fludioxonil (Maxim), fluquinconazol (Atento), flutriafol (Vincit 50 SC), tiofanato metílico (Cercobin 500 SC), tiram (Rhodiauram SC) e procimidona (Sumilex 500 WP).

Inicialmente, as doses utilizadas foram 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 mg L⁻¹ para todos os produtos. Após, as doses foram ajustadas conforme a CI₅₀ de cada fungicida e o experimento foi refeito. Nesta etapa, as doses utilizadas foram: 0, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ para fludioxonil, fluazinam e fluquinconazol; 0, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ para difenoconazol, piraclostrobina e procimidona; 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 e 5 mg L⁻¹ para flutriafol, carbendazim, tiabendazol, tiofanato metílico e tiram; 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ para captana; e 0, 1, 10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹ para metalaxil-M.

3.3.1 Obtenção do inóculo

O isolado foi obtido a partir do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em sementes de soja provenientes do município de Papanduva, Santa Catarina. A partir de sementes infectadas, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após 6 dias de incubação, sob fotoperíodo alternado e temperatura de 20±2°C, discos foram recolhidos das colônias e transferidos para placas com BDA, obtendo-se colônias puras.

A preservação do patógeno foi realizada pelo método de Castellani e em placas de Petri contendo colônias do fungo, as quais foram armazenadas em baixa temperatura.

3.3.2 Preparo das diluições e incorporação dos fungicidas ao meio de cultura

Para avaliação do crescimento micelial em relação à sensibilidade de *S. sclerotiorum*, utilizou-se o método de incorporação de fungicida ao meio de cultura fundente. Primeiramente, foram preparadas as diluições dos produtos em água destilada e esterilizada. Calculou-se a quantidade de produto comercial necessária para a obtenção de uma suspensão estoque de 10.000 mg L⁻¹ de ingrediente ativo. A partir desta, diluições seriadas foram preparadas, obtendo-se suspensões com as concentrações de 1000, 100, 10, 1 e 0,1 mg L⁻¹.

O meio de cultura BDA foi autoclavado e, quando este atingiu temperatura próxima de 45 °C, os volumes necessários foram transferidos ao meio para a obtenção das concentrações finais desejadas. Após o fungicida ser incorporado ao meio, o mesmo foi adicionado em placas de Petri 90 x 15mm. Após 24 horas de repouso, colocou-se na região central de cada placa, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do isolado de *S. sclerotiorum*, obtido a partir de colônias com 5 dias. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições

assépticas. A incubação foi realizada em câmara de crescimento, sob temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro.

3.3.3 Avaliação do crescimento micelial e formação de escleródios

A avaliação do crescimento micelial foi realizada com auxílio de paquímetro digital, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos ortogonais, uma única vez, no momento em que ocorreu o primeiro contato da colônia do fungo com a borda da placa. Após 15 dias de incubação, quantificou-se o número e a massa dos escleródios formados em cada repetição, de cada tratamento.

3.3.4 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Com os dados obtidos calculou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial dos tratamentos, em relação à testemunha, e os resultados foram submetidos à análise de regressão pelo programa Assistat Versão 7.7 beta. Através das equações de regressão, estimaram-se os valores de CI_{50} e CI_{100} de cada produto.

Com relação aos dados sobre a produção e massa de escleródios, foram utilizados os valores absolutos, sem necessidade de análise estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja ao longo do armazenamento e seu efeito sobre a germinação

Os resultados das avaliações bimestrais da germinação das sementes de soja e incidência de *S. sclerotiorum*, ao longo dos oito meses de armazenamento sob ambiente controlado (câmara fria e seca) e não controlado (laboratório), estão descritos na Tabela 2 e Tabela 3. Os dados de temperatura e umidade relativa do ar, durante o período de armazenamento em laboratório, encontram-se na Figura 5. Em ambiente controlado, as condições de temperatura e umidade foram constantes (20 °C e 45% UR).

Em relação à germinação, a interação entre os três fatores avaliados, ambiente, épocas e isolados, não foi significativa. Não houve diferença entre os ambientes de armazenamento, sendo que, em ambos, ocorreu redução do potencial germinativo das sementes ao longo dos oito meses.

Em geral, em ambos os ambientes, percebeu-se redução da germinação a partir do segundo mês de armazenamento. Esta redução pode ter ocorrido em função de diversos fatores. A longevidade das sementes é influenciada pelo genótipo (MARCOS FILHO, 2005) e vigor das plantas das quais as sementes foram formadas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Além disso, a qualidade inicial das sementes, em função do que ocorreu a elas anteriormente ao armazenamento, também tem influência na sua conservação. Características como condições climáticas durante a maturação das sementes, grau de maturação no momento da colheita, ataque de pragas e doenças, injúrias mecânicas e danos sofridos durante o processo de secagem, são fatores que afetam a qualidade das sementes e sua viabilidade (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). É importante lembrar que as sementes foram inoculadas artificialmente, sendo que este procedimento pode ter afetado o potencial germinativo. Apesar das sementes utilizadas apresentarem fungos de armazenamento, como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., bem como outros patógenos, como *Phomopsis* sp. e *Cercospora kikuchii*, os quais podem causar efeitos negativos sobre as sementes, a incidência detectada foi baixa e, por isso, provavelmente, este não foi um fator que contribuiu para queda na germinação.

A partir do segundo mês de avaliação, esta redução permaneceu estável sob ambiente controlado, mas em ambiente sem controle, a germinação decresceu ainda mais nas demais épocas de avaliação. Apesar da temperatura não ter sofrido grandes variações neste ambiente, a umidade relativa do ar apresentou bastante oscilação (Figura 5).

Tabela 2 - Germinação (%) das sementes de soja inoculadas e não inoculadas (testemunha) com três isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, em cinco épocas de avaliação, armazenadas em dois ambientes

Germinação (%)						
Ambiente controlado		Testemunha	Is. Nabo	Is. Soja	Is. Feijão	Média
	out/12	90,5 aA*	75,5 aB	69,0 aC	32,0 aD	66,75 a
	dez/12	79,5 aA	68,5 aB	63,0 aB	29,5 bC	60,12 b
	fev/13	77,0 aA	65,5 aB	60,0 aC	30,0 bD	58,12 b
	abr/13	77,0 aA	65,75 aB	59,0 aC	29,0 bD	57,69 b
	jun/13	77,5 aA	65,0 aB	57,0 aC	29,5 bD	57,25 b
	Média	80,3 A	68,05 B	61,6 C	30,0 D	
Ambiente não controlado		Testemunha	Is. Nabo	Is. Soja	Is. Feijão	Médias
	out/12	90,5 aA	75,5 aB	69,0 aC	32,0 aD	66,75 a
	dez/12	79,0 aA	64,5 aB	67,5 aB	35,5 aC	61,62 b
	fev/13	77,0 aA	57,5 aB	56,5 aB	41,5 aC	58,12 c
	abr/13	75,0 aA	56,0 bB	52,0 aB	42,0 aC	56,25 c
	jun/13	64,0 bA	55,5 bB	45,5 bC	44,0 aC	52,25 d
	Média	77,1 A	61,8 B	58,1 B	39,0 C	

CV = 10,29%

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p = 0,05)

Tabela 3 - Incidência (%) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja inoculadas artificialmente com três isolados, em cinco épocas de avaliação, armazenadas em dois ambientes

Incidência (%)					
Ambiente controlado		Is. Nabo	Is. Soja	Is. Feijão	Média
	out/12	15,75 aA*	21,5 aB	30,0 aC	22,42 a
	dez/12	12,0 aA	15,75 aB	28,25 aC	18,67 b
	fev/13	12,75 aA	14,5 aB	28,5 aC	18,58 b
	abr/13	11,0 aA	15,0 aB	29,25 aC	18,42 b
	jun/13	11,25 aA	15,5 aB	29,5 aC	18,75 b
	Média	12,55 A	16,45 B	29,1 C	
Ambiente não controlado		Is. Nabo	Is. Soja	Is. Feijão	Média
	out/12	15,75 aA	21,5 aB	30,0 aC	22,42 a
	dez/12	10,25 aA	14,25 aB	27,75 aC	17,42 b
	fev/13	5,5 bA	11,5 aB	25,75 aC	14,25 c
	abr/13	3,75 bA	3,75 bA	25,5 aB	11,0 d
	jun/13	2,5 bA	2,25 bA	20,5 bB	8,42 e
	Média	7,55 A	10,65 B	25,9 C	

CV = 15,84%

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p = 0,05)

A temperatura e, principalmente, o grau de umidade das sementes são os principais elementos que afetam a velocidade e a intensidade de deterioração de sementes, pois aceleram

o seu metabolismo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005). Além disso, a semente é altamente higroscópica, e, por isso, variações no seu teor de água são fortemente influenciadas pela umidade relativa do ar, sendo que o controle desse fator é essencial na preservação do potencial fisiológico de sementes. Dessa forma, a queda da germinação das sementes em ambiente não controlado é justificada, especialmente, pela flutuação das condições de umidade. Martins-Filho et al. (2001) analisaram dez genótipos de soja, armazenadas em condições de ambiente natural, e verificaram que, após 180 dias de armazenamento, as sementes apresentaram alta redução na germinação. Da mesma forma, sementes de triticale foram monitoradas durante oito meses quanto ao potencial fisiológico e verificou-se que as sementes mantiveram o nível de germinação no armazenamento em câmara fria (10 °C), mas em condições de ambiente não controlado, a germinação das sementes armazenadas decresceu, aumentando a quantidade de sementes mortas devido à maior velocidade de deterioração (MEDINA; TANAKA; PARISI, 2009).

Figura 5 - Temperatura e umidade relativa do ar (%) durante o período de armazenamento (outubro de 2012 a junho de 2013) em laboratório

A presença do patógeno reduziu o potencial germinativo das sementes de soja em relação à testemunha, independente do isolado. Para ambos os ambientes, o isolado que causou maior redução foi o de feijão, seguido pelos isolados de soja e nabo em ambiente controlado, não havendo diferença estatística entre estes isolados no ambiente sem controle (Figura 6).

Em amostras naturalmente infectadas, a incidência de *S. sclerotiorum*, geralmente, é baixa e, devido a isso, provavelmente, o potencial germinativo das sementes é pouco afetado,

diferentemente do que ocorreu neste trabalho, no qual o potencial de inóculo do fungo nas sementes foi bem maior do que ocorre naturalmente em condições de campo. Quando comparadas amostras de feijão provenientes de áreas com ocorrência de mofo branco com sementes comprovadamente sadias, a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes de áreas com a doença variou de 0,5 a 2,25% e não houve diferença quanto à germinação entre amostras portadoras do patógeno e amostras isentas, evidenciando que o patógeno não interferiu no potencial germinativo das sementes (KOCH, 1998). Em sementes de soja, observou-se que, quando a incidência do fungo foi superior a 25%, o potencial germinativo foi afetado negativamente, como também a emergência em campo (NICHOLSON et al., 1972). Botelho (2011) comparou diferentes tempos de inoculação (0h, 24h, 48h e 72h) e verificou que a presença de *S. sclerotiorum* em sementes de soja interferiu na germinação de forma proporcional aos valores de potencial de inóculo do patógeno, causando uma redução média de 85% na germinação.

Na primeira época de avaliação, comparando-se a testemunha e os tratamentos inoculados com os isolados de nabo e soja, a redução da germinação foi proporcional à incidência do patógeno nas sementes, apresentando valores de 15% e 20% de incidência, respectivamente. Porém, o isolado de feijão não seguiu este comportamento, sendo que, para ele, a redução da germinação foi bem mais acentuada do que a incidência do fungo detectada, de 30%, não sendo atribuída apenas a este fator. Provavelmente, ocorreu contaminação de sementes sadias por sementes infectadas nos rolos, decaindo o poder germinativo. Além disso, atribui-se esta diferença, também, a maior agressividade do isolado.

À medida que as sementes permanecem armazenadas por um período mais longo, a tendência é que ocorra, naturalmente, a sua deterioração progressiva e, como consequência, redução na sua germinação. Mesmo não ocorrendo diferença estatística, o isolado de feijão, em ambiente sem controle, não apresentou este comportamento, ocorrendo um aumento na quantidade de plântulas normais. Supõe-se que este acréscimo seja em razão da diminuição da incidência de *S. sclerotiorum* observada ao longo do armazenamento, possibilitando o “escape” de plântulas. Quando avaliadas a germinação de cultivares de soja durante o armazenamento, verificou-se aumento neste parâmetro durante 60 até 90 dias, sendo atribuído em função da redução da incidência de fungos, principalmente *Phomopsis* sp. (MARTINS-FILHO et al., 2001).

Figura 6 - Teste de germinação de sementes de soja pelo método do rolo de papel em sementes não inoculadas (A) e inoculadas com isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* obtidos a partir da cultura do nabo (B), da soja (C) e do feijão (D); plântula infectada pelo fungo com a formação de escleródios (E)

Com relação à incidência do patógeno *S. sclerotiorum* nas sementes inoculadas, a interação entre os três parâmetros avaliados (ambiente, épocas e isolados) não foi significativa. Houve diferença entre os ambientes de armazenamento, bem como entre épocas e isolados, sendo que a incidência média do fungo foi superior em ambiente controlado.

Para ambos os ambientes, ocorreu redução da incidência, porém, esta diminuição foi muito mais acentuada no armazenamento em laboratório. A redução média de *S. sclerotiorum* durante os oito meses de armazenamento foi de, aproximadamente, 16% em ambiente controlado e de 62% em ambiente sem controle das condições de ambiente.

Em ambiente controlado, observou-se queda na incidência do patógeno no segundo mês de armazenamento, porém, a partir deste período, a incidência permaneceu estável ao longo do tempo, acompanhando o mesmo comportamento verificado para o potencial germinativo das sementes. Entretanto, nas sementes armazenadas sob condição ambiente, a incidência do patógeno decresceu a cada época de avaliação. Michelli et al. (2009) observaram que o período de armazenamento de seis meses, com temperatura variando de 22 a 25 °C e umidade relativa 55 a 60%, não diminuiu o inóculo de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão. Quando analisada a sobrevivência de fungos em sementes de soja durante o armazenamento, foi possível verificar que a viabilidade de *Bipolaris sorokiniana* permaneceu, praticamente, inalterada sob condições controladas, ocorrendo uma queda pouco pronunciada para *Pyricularia grisea*, *Fusarium graminearum* e *Alternaria alternata*, nas mesmas condições. Entretanto, quando analisada a viabilidade dos mesmos fungos sob ambiente não controlado, a incidência decresceu continuamente até o final do período de armazenamento, atingindo valores muito baixos (MEDINA; TANAKA; PARISI, 2009). A avaliação da sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho durante 12 meses de armazenamento em câmara fria (14 °C e 40% UR) e ambiente não controlado mostrou que, em condição ambiente, a sobrevivência foi bastante baixa, enquanto que, nas sementes conservadas em câmara fria, o tempo de armazenamento teve menor efeito sobre a sobrevivência do patógeno (TANAKA, 2001). Ao contrário dos resultados apresentados, quando avaliada a viabilidade dos fungos *Phomopsis sojae* e *Colletotricum dematium* var. *truncata*, verificou-se que o armazenamento das sementes de soja em câmara fria, por um período de seis meses, reduziu a incidência desses patógenos (GALLI; PANIZI; VIEIRA, 2007).

Observou-se que o isolado de feijão apresentou maior incidência de *S. sclerotiorum*, quando comparado com os isolados de soja e nabo, em ambos os ambientes de armazenamento. A incidência média do isolado de feijão foi de aproximadamente 27%, enquanto que o isolado de soja apresentou 13% e de nabo 10%. O procedimento de inoculação para todos os isolados foi exatamente o mesmo, porém, mesmo assim, o isolado de feijão foi capaz de infectar maior número de sementes, provando ser mais agressivo que os demais. Koch (1998) inoculou sementes de feijão com três isolados obtidos a partir da cultura do feijão e constatou diferença entre os isolados com relação ao nível de infecção nas sementes, mas somente quando submetidas a assepsia com hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos. Quando as sementes não sofreram assepsia após a inoculação, não houve diferença entre isolados quanto à incidência. A incidência dos isolados de feijão nas sementes inoculadas e submetidas à assepsia variou de 17,5% a 27,75%, valores semelhantes aos obtidos neste experimento. Em outro

trabalho, sementes de feijão foram inoculadas com dois isolados de *S. sclerotiorum* obtidos a partir de feijão e observou-se diferença significativa entre eles, no potencial de inóculo de 36 horas de contato, com diferença de 14% entre os isolados (ZANCAN, 2011). Entretanto, nem sempre ocorrem diferenças entre isolados quando inoculados artificialmente em sementes. Botelho (2011) utilizou dois isolados de *S. sclerotiorum*, obtidos a partir de sementes de soja, para inoculação de sementes da mesma cultura e não observou distinção, sendo que a incidência média foi próxima de 39%, para o tempo de contato de 24 horas. Percebe-se que os valores de incidência do patógeno em sementes inoculadas artificialmente são variáveis, em função de fatores como agressividade do isolado, cultivar e método de inoculação, principalmente com relação ao tempo de contato das sementes com a colônia do patógeno e assepsia.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a presença de *S. sclerotiorum* afetou negativamente a germinação de sementes de soja, podendo haver a ocorrência de isolados mais agressivos que outros. O poder germinativo das sementes decresceu ao longo do armazenamento, principalmente, quando armazenadas em ambiente sem controle das condições de temperatura e umidade. Da mesma forma, a incidência do patógeno em sementes também diminui com o passar do tempo, mas este efeito é pouco pronunciado quando o armazenamento é realizado em ambiente controlado, sendo muito mais acentuado em ambiente sem controle.

Independente do ambiente de armazenamento, é importante salientar que o fungo permaneceu viável nas sementes durante pelo menos oito meses. Dados encontrados na literatura relatam que na cultura do feijão, o fungo sobreviveu em sementes infectadas na forma de micélio dormente por mais de três anos e que, mesmo após esse período, o micélio foi capaz de infectar as plantas de feijão originadas a partir dessas sementes (TU, 1988). Os resultados apresentados comprovam a importância da semente como fonte de inóculo e evidenciam a importância da semente na disseminação de *S. sclerotiorum* em lavouras de diferentes locais, bem como a sua possível introdução em áreas livres da doença mofo branco por meio de sementes contaminadas.

4.2 Avaliação do tamanho de amostra de sementes de soja na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os resultados da incidência e frequência de ocorrência do patógeno, nas dez amostras de soja analisadas encontram-se na Tabela 4.

Não houve interação significativa entre cultivares e tamanhos de amostras, como também os tratamentos (tamanhos de amostras) não diferiram estatisticamente uns dos outros, ou seja, a incidência do patógeno manteve-se constante, independentemente do número de sementes

avaliadas. Contudo, a frequência de ocorrência do patógeno, quando utilizou-se 400 sementes, foi inferior a todos os outros tamanhos de amostras testados, sendo que neste tratamento, das dez amostras avaliadas, apenas em uma foi possível a constatação do patógeno. Quando comparado com os demais tratamentos, observou-se que, à medida que o número de sementes avaliadas aumentou, a frequência de ocorrência também foi maior, com um acréscimo de 10% a cada tratamento.

Quando amostradas 2400 sementes, foi possível detectar o patógeno em 40% das amostras avaliadas, valor quatro vezes superior em relação ao tratamento com 400 sementes. Quando utilizadas 1600 sementes, constatou-se a presença do fungo em 30% do total das amostras, ou seja, três vezes mais em relação ao tratamento com 400 sementes. Seguindo o mesmo comportamento, quando utilizaram-se 800 sementes, a frequência de ocorrência nas amostras em relação ao uso de 400 sementes dobrou, sendo de 20%.

Atualmente, o número de sementes recomendando pelas Regras para Análises de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009a) na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto no método do rolo de papel, quanto no meio Neon e papel de filtro, é de 400 sementes. A partir dos resultados obtidos, pôde-se constatar que o padrão utilizado não é o mais confiável, pois, mesmo a incidência não diferindo entre os tamanhos de amostras testados, em todos os outros tratamentos foi possível detectar o patógeno em maior número de amostras do que quando usadas 400 sementes.

A baixa incidência do patógeno em sementes, justifica a possibilidade de 400 sementes ser um número insuficiente para detectá-lo. Verificou-se neste trabalho, que em 5200 sementes analisadas, a incidência do fungo foi de, no máximo, 0,27%. Hoffman et al. (1998) observaram a incidência de 0,3 a 0,7% do fungo em sementes de soja colhidas em áreas com incidência da doença de 0 a 95%. Henning et al. (2009) verificaram que, em 10.400 sementes incubadas pelo método do papel de filtro, apenas oito apresentaram *S. sclerotiorum*, resultando em 0,077% de incidência.

Tabela 4 - Incidência (%) e frequência de ocorrência (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* em 10 amostras de sementes de soja, nas quantidades de 400, 800, 1600 e 2400 sementes analisadas

Incidência (%)					
Tratamento Amostra	T1	T2	T3	T4	Média
	(400 sem.)	(800 sem.)	(1600 sem.)	(2400 sem.)	
1	0,250 aB*	0,250 aAB	0,500 aA	0,082 aB	0,271 a
2	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,042 aA	0,011 b
3	0,000 aA	0,000 aA	0,125 bA	0,042 aA	0,042 b
4	0,000 aA	0,000 aA	0,062 bA	0,000 aA	0,016 b
5	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,000 aA	0,000 b
6	0,000 aA	0,125 aA	0,000 bA	0,000 aA	0,031 b
7	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,000 aA	0,000 b
8	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,000 aA	0,000 b
9	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,000 aA	0,000 b
10	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,042 aA	0,011 b
Média	0,025 A	0,037 A	0,069 A	0,021 A	
Frequência (%)	10	20	30	40	
Frequência total (%)	60				
CV (%) = 9,83					

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$); dados transformados por raiz quadrada de $x + 0,5$

A sensibilidade dos métodos de detecção de patógenos em sementes é primordial na elaboração de métodos, bem como na constatação segura desses patógenos. Para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes, os métodos mais comuns são o papel de filtro, rolo de papel e meio Neon, podendo cada um destes apresentarem variações com relação à temperatura, período e condições de incubação. Sete amostras de sementes de soja foram avaliadas pelos métodos do rolo de papel, do papel de filtro e do meio Neon e, constatou-se a presença do patógeno em uma única amostra, pelo meio Neon, com incidência de 0,75%, não sendo possível a detecção do fungo pelos outros métodos testados (CAMARGO et al., 2012a). Em contrapartida, foram analisadas 63 amostras de sementes de feijão pelo meio Neon e rolo de papel, sendo que a detecção do patógeno foi possível apenas pela metodologia do rolo de papel, em três amostras, variando a incidência de 0,25 a 1,25% (CAMARGO et al., 2012b). Sete amostras de soja provenientes de áreas com mofo branco e uma amostra inoculada artificialmente, foram analisadas pelas metodologias do papel de filtro com incubação a 7 °C, 14 °C e 20 °C; rolo de papel; e Neon-S. Nas sementes inoculadas, foi possível a detecção do fungo em 100% das sementes, por todas as metodologias avaliadas. Entretanto, nas sementes infectadas naturalmente, os métodos não apresentaram repetibilidade, sendo detectado o patógeno em

todas as amostras, mas não pelo mesmo método; além disso, a incidência máxima obtida foi de 1,5% (HENNEBERG et al., 2012).

A partir desses resultados, percebe-se que os métodos utilizados para detecção de *S. sclerotiorum* são sensíveis ao patógeno, pois em sementes inoculadas foi possível identificar a presença do fungo, mas não em sementes provenientes de áreas com a doença mofo branco. O problema na detecção do patógeno em sementes, não está na sensibilidade dos métodos, mas sim no fato do mesmo estar em baixa incidência, o que dificulta determinar a sua presença com segurança em amostras de campo. Assim sendo, justifica-se a utilização de um maior número de sementes nos testes de detecção além da quantidade padrão recomendada atualmente (400 sementes). Henneberg et al. (2012), ressalta, em seu trabalho, a possibilidade de que, quando analisadas somente 400 sementes, não se detecte a presença do fungo *S. sclerotiorum*, resultando em falsos negativos e aponta a necessidade de estudos de amostragem para determinar novos parâmetros de representatividade em testes de detecção de patógenos em sementes.

Os resultados apresentados neste trabalho, mostram, claramente, que, à medida que o número de sementes amostradas aumenta, a frequência com a qual o patógeno é detectado também aumenta, ampliando as chances de confirmar a presença do mesmo em amostras que poderiam ser consideradas isentas do fungo, caso um número menor de sementes fosse amostrado. Ainda assim, de um total de dez amostras, em seis delas detectou-se o patógeno, mas nem mesmo o tratamento contendo o maior número de sementes (2400), foi capaz de detectar o patógeno nas seis amostras positivas, sendo possível a detecção em apenas quatro delas. Mesmo nas amostras nas quais ele não foi identificado, existe a possibilidade de o patógeno estar presente, mas em função da quantidade amostrada, ele não ter sido encontrado.

Em termos de métodos de rotina utilizados atualmente, poderia ser inviável a utilização de um volume muito grande de sementes para detecção de um determinado patógeno, pois além de onerar os custos, o tempo necessário para instalação e avaliação também seriam dispendiosos. Apesar disso, para determinados patógenos considerados de alto risco, os métodos exigem um maior número de sementes. Este é o caso, por exemplo, para a detecção do fungo *Phoma lingam* para espécies de brássicas em geral, na qual o número mínimo de sementes recomendado pela International Seed Testing Association (ISTA, 2013) é de 1000 sementes. Também para espécies do gênero *Brassica*, na detecção de *Xanthomonas campestris*, recomenda-se a utilização de, pelo menos, 30000 sementes, pela relevância do patógeno e dos danos por ele causados, caso introduzido pelas sementes em campos de cultivo. Para detecção de *Ustilago nuda* em cevada, o número de sementes exigido é de 2000 a 4000 sementes e

extração e avaliação de 1000 embriões, um método extremamente trabalhoso, mas em razão da importância do patógeno, é um método consagrado pela ISTA desde 1964 (ISTA, 2013). Além destes casos citados, existem outros para os quais o número mínimo de sementes analisadas é muito superior à 400 sementes, padrão utilizado atualmente para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*. Como por exemplo, para a detecção de espécies bacterianas como *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, em cenoura (10.000 sementes) (ISTA, 2013), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* em feijão (5000 sementes) (ISTA, 2013); para viroses como o Pea Early-Browning Virus e Pea Seed-borne Mosaic Virus, em ervilha (2000 sementes) (ISTA, 2013); e até mesmo para nematoides como o *Aphelenchoides besseyi*, agente causal da ponta branca do arroz (30.000 sementes) (ISTA, 2013).

Sabe-se que um dos meios mais eficientes de disseminação de patógenos a longas distâncias e introdução em novas áreas é a semente. Mesmo quando presentes em baixo nível de inóculo, certos patógenos podem causar danos incalculáveis sob condições favoráveis. A partir de uma semente infectada com *S. sclerotiorum*, podem ser originados até sete escleródios (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). Cada escleródio tem capacidade de formar 20 apotécios, sendo que, de um único apotécio dois milhões de ascósporos podem ser liberados (STEADMAN, 1983; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Considerando-se uma densidade média de semeadura para a cultura da soja de 300.000 plantas ha⁻¹ e a incidência do patógeno de 0,25%, estariam presentes em um hectare 750 sementes infectadas. Se cada semente infectada desse origem a um escleródio, seriam 750 escleródios em um hectare, dos quais seriam originados 15.000 apotécios e dispersados 30 bilhões de ascósporos, possibilitando a ocorrência de 30 bilhões de focos de infecção. Supondo que apenas 1% dos ascósporos liberados fossem capazes de causar infecção, ainda seriam possíveis 300 milhões de focos de infecção. Além disso, deve-se levar em consideração o fato de que, após introduzido em uma área de cultivo, sua erradicação é praticamente impossível, devido ao longo período de sobrevivência dos escleródios, como também deve-se lembrar dos danos causados pela doença, sendo potencialmente destrutiva em ambientes favoráveis.

Diante disso, torna-se claro que *Sclerotinia sclerotiorum* deve ser considerado um patógeno de alto risco, sendo necessária a utilização de protocolos seguros na sua detecção em sementes, bem como o estabelecimento de limites máximos de tolerância do patógeno para comercialização de sementes. Os métodos utilizados são sensíveis ao patógeno, o problema está, provavelmente, no número de sementes amostradas, já que este fungo apresenta-se em

baixa incidência e, para ser detectado com confiabilidade, deve-se utilizar um número maior de sementes do que o padrão usado atualmente de 400 sementes.

4.3 Sensibilidade *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas

Existem poucos trabalhos sobre a eficiência de fungicidas utilizados no tratamento de sementes para este patossistema. Os resultados das concentrações inibitórias de 50% e 100% do crescimento micelial estão descritas na Tabela 5 e as percentagens de inibição do crescimento micelial, representadas graficamente na Figura 7 e Figura 8.

A maioria dos produtos apresentou CI_{50} abaixo ou muito próximo de 1 mg L^{-1} , com exceção do captana, que apresentou CI_{50} inferior a 10 mg L^{-1} e metalaxil-M, que mostrou o maior valor de CI_{50} , próximo de 60 mg L^{-1} . Os fungicidas flutriafol e tiram apresentaram CI_{50} próxima de 1 mg L^{-1} , enquanto que carbendazim, difenoconazol, fluquinconazol e piraclostrobina a CI_{50} foi menor que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e fludioxonil e fluazinam inferior a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$.

De acordo com os critérios de Edgington e Klew (1971), dos 13 ingredientes ativos comparados, apenas o metalaxil-M seria considerado não tóxico ao fungo *S. sclerotiorum*, pois apresentou CI_{50} superior a 50 mg L^{-1} . O flutriafol, tiram e captana se enquadrariam na classe de moderadamente fungitóxicos. Os fungicidas fluazinam, fludioxonil, fluquinconazol, difenoconazol, piraclostrobina, carbendazim, tiofanato metílico, tiabendazol e procimidona seriam altamente fungitóxicos, pois exibiram CI_{50} inferior a 1 mg L^{-1} . Valores inferiores a 1 mg L^{-1} foram suficientes para os fungicidas fluazinam, fludioxonil, fluquinconazol, difenoconazol e carbendazim inibirem 100% do crescimento micelial, evidenciando o alto poder de toxicidade dessas moléculas ao fungo. Para tiofanato metílico, tiabendazol, procimidona e piraclostrobina, a CI_{100} foi próxima de 3 mg L^{-1} . Para os produtos flutriafol, tiram e captana foram necessárias concentrações que variaram de 22 a 75 mg L^{-1} , sendo que para metalaxil-M a concentração estimada atingiu valor superior a 3000 mg L^{-1} , evidenciando seu baixo poder de controle para este patógeno.

O fungicida metalaxil-M é utilizado, especificamente, para o controle de oomicetos, portanto, sendo *S. sclerotiorum* um ascomiceto, esperava-se que o mesmo não apresentasse bom desempenho no seu controle. Os resultados obtidos são semelhantes aos relatados por Mueller, Hartman e Pedersen (1999), nos quais observam redução do crescimento micelial do patógeno desde a concentração de $0,1$ até 500 mg L^{-1} , mas com efeito muito inferior em comparação a outros fungicidas.

Tiram e captana são fungicidas imóveis, pertencentes aos grupos químicos dos ditiocarbamatos e dicarboximidas, introduzidos no mercado na década de 30 e 40, respectivamente, mas, mesmo sendo moléculas antigas, ainda hoje são muito utilizadas no tratamento de sementes (KIMATI, 2011). Segundo os critérios de Edgington e Klew (1971), foram classificados como medianamente tóxicos a *S. sclerotiorum*, sendo que, em números absolutos, o tiram apresentou melhor desempenho em relação ao captana. Ensaio contendo o ingrediente ativo tiram, revelaram valores de CI_{50} para 105 isolados de *S. sclerotiorum* próximos de 8 mg L^{-1} (DUAN et al., 2012), mesmo sendo superior ao observado neste trabalho, se enquadra na mesma classificação. Em outro ensaio, tiram e captana foram capazes de promover a inibição total do crescimento micelial, nas concentrações de 100 e 500 mg L^{-1} , respectivamente, mostrando maior ação fungitóxica do tiram (MUELLER; HARTMAN; PEDERSEN, 1999). Na inibição do crescimento micelial de *S. minor*, tanto tiram quanto captana promoveram inibição do crescimento, mas foram menos efetivos em comparação a outros fungicidas, como tiofanato metílico (BOWEN et al., 2000), seguindo o mesmo comportamento observado neste trabalho.

Difenoconazol, fluquinconazol e flutriafol são fungicidas sistêmicos e, apesar de serem triazóis e possuírem, basicamente, o mesmo mecanismo de ação, apresentaram comportamentos distintos no controle micelial de *S. sclerotiorum*, sendo o flutriafol moderadamente fungitóxico e difenoconazol e fluquinconazol altamente fungitóxicos. Zancan et al. (2012) avaliaram a ação do fluquinconazol sobre dois isolados de *S. sclerotiorum* e observaram crescimento micelial nas concentrações de 5 a 500 mg L^{-1} , para um dos isolados testados, porém o mesmo não ocorreu para o outro, no qual ocorreu inibição completa a 5 mg L^{-1} . Do mesmo grupo dos triazóis, o fungicida tebuconazol foi capaz de inibir completamente o crescimento micelial na concentração de 10 mg L^{-1} , apresentando CI_{50} inferior a 1 mg L^{-1} (MUELLER et al., 2002), resultados semelhantes aos apresentados.

Os fungicidas sistêmicos tiofanato metílico, tiabendazol e carbendazim são benzimidazóis, já sendo conhecidos os efeitos positivos das moléculas desse grupo químico sobre o controle do mofo branco, e, por isso, muito utilizados em pulverizações na parte aérea (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Os três ingredientes ativos citados apresentaram bom desempenho no controle do crescimento micelial *in vitro*, promovendo a inibição em todas as concentrações testadas, considerados como altamente fungitóxicos ($CI_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$), segundo os critérios de Edgington e Klew (1971). Resultados semelhantes são encontrados na literatura, comprovando o bom desempenho desses produtos, apesar da existência de relatos sobre possíveis casos de resistência de *S. sclerotiorum* aos benzimidazóis

(MA et al., 2009; MUELLER et al., 2002). Figueirêdo et al. (2010), observaram redução do crescimento micelial na concentração de 1 mg L⁻¹ de tiofanato metílico e inibição completa a 10 mg L⁻¹. Outros estudos mostraram inibição de 50% do crescimento micelial com a concentração de 2,2 mg L⁻¹ (MUELLER et al., 2002) e inferior a 5 mg L⁻¹ (ZANCAN et al., 2012) de tiofanato metílico. O ingrediente ativo tiabendazol foi capaz de reduzir quase 100% do crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum* a 10 mg L⁻¹, apresentando CI₅₀ inferior a 1 mg L⁻¹ (MUELLER; HARTMAN; PEDERSEN, 1999). Para carbendazim, verificou-se a sensibilidade de isolados do mesmo patógeno a fungicidas e constatou-se CI₅₀ entre 0,08 a 0,12 mg L⁻¹ (MA et al., 2009).

O grupo químico das dicarboximidas, no qual está inserido o fungicida sistêmico procimidona, é muito utilizado para o controle de fungos pertencentes ao gênero *Sclerotinia*, sendo que o seu sucesso comercial está relacionado, em parte, à ocorrência de resistência de fungos pertencentes a esse gênero aos benzimidazóis (REIS; REIS; CARMONA, 2010). O procimidona apresentou alta fungitoxicidade *in vitro* a *S. sclerotiorum*, com CI₅₀ inferior a 1 mg L⁻¹. Zancan et al. (2012) avaliaram o mesmo produto com isolados de *S. sclerotiorum* e observaram que, nas concentrações de 5 a 500 mg L⁻¹, deste ingrediente ativo, não houve crescimento micelial. Em outro trabalho, 1 mg L⁻¹ causou inibição de praticamente 100% do crescimento micelial (GARCIA et al., 2010). Em ensaios, foram observados valores de CI₅₀ variando de 0,08 a 0,22 mg L⁻¹ (MA et al., 2009), valores até mesmo inferiores aos obtidos neste trabalho, evidenciando o controle efetivo desta molécula sobre *S. sclerotiorum*.

As estrobilurinas compõe um grupo de fungicidas de amplo espectro de ação, sendo fungitóxicos a diferentes grupos de fungos. A grande maioria, apresenta sistemicidade limitada na planta, penetrando nos tecidos e exibindo atividade translaminar, com translocação vascular mínima ou inexistente (REIS; BRESOLIN, 2007). Neste grupo, encontra-se o ingrediente ativo piraclostrobina, o qual foi considerado como altamente fungitóxico a *S. sclerotiorum* no presente trabalho. Zancan et al. (2012) analisaram que as concentrações de 5 a 500 mg L⁻¹ não foram suficientes para inibição total do crescimento micelial do fungo, mas a 5 mg L⁻¹ houve redução de pelo menos 50%. Duan et al. (2012) avaliaram a sensibilidade de mais de 100 isolados para o ingrediente ativo azoxystrobina, também do grupo das estrobilurinas, e obteve valores de CI₅₀ variando de 0,11 a 0,61 mg L⁻¹, com média de 0,29 mg L⁻¹.

O ingrediente ativo fludioxonil, apesar de não ser registrado para o controle de *S. sclerotiorum*, foi muito eficiente no controle micelial desse fungo, capaz de inibi-lo completamente em uma concentração inferior a 0,1 mg L⁻¹. É um fungicida imóvel, pertencente ao grupo químico dos fenilpirrolos. Estudos comprovam a sua eficiência no controle de *S.*

sclerotiorum, nos quais este fungicida foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial a 0,1 mg L⁻¹ (MUELLER; HARTMAN; PEDERSEN, 1999). Avaliando seu efeito sobre três isolados do fungo, observou-se CI₅₀ nos valores de 0,018 a 0,0118 mg L⁻¹ (DUAN et al., 2012). Em outro estudo, utilizando-se 120 isolados, obteve-se CI₅₀ de 0,0032 a 0,0299 mg L⁻¹ (KUANG et al., 2011).

Dentre os fungicidas indicados para o controle do mofo branco, encontra-se o fluazinam, um fungicida imóvel do grupo das fenilpiridinilaminas. De acordo com os resultados obtidos, este produto mostrou-se altamente fungitóxico a *S. sclerotiorum*, apresentando CI₅₀ próximo de 0,001 mg L⁻¹, capaz de inibir praticamente 100% do crescimento micelial em uma concentração inferior a 0,1 mg L⁻¹. Trabalhos envolvendo a sensibilidade de isolados de *S. sclerotiorum* a este fungicida, comprovam sua eficiência. A concentração de 0,1 mg L⁻¹ foi capaz de reduzir o crescimento micelial de isolados do patógeno em mais de 80% (GARCIA et al., 2012; PAULA JÚNIOR et al., 2009). Na inibição do crescimento de *S. minor* e *S. sclerotiorum*, na concentração de 0,01 mg L⁻¹, a redução foi superior a 80% (MATHERON; PORCHAS, 2004). Komyoji et al. (1994) observaram CI₅₀ e CI₉₀ inferiores a 0,1 mg L⁻¹ para *S. sclerotiorum*, além de verificarem seu efeito fungitóxico a diversas outras espécies de fungos.

Tabela 5 - Fungicidas e respectivas equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) e 100 % (CI_{100}) do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Fungicidas	Equação de Regressão	R^2	CI (mg/L)	
			CI_{50}	CI_{100}
Fluazinam	$y = 29,733x + 133,99$	0,90	0,001	0,072
Fludioxonil	$y = 75,842x + 229,16$	0,82	0,004	0,020
Fluquinconazol	$y = 51,352x + 143,93$	0,90	0,015	0,140
Piraclostrobina	$y = 31,514x + 90,121$	0,92	0,053	2,058
Difenoconazol	$y = 44,812x + 105,22$	0,83	0,059	0,765
Carbendazim	$y = 71,646x + 126,71$	0,94	0,085	0,424
Tiofanato metílico	$y = 46,966x + 74,873$	0,94	0,295	3,428
Tiabendazol	$y = 50,137x + 73,447$	0,85	0,341	3,385
Procimidona	$y = 50,279x + 107,84$	0,77	0,994	2,891
Flutriafol	$y = 37,072x + 49,831$	0,79	1,011	22,556
Tiram	$y = 32,323x + 44,38$	0,82	1,492	52,571
Captana	$y = 49,949x + 6,1769$	0,92	7,540	75,576
Metalaxil-M	$y = 29,219x - 1,9227$	0,72	59,840	3077,357

Figura 7 - Inibição do crescimento micelial (%) *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, por oito fungicidas, em seis concentrações (mg L⁻¹)

Figura 8 - Inibição do crescimento micelial (%) *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, por cinco fungicidas, em seis concentrações (mg L⁻¹)

Neste trabalho, a fungitoxicidade dos fungicidas a *S. sclerotiorum* foi classificada de acordo com os critérios de Edgington e Klew (1971). Entretanto, esse sistema de classificação vem sendo questionado, devido aos intervalos entre classes serem muito grandes. Além disso, os fungicidas atuais vem apresentando doses menores, devido a uma maior fungitoxicidade inerente do produto e, portanto, esses valores utilizados pelos autores podem não discriminar com precisão os tratamentos.

Novos critérios de classificação foram propostos por Blum (2009) para o patógeno *Phakopsora pachyrhizi*. De acordo com esses critérios, os fungicidas carbendazim, difenoconazol, fluquinconazol, piraclostrobina, fludioxonil e fluazinam estariam classificados

como altamente fungitóxicos (CI_{50} menor que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$); tiofanato metílico, tiabendazol, procimidona, flutriafol, tiram e captana fungitóxicos (CI_{50} entre $0,1$ e 20 mg L^{-1}); metalaxil-M seria moderadamente fungitóxico (CI_{50} entre 21 e 100 mg L^{-1}); nenhum dos produtos testados seria atóxico a *S. sclerotiorum*. Da mesma forma, esta classificação também apresenta intervalos longos, podendo não diferenciar os tratamentos de forma adequada.

Após 15 dias de incubação, determinou-se a quantidade e a massa de escleródios formada. Os resultados encontram-se nas Figura 9, Figura 10, Figura 11 e Figura 12. Verificou-se a formação de escleródios em todos os fungicidas comparados, porém, em todos os tratamentos, nas maiores doses, ocorreu redução e até mesmo inibição total no número de escleródios formados em relação à testemunha.

Quanto à massa de escleródios, observou-se oscilação deste parâmetro nas concentrações utilizadas para cada fungicida, não sendo observado um padrão claro de comportamento. Existem poucas informações disponíveis com relação à importância da massa de escleródios, contudo, com relação ao tamanho, existem evidências de que, quanto maior o escleródio, maior é o número de apotécios produzidos, devido a maior quantidade de reservas (GÖRGEN et al., 2012; JULIATTI; GARCIA, 2008;). Entretanto, Crato (2013) observou que escleródios menores apresentaram maior viabilidade na germinação carpogênica em relação aos maiores, e que o tamanho do escleródio não influenciou significativamente na germinação miceliogênica dos escleródios. Apesar de não ser observado no presente trabalho um padrão lógico na massa de escleródios, mais importante que este parâmetro, é o número de escleródios produzidos, devido ao papel dessas estruturas na sobrevivência do patógeno.

Os ingredientes ativos piraclostrobina, carbendazim, tiabendazol, tiofanato metílico e captana foram capazes de inibir completamente a formação de escleródios, nas doses de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} , respectivamente. Apesar de não eliminarem totalmente a formação de escleródios, observou-se redução em todos os outros tratamentos. Esta característica é extremamente desejável no controle de *S. sclerotiorum*, principalmente no tratamento de sementes, pois os escleródios são estruturas de resistência do fungo que podem permanecer viáveis por 5 anos ou mais (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999), sendo relatado na literatura período superior a 10 anos (HALL; STEADMAN, 1994; LEITE, 2005), mesmo na ausência de plantas hospedeiras ou de condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

A redução na quantidade de escleródios formados foi de, no mínimo, 45%. Os ingredientes ativos fludioxonil, fluazinam e fluquinconazol reduziram a quantidade de escleródios em 94%, 90% e 61%, respectivamente, na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$; procimidona

e flutriafol diminuíram em 92% e 72% a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; flutriafol e tiram causaram redução de 78% e 45%, na concentração de 5 mg L^{-1} . Mesmo o fungicida metalaxil-M, utilizado para o controle de oomicetos, foi capaz de reduzir a quantidade de escleródios em 57%, na concentração de 100 mg L^{-1} . Mueller, Hartman e Pedersen (1999) constataram que, em sementes tratadas com metalaxil, o número de escleródios formados diminuiu consideravelmente em relação à testemunha. Observou-se, a partir de sementes de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com o fungicidas fludioxonil e tiram, redução superior a 98% na quantidade de escleródios formados, e de 82% para tiabendazol (MUELLER; HARTMAN; PEDERSEN, 1999). O uso de tiofanato metílico no tratamento de sementes de amendoim controlou 100% a incidência de *S. minor*, impedindo a formação de escleródios (BOWEN et al., 2000). A utilização do fungicida fluazinam, além de diminuir a incidência do mofo branco na cultura do feijoeiro, também diminuiu a quantidade de escleródios produzidos nas plantas (VIEIRA et al., 2001; PAULA JÚNIOR et al., 2009). O mesmo comportamento foi observado quando aplicado na cultura da soja (HENNING et al., 2009). Em plantas de feijão (VIEIRA et al., 2001) e soja (HENNING et al., 2009), a aplicação do fungicida procimidone diminui a quantidade de escleródios em relação à testemunha. Zancan et al. (2012) avaliaram o efeito *in vitro* dos fungicidas procimidona, fluazinam, fluquinconazol, tiofanato metílico e piraclostrobina e constataram redução na quantidade de escleródios na ordem de 96%, 94%, 93% 79% e 56%, respectivamente, na concentração de 5 mg L^{-1} . Os resultados encontrados na literatura confirmam a redução da produção de escleródios, quando utilizados os ingredientes ativos avaliados.

Dentre os ingredientes ativos registrados para o controle de mofo branco na cultura da soja, encontram-se fluazinam, carbendazim, tiofanato metílico e procimidona, sendo que, para o tratamento de sementes, existe um único produto registrado, com nome comercial Certeza, uma mistura de fluazinam + tiofanato metílico. Diante dos valores de CI_{50} e CI_{100} obtidos neste experimento e do efeito sobre a produção de escleródios, percebe-se que existem outras moléculas, além das registradas, altamente eficientes no controle *in vitro* do fungo *S. sclerotiorum*, as quais podem ser utilizadas, principalmente, no tratamento de sementes como uma das medidas no manejo da doença mofo branco.

Figura 9 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas

Figura 10 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas

Figura 11 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de quatro fungicidas

Figura 12 - Massa (g) e número de escleródios (-) de *Sclerotinia sclerotiorum* formados após 15 dias de incubação, em sete concentrações (mg L⁻¹), de um fungicida

5 CONCLUSÕES

A presença do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja afetou, negativamente, o poder germinativo das sementes, com redução média de 32% em relação à testemunha.

Observou-se diferença entre os isolados com relação à agressividade, sendo o isolado obtido a partir da cultura do feijão mais agressivo que os demais.

Houve redução da germinação das sementes e da incidência de *S. sclerotiorum* em ambos os ambientes ao longo do período de armazenamento, porém, em ambiente controlado, a redução na germinação das sementes foi de 14% e na incidência do fungo de 16%, enquanto que, em laboratório, esta redução foi de 23% na germinação e de 62% na incidência, valores superiores aos observados em condições controladas de armazenamento. Portanto, as mesmas condições, que contribuíram para a manutenção do potencial fisiológico das sementes em ambiente controlado, também foram favoráveis à preservação de *S. sclerotiorum*.

Independente do ambiente de armazenamento, o fungo *S. sclerotiorum* permaneceu viável nas sementes durante, pelo menos, oito meses.

Não houve diferença estatística com relação à quantidade de sementes amostradas em testes de sanidade para detecção de *S. sclerotiorum*, entretanto, constatou-se que, à medida que o número de sementes avaliadas aumentou, a frequência de ocorrência do patógeno nas amostras também foi maior.

Devido à baixa incidência do patógeno em sementes naturalmente infectadas, a quantidade de sementes recomendada atualmente para testes de sanidade de *S. sclerotiorum*, de 400 sementes, não é adequada para detectar o fungo com confiabilidade, havendo a necessidade de utilizar maior número de sementes.

Todos os fungicidas testados foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, bem como a produção de escleródios, em, pelo menos, 69% e 45%, respectivamente.

A maioria dos fungicidas testados apresentaram CI_{50} inferior a 1 mg L^{-1} , com exceção dos ingredientes ativos flutriafol, tiram e captana, os quais mostraram CI_{50} entre 1 e 10 mg L^{-1} , e metalaxil-M, com CI_{50} superior a 50 mg L^{-1} .

Os ingredientes ativos piraclostrobina, carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico, além de apresentarem CI_{50} inferior a 1 mg L^{-1} , também inibiram totalmente a formação de escleródios em concentrações inferiores a 5 mg L^{-1} .

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 907 p.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 out. 2013.

ALMEIDA, A.M.R.; PEREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, C.V.; GODOY, L.M.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. cap. 64, p. 569-588.

ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; ALMEIDA, A.M.; MELLO, S.C.M. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 24 p.

BLACK, R.J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. cap. 1, p. 1-18.

BLUM, M.M.C. **Sensibilidade de *Pakpsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 164 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOTELHO, L.S. **Deteção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BOWEN, C.; MELOUK, H.A.; JACKSON, K.E.; PAYTON, M.E. Effect of a select group of seed protectant fungicides on growth of *Sclerotinia minor* *in vitro* and its recovery from infested peanut seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 11, p. 1217-1220, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009a. 200 p.

_____. Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre a aprovação dos níveis de tolerância de pragas para Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas. **Diário Oficial**, Brasília, 02 mar. 2009b. p. 10-11.

CAMARGO, M.P.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M.; RIZZATO, G.T.; ZANUTTO, G.M. Avaliação de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, em sementes de soja. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE MOFO BRANCO, 2012, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, 2012a. v. 1, p. 76.

CAMARGO, M.P.; CASA, R.T.; BAMPI, D.; PETRY, R.; HACKBARTH, C.; ALVES, L.; SACHS, C. Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão no Estado de Santa Catarina. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE MOFO BRANCO, 2012, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, 2012b. v. 1.,

CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: UEPG, 1999. 178 p.

CARVALHO, N.M; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q.; SILVA, R.A. **Manual de doenças da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil LTDA, 2010. 57 p.

CHAVES, G.M. Estudo sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experientiae**, Viçosa, v. 4, n. 2, p. 69-133, 1964.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas**: soja. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 16 out. 2013.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: I. Manica; J. A. Costa, 1996. 233 p.

CRATO, F.F. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, 2005. cap. 4, p. 75-112.

DORRANCE, A.E.; MILLS, D. **Sclerotinia stem rot (white mold) of soybean**. The Ohio State University, 2008. Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/ac-fact/pdf/AC_45_08.pdf>. Acesso em: 14 out. 2013.

DUAN, Y; LIU, S.; GE, C.; FENG, X.; CHEN, C.; ZHOU, M. In vitro inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by mixtures of azoxystrobin, sham and thiram. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 103, n. 2, p. 101-107, 2012.

EDGINGTON, L.V.; KLEW, K.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

ESKER, P.; PELTIER, A.; BRADLEY, C.; CHILVERS, M.; MALVICK, D.; MUELLER, D.; WISE, K. **Management of white mold in soybean**. North Central Soybean Research Program, 2011. Disponível em: <http://planthealth.info/pdf_docs/WhiteMold_NCSRP.pdf>. Acesso em: 13 out. 2013.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 16 out. 2013.

FARIAS NETO, A.L.; DIANESE, A.C.; SOUZA, P.I.M.; MOREIRA, C.T.; ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S. **Podridão-vermelha-da-raiz e mofo-branco na cultura da soja**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. 27 p.

FIGUEIRÊDO, G.S.; FIGUEIRÊDO, L.C.; CAVALCANTI, C.N.; SANTOS, A.C.; COSTA, A.F.; OLIVEIRA, N.T. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 1-9, 2010.

FURLAN, S.H. **Guia de identificação de doenças do feijoeiro**. Campinas: Instituto Biológico, 2012. 109 p.

GALLI, J.A.; PANIZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Sobrevida de patógenos associados a sementes de soja armazenadas durante seis meses. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 205-213, 2007.

GARCIA, R.A.; SANTOS, R.C.; LOBO JÚNIOR, M.; MEYER, M.C.; OLIVEIRA, R.M.; CUNHA, M.G. Sensibilidade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 31, 2010, Brasília. **Resumo...** Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 213-214.

GOMES, P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 149 p.

GÖRGEN, C.A.; CIVARDI, E.A.; RAGAGNIN, V.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1102-1108, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2010001000008&script=sci_arttext>. Acesso em: 01 nov. 2013.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 72 p.

GRAU, C.R.; HARTMAN, G.L. Sclerotinia stem rot. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 46-48.

HALL, R.; STEADMAN, J.R. White mold. In: HALL, R. **Compendium of bean diseases**. 2nd ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1994. p. 28-29.

HENNEBERG, L.; JACCOUD FILHO, D.S.; RUARO, L.; PANOBIANCO, M. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 61-69, 2012.

HENNING, A.A.; PAULA, F.Y.H.; MOMTEMEZZO, C.A.O.; BOSSE, E.J.; BERGONSI, J.S.S. Avaliação de princípios ativos para o controle químico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja - safra 2008/2009. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 29-31, 2009. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/portal/images/stories/informativos/v19n1/artigo01.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2013.

HOFFMAN, D.D.; HARTMAN, G.L.; MUELLER, D.S.; LEITZ, R.A.; NICKELL, C.D.; PEDERSEN, W.L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 7, p. 826-829, 1998.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Bassersdorf: ISTA, 2013. 262 p. Disponível em: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTA_Rules_Annex_2013.pdf>. Acesso em: 25 out. 2013.

JULIATTI, F.C.; GARCIA, R.A. **Mofo branco ou podridão branca da haste: um desafio para a produção da batateira (*Solanum tuberosum* L.)**. Batata Show, 2008. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/2008/revista.asp?id_REVCAT=29&id_REVCON=664>. Acesso em: 30 out. 2013.

KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, São Paulo, 2011. v. 1, cap. 16, p. 343-366.

KOCH, E.F.A. **Deteção, incidência e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1998. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

KOMYOJI, T.; SUGIMOTO, K.; MITANI, S.; MATSUO, N.; SUZUKI, K. Biological properties of a new fungicide, fluazinam. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 20, n. 2, p.129-135, 1995.

KUANG, J.; HOU, Y.-P.; WANG, J.-X.; ZHOU, M.-G. Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to fludioxonil: *in vitro* determination of baseline sensitivity and resistance risk. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 7, p. 876-882, 2011.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: EMBRAPA, 2005. 4 p. (Comunicado Técnico, 76). Disponível em: <<http://www.redebiodiesel.com.br/arquivos/download/7.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2013.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS; UFLA; FAEPE, 2000. 138p.

MA, H.-X.; CHEN, Y.; WANG, J.-X.; YU, W.-Y.; TANG, Z.-H.; CHEN, C.-J.; ZHOU, M.-G. Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid against sclerotinia stem rot in Jiangsu Province of China. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37, n. 5, p. 421-429, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARCUCCI, E.; ALEANDRI, M.P.; CHILOSI, G.; MAGRO, P. Induced resistance by β -aminobutyric acid in artichoke against white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 10, p. 659-667, 2010.

MARTINS-FILHO, S.; LOPES, J.C.; RANGEL, O.J.P.; TAGLIAFERRE, C. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas em condições de ambiente natural em Alegrete-ES. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 201-208, 2001.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, São Paulo, 2011. v. 1, cap. 8, p. 149-206.

MATHERON, M.E.; PORCHAS, M. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 6, p. 665-668, 2004.

MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425 p.

MEDINA, P.F.; TANAKA, M.A.S.; PARISI, J.J.D. Sobrevivência de fungos associados ao potencial fisiológico de sementes de tritcale (*X. tritico-secale* Wittmack) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 17-26, 2009.

MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 52-53, 2010. Disponível em:

<<http://www.abrates.org.br/portal/images/stories/informativos/v20n3/minicurso03.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2013.

MENTEN, J.O.M.; LIMA, L.C.S.F.; FRARE, V.C.; RABALHO, A.A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, DFP, 2005. cap. 12, p. 333-374.

MICHELI, A.; SILVA, O.C.; SHIPANSKI, C.A.; FREITAS, J.; RUTHES, E.; GALLO, P. Efeito do tempo de armazenamento de sementes de soja e feijão comum na redução do inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 384, 2009.

MOLLOY, C.; CHEAH, L.H.; KOOLAARD, J.P. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 61-65, 2004.

MUELLER, D.S.; HARTMAN, G.L.; PEDERSEN, W.L. Development of sclerotia and aphotecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1113-1115, 1999.

MUELLER, D.S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R.C.; OZKAN, E.; KURLE, J.E.; GRAU, C.R.; GASKA, J.M.; HARTMAN, G.L.; BRADLEY, C.A.; PEDERSEN, W.L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 26-31, 2002.

NICHOLSON, J.F.; DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Internal seed-borne nature of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phomopsis* sp. and their effects of soybean seed quality. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 11, p. 1261-1263, 1972.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; CARNEIRO, J.E.S. Mofo branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. cap. 6 e 7.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ROCHA, P.R.R.; BERNARDES, A.; COSTA, E.L.; CARNEIRO, J.E.S.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 44-48, 2009.

RASHID, K.Y.; SWANSON, J. **Seed treatment for the control of sclerotinia basal-stalk rot/wilt in sunflower**. Ottawa: Agriculture and Agri-Food Canada, 1998. Disponível em: <http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/MAC_proceedings/2001/pdf/rashid.pdf>. Acesso em: 15 out. 2013.

REIS, E.M.; BRESOLIM, A.C.R. Fungicidas: aspectos gerais. **Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 97, 2007. Disponível em: <http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=777>. Acesso em: 17 out. 2013.

REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. **Manual de fungicidas: guia para controle químico de doenças de plantas**. 6. ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010. 226 p.

STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979.

_____. White mold: a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.

TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 60-64, 2000.

TELES, H.F. **Qualidade de sementes de soja e incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary em função do beneficiamento e armazenamento**. 2012. 185 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

TU, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.

VIEIRA, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PERES, A.P.; MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 770-773, 2001.

YANG, X.B.; LUNDEEN, P.; UPHOFF, M.D. Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 456-461, 1999.

ZANCAN, W.L.A. **Sensibilidade a fungicidas e efeito de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; SOUSA, B.F.M.; MATOS, C.S.M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 782-789, 2012.