**DETECÇÃO, INCIDÊNCIA E EFEITOS DE *Sclerotinia*
sclerotiorum EM SEMENTES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

EVELYN FERNANDES DE ARAUJO KOCH
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Machado Menten

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril – 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Koch, Evelyn Fernandes de Araujo

Detecção, incidência e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão
(*Phaseolus vulgaris* L.) / Evelyn Fernandes de Araujo Koch. - - Piracicaba, 1998.

59 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Fitopatologia 2. Fungo fitopatogênico 3. Incubação 4. Mofo-branco 5. Semente
de feijão 6. Substrato I. Título

CDD 635.652

ERRATA

1. Pág. 6 – 4º parágrafo – 3ª linha – ignorar parte que compreende Entretanto até COOK et al. 1975.
2. Pág. 10 – ignorar último parágrafo.
3. Pág.11 – 4º parágrafo – 2ª linha – deve ser completada com a atuação do referido fungo foi mais drástica quando se usou uma suspensão de ascósporos à inoculação das sementes com micélio provocou, em menor proporção, redução na germinação e no peso de matéria verde da parte aérea e raiz enquanto que os escleródios....
4. Pág. 24 – 4º parágrafo – 3ª linha, onde lê-se papel de filtro incubado leia-se papel de filtro com sementes incubadas
5. Pág. 26 – 1º parágrafo – 4ª linha, onde lê-se papel de filtro a 15°C detectou, leia-se papel de filtro a 15°C permitiu a detecção de.....
6. Pág. 26 – 3º parágrafo – 6ª linha, onde lê-se esse mesmo substrato não foi capaz de detectar..., leia-se esse mesmo substrato não permitiu a detecção.
7. Pág. 28 – 2º parágrafo – 2ª linha, onde lê-se escuro contínuo por 15 dias leia-se escuro contínuo por 14 dias.
8. Pág. 35 – 2º parágrafo – 3ª linha, onde lê-se de germinação incubados leia-se de germinação das sementes incubadas.
9. Pág. 40 – 5º parágrafo – 4ª linha, após 4 isolados diferentes, acrescentar de soja e feijão.
10. Pág. 41 – 1º linha, onde lê-se nível de vigor, leia-se além do nível de vigor de lotes de semente
11. Pág. 41 – 1º parágrafo – 2ª linha, onde lê-se germinação incubados leia-se germinação das sementes incubadas

Ao Paulo,
Pela compreensão, apoio, força, pelo amor,
por além de esposo ser companheiro.

À Clara

Minha filha, pela luz, pela alegria e pela compreensão durante as minhas ausências.

Dedico.

Aos meus pais José e Rosely,
pelo amor e por me ensinar os
primeiros passos desta
caminhada

Ofereço

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. José Otávio M. Menten pela orientação, apoio e amizade;
- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati pela amizade, ensinamentos e oportunidade de ingressar no Departamento de Fitopatologia;
- À Maria Heloísa D. Moraes pela amizade, apoio e incentivo essenciais na condução deste trabalho;
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos, colaboração e compreensão;
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial a Fernanda e Rodolfo, pelo auxílio e amizade;
- À Diretoria da Agroflora S/A pela oportunidade de conclusão deste trabalho;
- Ao Sr. Pedro Terenciano Sobrinho, pela compreensão, apoio e amizade;
- Aos Funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação, em especial à Eliana Maria G. Sabino, Katia Maria A. Ferraz, Luzia de Fátima S. Possato e Silvana C. N. Oliveira, pelo profissionalismo e amizade;
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização do curso;

- À colega Silvânia H. Furlan de Oliveira (Instituto Biológico) pelas amostras de feijão;
- Aos funcionários do Departamento de Controle de Qualidade da Agroflora S/A, em especial a Jane Oliveira dos Santos e Elizabete Ap. Pacheco, pela colaboração na condução dos experimentos e retaguarda necessária durante os períodos de ausência na companhia;
- À Maria Celia Rodrigues pela atenção, eficiência e paciência na digitação deste trabalho;
- À Maria Izalina Ferreira Alves, pelo auxílio na realização das análises estatísticas;
- Aos colegas Antonio de Goes, João P. Pimentel e Raquel F. Castellani, pela convivência.
- À família Koch (Paulo Roberto, Iracy e Ida Roberta), pela acolhida, auxílio constante e oportunidade de convivência.
- A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.
- **A Deus, pela energia de todos os dias.**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Desenvolvimento de método para detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de feijão.....	14
3.2 Avaliação da incidência de <i>S. sclerotiorum</i> em amostras de sementes de feijão.....	16
3.3 Relação entre a presença de escleródios no refugo e a incidência de <i>S. sclerotiorum</i> na respectiva amostra de sementes de feijão.....	17
3.3.1 Quantificação do número de escleródios presentes no refugo.....	18
3.3.2 Avaliação da incidência de <i>S. sclerotiorum</i> nas amostras de sementes.....	18
3.4 Efeito de <i>S. sclerotiorum</i> no desenvolvimento inicial de sementes naturalmente infectadas.....	19
3.4.1 Análise de germinação das sementes.....	19
3.4.2 Teste de emergência em campo.....	20
3.5 Efeito de <i>S. sclerotiorum</i> no desenvolvimento inicial de sementes inoculadas artificialmente.....	20

	Página
3.5.1 Obtenção do inóculo.....	21
3.5.2 Inoculação artificial das sementes com <i>S. sclerotiorum</i>	21
3.5.3 Análise de sanidade das sementes.....	22
3.5.4 Análise de germinação das sementes.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Desenvolvimento de método para detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de feijão.....	24
4.2 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> em amostras de sementes de feijão.....	28
4.3 Relação entre o número de escleródios no refugo e a incidência de <i>S. sclerotiorum</i> na respectiva amostra de sementes de feijão.....	33
4.4 Efeito de <i>S. sclerotiorum</i> sobre o desenvolvimento inicial de sementes naturalmente infectadas.....	35
4.5 Efeito de <i>S. sclerotiorum</i> no desenvolvimento inicial de sementes inoculadas artificialmente.....	39
4.5.1 Inoculação artificial de sementes com <i>S. sclerotiorum</i>	39
4.5.2 Efeito de <i>S. sclerotiorum</i> na germinação de sementes inoculadas artificialmente.....	41
5 CONCLUSÕES.....	46
ANEXOS	47
ANEXO A.....	48
ANEXO B.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Sementes de feijão, incubadas em papel de filtro, à temperatura de 15°C e escuro contínuo após 14 dias, contendo escleródios e micélio típicos de <i>S. sclerotiorum</i>	29
2 Lesões necróticas observadas em algumas plântulas originadas a partir de sementes inoculadas artificialmente.....	45

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Procedência das amostras de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) da cv. Carioca, submetidas a detecção de <i>S. sclerotiorum</i>	17
2 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> (%) em sementes de feijão incubadas em diferentes substratos, temperaturas e regimes luminosos.....	25
3 Efeito do regime luminoso e substratos na incidência de <i>S. sclerotiorum</i> (%) em sementes de feijão (amostra G).....	27
4 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> em amostra de sementes de feijão analisadas pelo método do papel de filtro a 15° C, escuro contínuo, por 14 dias.....	30
5 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> em amostras de sementes de feijão cujos refugos continham escleródios.....	33
6 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> em 10 amostras de sementes de feijão e seu efeito na germinação, sob duas temperaturas e emergência em campo.....	36
7 Incidência de <i>S. sclerotiorum</i> (%) em sementes de feijão inoculadas com 3 isolados, com ou sem assepsia superficial.....	39
8 Porcentagem de germinação e plântulas lesionadas obtidas a partir de sementes inoculadas com 3 isolados e incubadas sob duas temperaturas.....	41

**DETECÇÃO, INCIDÊNCIA E EFEITOS DE *Sclerotinia*
sclerotiorum EM SEMENTES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

Autora: Evelyn Fernandes de Araujo Koch

Orientador: Prof. Dr. José Otávio M. Menten

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com os seguintes objetivos: estabelecer um método alternativo para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão; avaliar a ocorrência deste fungo em amostras de sementes de feijão; correlacionar a presença de escleródios do fungo no refugo e a incidência na respectiva amostra de sementes de feijão; avaliar o efeito de *S. sclerotiorum* no desenvolvimento inicial de plântulas de feijão.

Através da comparação de diferentes substratos (papel de filtro e papel toalha), temperaturas (5, 15 e $20 \pm 2^\circ \text{C}$) e regimes luminosos (fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro contínuo), concluiu-se que o uso do papel de filtro, com incubação sob temperatura de 15°C e escuro contínuo por um período de 14 dias, é uma alternativa viável para detectar *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. Esse método possibilitou a detecção deste patógeno em 35,1% das amostras analisadas, provenientes de campos com ocorrência de mofo branco.

A quantificação do número de escleródios presentes no refugo e a análise de sanidade para detecção da incidência de *S.*

sclerotiorum na respectiva amostra de sementes não permitiu estabelecer uma correlação entre essas duas variáveis estudadas.

Quando foram conduzidos testes de germinação em laboratório e emergência em condição de campo, não foi verificado dano ao desenvolvimento inicial de plântulas originadas de sementes naturalmente infectadas, com incidência de *S. sclerotiorum* de 0,50 a 2,25%. O patógeno não causou redução na germinação de sementes inoculadas com micélio, mesmo tendo-se obtido infecção superior à encontrada em amostras naturalmente infectadas.

**DETECTION, INCIDENCE AND EFFECTS OF *Sclerotinia*
sclerotiorum IN COMMON BEAN SEEDS
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

Author: Evelyn Fernandes de Araujo Koch

Adviser: Prof. Dr. José Otávio M. Menten

SUMMARY

The present work was carried out with the following objectives: to establish an alternative method for detection of *S. sclerotiorum* in common bean seeds; to assess the occurrence of this fungus in common bean seed samples; to correlate the presence of fungal sclerotia in the inert matter and the incidence on the respective seed sample; to assess the effect of *S. sclerotiorum* on the initial development of bean seedlings.

Based upon studies carried on different substrates (blotter and paper towel), temperatures (5, 15 and $20 \pm 2^\circ \text{C}$) and light period (12 hours light and dark continuous), it was concluded that the "Blotter test", under 15°C incubation temperature in the dark for 14 days, is a feasible alternative for the detection of *S. sclerotiorum* in common bean seeds; With this procedure it was possible the detection of the pathogen on 35,1% of the assessed samples, originated from fields with white mold occurrence.

A correlation between the amount of sclerotia present on the inert matter and the incidence of *S. sclerotiorum* on the respective seed sample was not observed.

When germination tests were carried out in laboratory and emergence test under field conditions, no damage on the initial development of seedlings originated from naturally infected seeds, with incidence of *S. sclerotiorum* ranging from 0,50 to 2,25%, was observed. The pathogen was not able to cause reduction on germination of seeds inoculated with fungal mycelium even with infection observed higher than that occurring in naturally infected samples.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do feijoeiro constitui-se numa das principais explorações agrícolas do país, não só pela área plantada e pelo valor da produção, mas fundamentalmente porque é um dos principais componentes da alimentação básica do povo brasileiro, atuando como uma importante fonte protéica.

No Brasil, a produção média anual de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está em torno de 3,3 milhões de toneladas e o rendimento médio ao redor de 610 kg/ha (FIBGE, 1994). A exemplo do que ocorre com quase todas as plantas cultivadas, a presença de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus é uma séria ameaça ao feijoeiro. A importância dessas doenças pode variar anualmente, dependendo das condições climáticas que favorecem a ocorrência e disseminação de determinados patógenos, inclusive através de sementes.

O mofo branco ou podridão de esclerotinia, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, está entre as principais doenças do feijoeiro irrigado, sendo limitante para esta cultura durante alguns meses do ano, principalmente em condições de alta umidade e temperaturas amenas (Menezes, 1995). O fungo, como a maioria dos patógenos do feijoeiro, pode ser transmitido via semente, como micélio dormente ou como contaminante na forma de escleródios, estruturas de resistência que possibilitam a introdução e a permanência do fungo em uma área por alguns anos, acentuando a importância dessa doença (Menezes, 1987).

S. sclerotiorum pode ser citado como um exemplo de patógeno de grande importância econômica no Brasil na atualidade, não só pelos danos que causa à cultura hospedeira em uma dada safra, como também pela sua atuação subsequente em cultivos futuros desta e de outras plantas de interesse econômico (Machado, 1994). Baseados neste fato Machado (1994) e Menten (1997) propõem a adoção de nível de tolerância “zero” para este patógeno em sementes básicas, certificadas e fiscalizadas de feijão. Este nível de tolerância tem sido adotado para o Estado de São Paulo, pelo menos a partir de 1993 (EMBRAPA, 1993), estando em vigor na safra 1997/98 (CESM-SP).¹

A adoção do nível de tolerância zero tem gerado uma maior preocupação com relação à presença de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e um consequente aumento no volume de amostras para análise visando a possível detecção deste patógeno.

De acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) o teste de sanidade recomendado para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão é o método do papel de filtro, com incubação à temperatura de 5 a 7°C, sob escuro contínuo por 30 dias. Devido ao período de incubação ser considerado longo para uma análise de rotina e a eficiência do método na detecção de *S. sclerotiorum* ser questionável, torna-se necessário o desenvolvimento de um método mais rápido, prático, eficiente e seguro.

O presente trabalho teve como objetivos: desenvolver um método alternativo para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão; avaliar a ocorrência deste fungo em diferentes amostras de sementes de feijão, aplicando o método desenvolvido; correlacionar a presença de *S. sclerotiorum* no refugo e a incidência na respectiva amostra de sementes de feijão; avaliar o efeito do referido fungo no desenvolvimento inicial de plântulas de feijão.

¹ Comissão Estadual de Sementes e Mudanças, SP – Ofício Circular nº 01/97 – Padrões de Sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (Syn=*Whetzelinia sclerotiorum*) é um fungo pertencente à subdivisão Ascomycotina, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (Krugner & Bacchi, 1995; Agrios, 1997). É um fungo polífago, de distribuição mundial, sendo o agente causal da “podridão de esclerotinia”, “murcha de esclerotinia” ou “mofo branco” em muitas espécies cultivadas.

Boland & Hall (1994) relataram a ocorrência de 408 espécies de plantas suscetíveis a *S. sclerotiorum*, pertencentes a 278 gêneros e 75 famílias. Purdy (1979) descreveu este fungo como sendo o mais inespecífico, onívoro e bem sucedido dos fitopatógenos. Segundo Chaves (1964), o primeiro registro da ocorrência de *S. sclerotiorum* no Brasil foi feito em 1921 por Saccá, que verificou o patógeno sobre *Solanum tuberosum* L., no Estado de São Paulo. Atualmente, ocorre em várias espécies cultivadas como alface, colza, girassol, soja (Homechin, 1982), feijão (Santos & Athayde, 1983), bem como em algumas plantas daninhas (Vieira, 1988).

No Brasil, a importância econômica do mofo branco aumentou bastante nos últimos anos, a partir da década de 80, particularmente em áreas de cultivo de feijoeiro no inverno, sob irrigação via pivô central (Cardoso, 1994; Menezes, 1994; Vieira, 1994). A introdução do inóculo nessas áreas pode ter acontecido pelo uso de sementes de feijão ou de outras culturas portadoras do patógeno. As condições de cultivo de inverno, com temperatura e umidade favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, proporcionaram uma rápida

expansão da doença em algumas regiões do país, como nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Cardoso, 1994). Fatores como alta população de plantas, utilização de espaçamento inadequado, adubações pesadas, presença de ervas daninhas, má drenagem dos solos e reutilização de áreas infestadas com escleródios, associados às condições ambientes propícias à doença, tem contribuído para o aumento gradativo dos danos ocasionados aos campos de produção de feijão (Natti, 1971; Santos & Athayde, 1983).

Apesar de haver carência de estudos que estimem as perdas no rendimento do feijoeiro, ocasionadas pelo mofo branco, Beversdorf & Hume (1981) citaram que, no Canadá, as perdas variaram de 15 a 60%, enquanto que Purdy (1979) relatou que, nos Estados da Flórida, Michigan e Nova York, tem sido registrados prejuízos de até 100%. Rezende et al. (1969) citaram a doença como uma das mais severas no cultivo de feijão vagem no inverno, chegando a afetar 100% da cultura e Cardoso (1994) relatou que, no Brasil, já foram observadas perdas de até 50% no rendimento, sem considerar a diminuição da qualidade do produto colhido. Segundo Kerr et al. (1978), o número de sementes/planta é o componente do rendimento mais afetado, seguido do peso da semente. Karl (1997) citou que a produção de plantas doentes é reduzida, em média, em 37% em peso e 36% em número de grãos.

De acordo com Machado (1988), de maneira geral, a maior severidade de doenças no período entre o florescimento e a maturação fisiológica de sementes quase sempre determina reduções significativas no número de sementes, como também altera substancialmente a composição das mesmas.

S. sclerotiorum é um fungo de solo, que sobrevive principalmente na forma de escleródios, estruturas que podem permanecer no solo por 3 a 8 anos (Cook et al. 1975; Adams & Ayers, 1979; Steadman, 1983).

Sob condições favoráveis, os escleródios de *S. sclerotiorum* podem germinar através de 2 processos: germinação miceliogênica - pela

emissão de hifas, que emergem através do envoltório dos escleródios; e germinação carpogênica - pela formação de corpos de frutificação, os apotécios, onde são produzidos os ascosporos (Le Torneau, 1979).

Os principais modos de infecção primária causada por *S. sclerotiorum* em feijão são: a) infecção resultante de ascosporos em pétalas florais que se alojaram nas hastes; b) infecção associada com ascosporos se depositando em folhas em contato com o solo úmido; c) infecção associada com ascosporos que germinam e penetram em tecidos injuriados; d) folhas que entram em contato com escleródios na superfície do solo; e) micélio de escleródio germinado que infecta o colo da planta (Sutton & Deverall, 1983; Tu, 1989a). De acordo com Steadman (1983), a infecção secundária resulta de tecidos sadios entrando em contato com áreas infectadas.

Abawi & Grogan (1975), trabalhando com *S. sclerotiorum* em feijão, verificaram que a infecção por micélio proveniente de escleródio não foi observada no campo e atribuem o fato à ausência de uma fonte de energia exógena aos escleródios, os quais demonstraram ser incapazes de infectar as plantas mesmo sob condições favoráveis. Em estudo sobre o processo de infecção de tecidos de feijão e soja por ascosporos, Sutton & Deverall (1983) concluíram que, na ausência de nutrientes exógenos, os ascosporos produzem pequenos tubos germinativos sobre os tecidos intactos, mas apenas os tecidos jovens são penetrados por hifas, originadas dessa germinação.

Chaves (1964) inoculando ascosporos e escleródios em alface, constatou que os ascosporos podem atuar como fonte de inóculo primário, porém demonstraram incapacidade de iniciar infecção em tecidos jovens e sadios, necessitando de fonte de carbono para tal. Ficou ainda esclarecido que o micélio proveniente do escleródio só foi capaz de iniciar a infecção de plantas previamente feridas. Segundo Cook et al. (1975), o micélio originado de escleródio foi responsável por menos de 10% das infecções iniciais, sendo

que as plantas de feijão tornaram-se infectadas quando expostas a apotécios maduros ou suspensões de ascosporos.

Adams & Tate (1976) observaram que, no caso de *Sclerotinia minor*, houve infecção direta das plântulas de alface pelo micélio originado do escleródio, sem haver colonização de matéria orgânica pelo mesmo. Resultado semelhante foi obtido por Hawthorne (1974) o qual alegou que no caso de *S. minor*, ao contrário de *S. sclerotiorum*, o inóculo primário é, provavelmente, o micélio originado de escleródios presentes no solo.

Patterson & Grogan (1985) citaram que *S. minor* é capaz de infectar raiz e colo de plantas de alface diretamente, através da germinação eruptiva de escleródios presentes no solo, e confirmaram que a epidemiologia da podridão causada por *S. minor* em alface difere da causada por *S. sclerotiorum* no mesmo hospedeiro, uma vez que, no caso de *S. minor*, a presença de escleródios no campo assegura a ocorrência da doença, o que não acontece no caso de *S. sclerotiorum*.

Apesar de haverem relatos da infecção de plantas de feijão pelo micélio originário de escleródio (Hungerford & Pittis, 1953; Natti, 1971), isto é um evento incomum sob condições naturais, sendo os ascosporos, liberados pelos apotécios de *S. sclerotiorum*, considerados como a fonte primária de infecção (Newton & Sequeira, 1972; Abawi & Grogan, 1975; Cook et al., 1975).

O patógeno requer uma fonte de energia exógena para os ascosporos infectarem tecidos sadios ou folhas verdes, vagens ou caules. Órgãos senescentes ou injuriados na planta ou caídos no solo, abaixo do dossel, podem suprir essa energia exógena necessária. Na cultura do feijão, as fontes mais freqüentes dessa energia são as flores, notadamente aquelas em fase de senescência ou mortas (Abawi et al. 1975; Steadman, 1983).

Uma vez que as flores têm esse papel, ataques epidêmicos de mofo branco ocorrem somente após o florescimento do feijoeiro (Natti, 1971; Abawi & Grogan, 1975; Cook et al., 1975). Entretanto, algumas plantas

Abawi & Grogan, 1975; Cook et al., 1975). Entretanto, algumas plantas infectadas podem ser observadas antes desse período, o que pode ser explicado pela presença de plantas mecanicamente injuriadas ou com lesões necróticas incitadas por outros patógenos e que podem ser infectadas por ascosporos (Abawi & Grogan, 1979).

De acordo com Chupp & Sherf² (1960), citados por Willets & Wong (1980), *Sclerotinia* spp. pode infectar hospedeiros numa faixa de temperatura de 0 a 25°C, com ótimo entre 15 e 20°C. Segundo Abawi & Grogan (1975), o crescimento micelial, produção de escleródios e desenvolvimento de lesão em folhas de feijão ocorrem num ótimo de temperatura que varia de 20 a 25°C. Weiss et al. (1980) relataram que a temperatura do ar favorável ao desenvolvimento da doença varia de 10°C até uma ótima de 25°C, sendo que não houve ocorrência da doença a 30°C. Boland & Hall (1987) citaram que a doença se desenvolveu mais rapidamente a 20°C que a 15 ou 25°C. Em cultura, as temperaturas ótimas para crescimento e formação de escleródios estiveram na faixa de 15 a 22°C, enquanto que o crescimento a 4 e 30°C foi restrito (Willets & Wong, 1980).

Epidemias severas de mofo branco em feijão podem ocorrer se apotécios, umidade na superfície da planta por período superior a 39 horas, temperatura do ar na faixa de 15-25°C e uma cobertura fechada contendo pétalas ocorrerem na lavoura ao mesmo tempo (Boland & Hall, 1987). Abawi & Grogan (1979) observaram que a doença é mais severa em culturas de feijão com abundante crescimento vegetativo e onde a circulação de ar é limitada, condições estas que aumentam o período em que a folhagem permanece úmida.

A patogenicidade de *Sclerotinia* spp. é um fenômeno complexo e pouco conhecido. A eficiência de *Sclerotinia* spp. como patógeno parece, no

²Chupp, C.; Sherf, A.F. **Vegetable diseases and their control**. New York: Ronald Press, 1960. p.43-51.

ocorrer rapidamente na planta hospedeira antes que esta possa reagir. Estes fatores incluem: a) produção de apressório capaz de penetrar mecanicamente através da cutícula do hospedeiro; b) formação de hifas de infecção especializadas e organizadas, capazes de um rápido desenvolvimento intercelular abaixo da cutícula do hospedeiro e no córtex; c) elaboração de enzimas pectinolíticas apropriadas e ácido oxálico para degradar a lamela média das células hospedeiras, quelar cátions inibidores da atividade enzimática, mudar o pH do tecido hospedeiro para uma faixa mais favorável à ação enzimática e intoxicar as células hospedeiras tornando-as menos receptivas à invasão; d) produção de enzimas degradativas capazes de hidrolizar a parede celular e constituintes protoplasmáticos, fornecendo um suprimento constante e abundante de nutrientes para um rápido crescimento e desenvolvimento da hifa de infecção. Esta seqüência de eventos necessita ser verificada, entretanto proporciona uma explicação lógica do comportamento de *Sclerotinia* spp. em relação à suscetibilidade hospedeiro-patógeno (Lumsden, 1979).

A infecção de plantas de feijão por *S. sclerotiorum* pode ocorrer em qualquer período após a emergência das plântulas. Embora plântulas jovens possam ser atacadas por micélio proveniente de escleródios do solo, resultando em sintoma de "damping-off", este problema não ocorre com freqüência (Purdy, 1979). A infecção geralmente ocorre na junção do pecíolo com a haste, cerca de 10 a 15 cm acima do nível do solo, onde ficam retidas pétalas florais e folhas desprendidas (Tu, 1989b). Os pecíolos de folhas infectadas inicialmente apresentam manchas marrons, encharcadas que, encontrando condições adequadas, crescem rapidamente, atingindo outros órgãos da planta. Plantas com sintomas de murcha também podem ser observadas, como conseqüência da infecção das hastes (Steadman, 1983).

Logo após a infecção inicial nos tecidos infectados, pode-se observar o crescimento superficial de micélio com aspecto cottonoso,

constituindo-se em sinal característico da doença, o qual, posteriormente, torna-se pardacento, surgindo os escleródios, inicialmente brancos, passando a negros quando maduros. Estes escleródios podem ser observados na superfície ou dentro dos órgãos afetados (Kimati, 1980; Vieira, 1988; Tu, 1989b).

A disseminação de *S. sclerotiorum* de lavoura para lavoura depende, primariamente, dos ascósporos levados pelo vento e, secundariamente, dos escleródios em solos contaminados, água de irrigação e esterco espalhado no campo por animais alimentados com material vegetal infectado. A longa distância, as sementes infectadas por micélio ou contaminadas com escleródios parecem ser a principal forma de disseminação do fungo (Adams & Ayers, 1979).

Segundo Menten (1995), um grande número de agentes causais de doenças de plantas pode ser transportado e transmitido através das sementes, sendo essa transmissão bastante eficiente, pois o patógeno está em íntima associação com a mesma. A importância dessa associação reside no fato que, ao levar a semente portadora para o campo, pode-se estar introduzindo o patógeno em uma área isenta ou aumentando a quantidade de inóculo já existente, contribuindo para o aumento da incidência da moléstia. Além disso, o patógeno presente na semente pode afetar a germinação ou vigor da mesma, prejudicando o estabelecimento do estande.

Para Machado (1988), o transporte de patógenos não implica na transmissão eventual desses agentes à progênie, uma vez que inúmeros fatores podem atuar nesse sentido. Porém, as chances de transmissão são tanto maiores, na proporção em que mais internamente o patógeno aloja-se nas sementes.

Richardson (1990) citou 31 fungos, 9 bactérias e 16 vírus que podem ser transmitidos por sementes de feijão, estando entre eles o fungo *S. sclerotiorum*.

S. sclerotiorum é um fungo que pode ser veiculado por sementes como contaminante, em forma de escleródios misturados às mesmas, ou internamente como micélio dormente (Menezes, 1987; Tu, 1988). Ainda, segundo este último autor, *S. sclerotiorum* pode sobreviver nas sementes infectadas, como micélio dormente, na testa e nos cotilédones por 3 anos ou mais.

Tu (1988) relatou que sementes provenientes de vagens infectadas podem apresentar diferentes graus (porcentagens) de infecção. Sementes infectadas podem ficar enrugadas, descoloridas ou esbranquiçadas e serem menores e mais leves do que as sementes normais (Steadman, 1975; Vieira, 1988), havendo casos em que os escleródios podem estar aderidos às sementes (Blodgett, 1946).

Steadman (1975) coletou amostras de sementes de lavouras de feijão onde a incidência de mofo branco variou de 1 a 90%, obtendo, para cada lavoura, amostras de plantas infectadas e de plantas aparentemente sadias. *S. sclerotiorum* foi detectado em 48% das amostras provenientes de plantas infectadas, mas somente em 6% das amostras oriundas de plantas sadias. Nestas últimas amostras, o fungo só foi observado em sementes anormais (enrugadas, descoloridas e menores). Nas amostras provenientes de plantas doentes, *S. sclerotiorum* foi detectado, na maioria dos casos, em sementes anormais mas, em três amostras, 2 a 6% de sementes de aparência normal estavam infectadas. No estudo conduzido por Verdugo & Fucikovsky Zak (1980), 36,3% de sementes "anormais" e 18,8% das sementes com aspecto sadio estavam infectadas pelo fungo. Estes resultados indicaram que a remoção de sementes anormais de um lote colhido de lavoura atacada pelo mofo branco não garante sementes livres do patógeno.

Tu (1988) trabalhou com sementes severamente infectadas com *S. sclerotiorum* (89%) e verificou que a maioria delas não germinou, sendo apodrecidas pelo fungo, dando origem a escleródios ou a plântulas que

Tu (1988) trabalhou com sementes severamente infectadas com *S. sclerotiorum* (89%) e verificou que a maioria delas não germinou, sendo apodrecidas pelo fungo, dando origem a escleródios ou a plântulas que morreram apresentando sintomas de “damping-off”. O autor concluiu que o micélio dormente nas sementes infectadas tem importante papel não só na disseminação do fungo, mas também na epidemiologia da doença. Esta conclusão se opõe à obtida por outros autores (Steadman, 1975; Cook et al., 1975) de que *S. sclerotiorum* disseminado por sementes tem improvável significado epidemiológico.

Nicholson et al. (1972) observaram que, quando a incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja é maior do que 25%, a emergência em campo e a germinação *in vitro* são reduzidas. Steadman (1975) relatou que, quando sementes de feijão infectadas foram semeadas em solo esterilizado e mantidas em câmara úmida com temperatura amena, não originaram plântulas infectadas com mofo branco, sendo que somente as sementes anormais apresentaram redução da germinação *in vitro*. Verdugo & Fucikovsky Zak (1980) citaram que houve redução na germinação *in vitro* para lotes infectados com *S. sclerotiorum*, tanto para o lote com semente de aparência sadia, como para o de aparência “anormal”.

Walker³ (1960), citado por Kulik (1984), concluiu que sementes de feijão com baixa infecção, quando semeadas em solo esterilizado, produziram poucas plântulas que desenvolveram podridão aquosa do hipocótilo, iniciando na base dos cotilédones. Hungerford & Pitts (1953) detectaram menos de 1% de infecção em plantas originadas a partir de sementes colhidas de campos infectados.

Goulart (1984), estudando o efeito de três formas de inóculo de *S. sclerotiorum* sobre sementes de soja, verificou que a atuação do referido fungo

³Walker, J. Two seed-borne fungi of french bean *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Australian Institute of Agricultural Science**, v.26, p.60-63, 1960.

escleródios não foram capazes de provocar infecção imediata nas plântulas resultantes. Já Salustiano (1987), quando inoculou sementes de girassol sem tegumento com os mesmos tipos de inóculo comparados por Goulart (1984), concluiu que *S. sclerotiorum* não foi capaz de causar danos na fase inicial de desenvolvimento da planta.

Devido à importância econômica de *S. sclerotiorum* no Brasil, na atualidade, Machado (1994) e Menten (1997), propuseram a adoção do nível de tolerância zero para este patógeno, em sementes de feijão e soja. De acordo com Machado (1994), a adoção de padrões de tolerância se presta não só para aprovação ou rejeição de campos de produção e lotes produzidos, como também, baseado na análise de sanidade, tem sido uma forma eficaz de se impedir a introdução ou circulação de inúmeros patógenos em locais ainda isentos desses agentes.

Para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), as sementes devem ser incubadas em papel de filtro à temperatura de 5 a 7°C, sob escuro contínuo por 30 dias, tempo considerado longo para a detecção de um fungo em semente. Segundo Machado (1994), é importante o exame da fração impura de um lote, composta por fragmentos vegetais, pedaços de sementes, escleródios, etc. Este material, que muitas vezes acompanha as sementes por ocasião da semeadura, constitui um risco potencial na introdução do referido patógeno em áreas de cultivo.

Menezes (1987) recomendou, além da observação do lote para verificar a presença de escleródios, a incubação através do teste de papel de filtro, porém por um período de tempo de 10-15 dias, tempo necessário para a formação dos escleródios.

Cardoso (1994) citou que, na semente, *S. sclerotiorum* pode ser detectado tanto pelo método do papel de filtro como pelo plaqueamento em ágar-água. Oliveira et al. (1995) utilizou os métodos do papel de filtro com

congelamento e BDA, com incubação a 18°C, fotoperíodo de 12 horas e período de 7 e 5 dias, respectivamente, para o papel de filtro com congelamento e o BDA, sendo que placas com crescimento micelial característico foram mantidas por mais 48-72 horas sob 14-15°C, visando favorecer a formação de escleródios e assegurar a identificação do fungo, não encontrando diferenças significativas entre os métodos utilizados.

De acordo com Patrício et al. (1995), a incubação das sementes de feijão em rolo de papel umedecido e mantido por 7 dias a 20°C, com posterior incubação das plântulas e sementes manchadas ou mortas por mais de 2-3 dias em gerbox a 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, foi capaz de detectar a presença de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes certificadas de feijão.

Segundo Peres (1996), o meio semi-seletivo Neon, com incubação sob temperaturas na faixa de 14 a 20 ± 2°C, no escuro, por um período de 7 dias, pode constituir-se em um método alternativo para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão, uma vez que este meio tem como característica a mudança de coloração, quando estão presentes microrganismos que produzem substâncias ácidas, como ocorre com *S. sclerotiorum*, que produz ácido oxálico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de método para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão

Para esta etapa foram utilizadas duas amostras de sementes da cv. Carioca, provenientes de campos do Estado de São Paulo sabidamente infectados com *S. sclerotiorum*. A primeira amostra de sementes, originada do município de Holambra, foi denominada de amostra “M”, enquanto que a segunda amostra, originada do Município de Guaíra, foi denominada de amostra “G”.

Com o objetivo de verificar o efeito de condições de incubação na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, amostras de trabalho de 400 sementes retiradas das amostras “M” e “G” foram incubadas em diferentes condições, a saber:

- a) substratos: papel de filtro e papel toalha;
- b) temperaturas: 5°, 15° e 20 ± 2°C;
- c) regimes luminosos: escuro contínuo e fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente (fria) / 12 horas de escuro.

Para o substrato papel de filtro, adaptou-se a metodologia descrita por Lucca Filho (1987). Foram distribuídas, equidistantemente, 10 sementes de feijão em cada placa de Petri plástica de 9 cm de diâmetro,

contendo três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada. Para o substrato papel toalha, 50 sementes foram distribuídas, equidistantemente, sobre duas folhas de papel tipo "Germitest", previamente umedecidas em água destilada e posteriormente cobertas com uma terceira folha umedecida e então enroladas de forma vertical (no sentido da menor dimensão da folha), cuidando-se para que houvesse separação entre uma fileira de sementes e a imediatamente posterior, formando um "rolo de papel", segundo descrito por Menezes (1987).

O estudo das diferentes temperaturas e regimes luminosos foi realizado mediante incubação das sementes previamente distribuídas sobre os substratos citados, em câmara do tipo BOD, regulada para as condições de luz e temperatura exigidas.

As avaliações foram realizadas, procurando visualizar a presença de micélio e escleródios típicos do patógeno aos 7, 11, 14, 17 e 21 dias após o início da incubação, ou seja, até o ponto em que não houvesse diferença entre os resultados observados entre uma avaliação e a seguinte.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial de 2 (substratos) x 3 (temperaturas) x 2 (regimes luminosos), e 4 repetições de 100 sementes para cada tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Como padrão de comparação (testemunha), uma amostra de trabalho, contendo 400 sementes retiradas de cada amostra, foi incubada pelo método do papel de filtro (Lucca Filho, 1987), porém mantida a uma temperatura de 5°C, em escuro contínuo, durante 30 dias, seguindo metodologia proposta pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), quando, então, as sementes foram avaliadas procurando-se observar as estruturas típicas do patógeno.

3.2. Avaliação da incidência de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão

Foram analisadas 132 amostras de sementes da cv. Carioca, provenientes de diferentes regiões dos Estados de São Paulo e Paraná, sendo a maioria proveniente de campos sabidamente infectados com *S. sclerotiorum*.

A relação das amostras avaliadas, bem como suas respectivas origens, encontra-se na Tabela 1.

A análise de sanidade das sementes para detecção de *S. sclerotiorum* foi baseada no método desenvolvido em 3.1, respeitando-se as condições de substrato, regime luminoso, temperatura e período de incubação que se revelaram mais adequados para a detecção do referido fungo. As avaliações foram realizadas procurando-se observar escleródios e micélio, típicos do patógeno.

Para cada amostra analisada, foi utilizada uma amostra de trabalho com 400 sementes.

Tabela 1 - Procedência das amostras de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) da cv. Carioca, submetidas a detecção de *S. sclerotiorum*.

Referência da amostra	Procedência geográfica
(1)	Guaíra (SP)
(2)	Holambra (SP)
(3 a 50)	Ribeirão Preto (SP)
(51 a 52)	Campinas (SP)
(53 a 68)	Holambra 1 (SP)
(69 a 76)	Pirassununga (SP)
(77 a 81)	Orlândia (SP)
(82)	Londrina (PR)
(83 a 132)	Serrana (SP)

3.3. Relação entre a presença de escleródios no refugo e a incidência de *S. sclerotiorum* na respectiva amostra de sementes de feijão

A fim de verificar se existe alguma relação entre a presença de escleródios no refugo (fração impura resultante do processo de beneficiamento, composta basicamente por outras sementes, material inerte e sementes de feijão com características indesejáveis) e a incidência de *S. sclerotiorum*, na respectiva amostra de sementes de feijão, foram avaliadas doze amostras de sementes da cv. Carioca, provenientes do Estado de Minas

Gerais, juntamente com o respectivo refugo, ou seja, a fração impura, originados de campos infectados com *S. sclerotiorum*.

3.3.1. Quantificação do número de escleródios presentes no refugo

A quantificação foi realizada mediante a contagem do número de escleródios típicos de *S. sclerotiorum* presentes em cada amostra.

Para cada amostra de refugo foi utilizada uma amostra de trabalho de 500 gramas, quantidade equivalente à metade da quantia padronizada pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) para o exame de sementes silvestres e nocivas em amostras de sementes de feijão.

3.3.2. Avaliação da Incidência de *S. sclerotiorum* nas amostras de sementes

As amostras de sementes correspondentes a cada refugo foram avaliadas, para detecção de *S. sclerotiorum*, segundo método desenvolvido em 3.1., procurando-se observar escleródios e micélio típicos do patógeno.

De cada amostra analisada foi retirada uma amostra de trabalho de 400 sementes.

3.4. Efeito de *S. sclerotiorum* no desenvolvimento inicial de sementes naturalmente infectadas

A fim de se verificar o possível efeito de *S. sclerotiorum* no desenvolvimento inicial de plântulas de feijão, foram conduzidos testes de germinação em condições de laboratório e emergência em condições de campo, com amostras naturalmente infectadas.

Para tanto, foram utilizadas 9 amostras com diferentes incidências e uma amostra isenta de *S. sclerotiorum* (segundo resultados obtidos no item 3.2.) foi utilizada como testemunha.

3.4.1. Análise de germinação das sementes

Com o intuito de se verificar o efeito de *S. sclerotiorum* sobre sementes e plântulas, procedeu-se ao teste de germinação, utilizando-se o método do rolo de papel, segundo as R.A.S. (Brasil, 1992). Os rolos (papel "Germitest") contendo 50 sementes equidistantemente distribuídas, foram colocados em germinador tipo Mangelsdorf, às temperaturas constantes de 20°C e 25°C. As avaliações foram feitas aos 5 e 9 dias após a instalação dos testes, sendo avaliados os seguintes parâmetros: plântulas normais, normais infeccionadas e anormais infeccionadas, sendo consideradas como infecções, lesões aquosas no hipocótilo da plântula, bem como presença de micélio ou escleródio típicos do fungo.

O delineamento experimental para este teste foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial de 2 (temperaturas) x 10 (amostras) com 4 repetições, sendo analisadas 200 sementes por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.2. Teste de emergência em campo

O teste de emergência em campo foi realizado para se verificar a transmissão do patógeno das sementes para as plântulas e seu efeito sobre a emergência. As sementes foram distribuídas em caixas plásticas de 30 x 40 x 10 cm, contendo solo esterilizado, em número de 100 sementes por caixa, obedecendo o espaçamento de 2,6 cm entre sementes e 3,8 cm entre linhas, adaptando-se o procedimento descrito por Nakagawa (1994). As caixas foram mantidas em condições de campo, procurando-se manter alta umidade mediante irrigações constantes e temperatura na faixa de 20-27°C. O teste foi iniciado em 23/07/97 e concluído em 13/08/97. Os dados de temperatura e umidade relativa foram obtidos diariamente através de dados do posto meteorológico instalado na área.

As avaliações foram realizadas aos 15 e 21 dias após a instalação do teste, anotando-se o número de plântulas que emergiram e plântulas que apresentaram lesões ou sintomas característicos do patógeno.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 100 sementes por tratamento, sendo cada caixa uma repetição. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.5. Efeito de *S. sclerotiorum* no desenvolvimento inicial de sementes inoculadas artificialmente

Com o objetivo de se verificar o efeito de *S. sclerotiorum*, quando em alta incidência nas sementes, sobre o vigor e a germinação das mesmas, procedeu-se a inoculação artificial de sementes de feijão.

3.5.1. Obtenção do inóculo

Foram utilizados três isolados de *S. sclerotiorum*, obtidos a partir de amostras de sementes de feijão procedentes de diferentes regiões de cultivo:

- isolado Rib L3 – Estado de São Paulo;
- isolado 339 L2 - Estado de Minas Gerais;
- isolado HL1 - Estado do Paraná;

Os escleródios, coletados na fração impura de amostras de sementes, foram tratados inicialmente com álcool a 50% por 1 min. e posteriormente desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min., lavados em água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri contendo meio agar-água a 2%, seguindo metodologia adaptada de Corradini (1989). As placas foram incubadas em câmara com temperatura de 20°C e regime alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por 6 dias, período suficiente para o desenvolvimento miceliogênico oriundo dos escleródios. Discos de 5 mm de diâmetro, retirados das margens destas colônias, foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente, por um período de 5 a 7 dias, obtendo-se, desta forma, as culturas puras.

3.5.2. Inoculação artificial das sementes com *S. sclerotiorum*

Para a inoculação foram utilizadas sementes de feijão da cv. Carioca, procedentes do Estado de São Paulo, e isentas de *S. sclerotiorum*. As sementes foram submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio a

1%, durante 3 minutos, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e posterior secagem à temperatura ambiente, sobre papel absorvente por 24-30 horas, seguindo procedimento adotado por Tanaka (1990).

As sementes foram inoculadas pelo método de contato, segundo metodologia descrita por Peres (1996). De cada isolado obtido, crescido em BDA, foram retirados discos de 5 mm de diâmetro das margens das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA e incubadas em câmara com temperatura de 21°C e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro por 5 dias.

Após o micélio do fungo ter preenchido totalmente a placa, sementes previamente submetidas à assepsia foram colocadas em contato com a colônia, roladas rapidamente sobre esta e deixadas em contato, dispostas em camada única. A testemunha constou de sementes roladas e incubadas em meio BDA sem o fungo. Colocaram-se 50 sementes por placa, que foram incubadas sob as condições descritas anteriormente, por um período de 30 horas. Decorrido este período, as sementes foram postas a secar ao ar e à sombra, sobre papel absorvente, durante 24 a 30 horas.

3.5.3. Análise de sanidade das sementes

Após a inoculação, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade para detecção de *S. sclerotiorum*, seguindo metodologia obtida em 3.1., a fim de avaliar a eficiência da inoculação.

Foram analisadas 800 sementes por tratamento, sendo metade delas submetida a assepsia superficial como descrito em 3.5.2., de modo a se observar a localização do patógeno nas mesmas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 100 sementes para cada tratamento, com

esquema fatorial 3 (isolados) x 2 (tratamentos - com e sem assepsia). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.5.4. Análise de germinação das sementes

Com o objetivo de verificar o efeito de *S. sclerotiorum* sobre sementes e plântulas foi conduzido o teste de germinação pelo método do rolo de papel, segundo as R.A.S. (Brasil, 1992), como descrito no item 3.4.1. Foram conduzidos dois testes: um à temperatura constante de 20°C e outro a 25°C, de modo a verificar o efeito da temperatura sobre o desempenho dos isolados. As avaliações foram realizadas aos 5 e 9 dias após a instalação do teste, sendo avaliados os seguintes parâmetros: plântulas normais, normais infeccionadas e anormais infeccionadas, sendo considerada como infecção lesões aquosas no hipocótilo da plântula, bem como presença de micélio ou escleródio típicos do fungo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento, com esquema fatorial de 3 (isolados) x 2 (temperaturas de incubação). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de método para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão

A incidência de *S. sclerotiorum* em duas amostras de sementes de feijão incubadas em dois substratos, sob dois regimes luminosos (fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e escuro contínuo) e três temperaturas (5, 15 e $20 \pm 2^\circ \text{C}$), estão apresentadas na Tabela 2.

A análise de variância, em esquema fatorial, dos regimes luminosos, temperaturas e substratos utilizados, realizada separadamente para as duas amostras (M e G), não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e nem interação significativa entre os parâmetros analisados, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As avaliações dos testes foram realizadas a partir dos 7 dias até 21 dias, porém, após 14 dias não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos, elegendo-se esse período de incubação o mais adequado, possibilitando a visualização de escleródios e micélio, típicos do patógeno, não deixando dúvidas quanto à avaliação.

Através dos dados contidos na Tabela 2 pode-se verificar que, no caso da amostra G, uma incidência de 1,5% de *S. sclerotiorum* foi detectada utilizando-se papel de filtro incubado sob 15°C e escuro contínuo por 14 dias,

enquanto que no método recomendado pelas R.A.S. (Brasil, 1992), ou seja, incubação em papel de filtro a 5°C em escuro, porém por 30 dias, *S. sclerotiorum* foi encontrado em 1,25% das sementes; isso significa que é possível a detecção do patógeno em níveis semelhantes, porém com incubação por um período de tempo inferior. Esse mesmo método, utilizado por 14 dias, foi capaz de detectar 0,25% de *S. sclerotiorum* na amostra M, o que não foi possível quando as sementes foram incubadas em papel de filtro à temperatura de 5°C e escuro por 30 dias, demonstrando que o método não é sensível neste caso, quando a incidência do fungo é baixa.

Tabela 2 - Incidência de *S. sclerotiorum* (%) em sementes de feijão incubadas em diferentes substratos, temperaturas e regimes luminosos.

Tratamentos	Amostra G ³		Amostra M ⁴	
	Papel de Filtro	Papel Toalha	Papel de Filtro	Papel Toalha
5°C + escuro ¹	1,25	0,00	0,00	0,00
5°C + fotoperíodo	0,00	0,00	0,00	0,00
15°C + escuro	1,50 ²	0,25	0,25	0,00
15°C + fotoperíodo	0,25	0,25	0,00	0,00
20°C + escuro	0,75	0,00	0,25	0,00
20°C + fotoperíodo	0,50	0,00	0,00	0,00
CV	13,37%		8,31%	
Média	0,40		0,04	

* Médias de 4 repetições de 100 sementes.

¹ Resultados dessa linha referem-se às avaliações realizadas 30 dias após a incubação.

² PF = após 14 dias de incubação.

³ Amostra G = originada de Guaíra.

⁴ Amostra M = originada da Holambra.

Apesar de não haver diferença estatística entre as incidências de *S. sclerotiorum* detectadas na amostra M, quando utilizou-se papel de filtro a 15 ou $20 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro, essa diferença pode ser observada para o caso da amostra G, no qual a incubação pelo método do Papel de Filtro a 15°C detectou uma porcentagem bem superior (1,5%) à obtida com a utilização da temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ para incubação.

Vale ressaltar que, para um fungo como *S. sclerotiorum*, cujo padrão de tolerância recomendado por Machado (1994) e Menten (1997) é zero, para as três classes de sementes (básica, certificada e fiscalizada), apesar de 0,25% ser uma porcentagem relativamente baixa, pode significar a introdução de uma semente infectada a cada 400 semeadas, ou seja, cerca de 1000 focos primários de inóculo por hectare, fato extremamente relevante, principalmente em áreas ainda isentas do patógeno.

O substrato papel toalha só foi capaz de evidenciar a presença de *S. sclerotiorum* quando a incubação foi à temperatura de 15°C , sob fotoperíodo (12 horas de luz / 12 horas de escuro) ou escuro contínuo, somente para a amostra G, resultando em valor bem inferior quando comparado ao obtido com o substrato papel de filtro com incubação em escuro contínuo a 15°C . Esse mesmo substrato não foi capaz de detectar *S. sclerotiorum* na amostra M, em nenhuma das condições de temperatura e regime luminoso estudados.

Um aspecto importante a ser considerado é que, quando a incubação foi realizada à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, nos dois substratos utilizados, houve desenvolvimento de uma quantidade superior de fungos e bactérias saprofíticos, quando comparado com a incubação a 5 e 15°C , por exemplo.

Na Tabela 3 são expostos os resultados da única interação significativa do teste, observada, entre substratos e regimes luminosos, somente para a amostra G.

Tabela 3 - Efeito do regime luminoso e substratos na incidência de *S. sclerotiorum* (%) em sementes de feijão (amostra G).

Regime	Substratos		
	Papel de Filtro	Papel Toalha	Médias
Escuro	1,17*a A**	0,08a B	0,63a
Fotoperíodo	0,25 bA	0,08a A	0,17 b
Médias	0,71 A	0,08 B	

* Resultados baseados nas análises de 400 sementes.

**Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas na horizontal.

Médias seguidas pelas mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para o fator “substratos” o papel de filtro mostrou-se superior ao papel toalha, enquanto que para o fator “regime luminoso” o escuro proporcionou maior incidência detectada quando comparado com o fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. No caso do substrato papel toalha não há diferença entre as médias obtidas para incubação em escuro ou fotoperíodo, uma vez que o regime luminoso não exerce grande influência neste substrato, visto que as sementes encontram-se cobertas por uma folha de papel e enroladas, o que praticamente impede a penetração da luz, mantendo-se em escuro contínuo.

De acordo com Menten (1988), o objetivo dos testes de sanidade é determinar o transporte de patógenos pelas sementes, devendo satisfazer alguns requisitos básicos como: sensibilidade (segurança), reprodutibilidade, economicidade e rapidez de resultados.

Neste trabalho, os principais critérios utilizados para discriminar os tratamentos foram a sensibilidade, ou seja, a capacidade do método detectar as maiores incidências do patógeno alvo na semente e a rapidez de resultados, quando comparado com a metodologia proposta atualmente por Brasil (1992), com incubação por 30 dias. Baseando-se nesses critérios, o método que mostrou-se mais adequado para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão foi o do Papel de Filtro, com incubação sob temperatura de 15°C em escuro contínuo por 14 dias, quando é feita a avaliação a olho nú, observando-se escleródios e micélio, típicos do patógeno (Figura 1)

O critério economicidade, neste caso, não possibilita nenhuma discriminação, já que os substratos utilizados e as condições estudadas não exigiram nenhuma condição ou equipamentos específicos que onerassem o trabalho no laboratório, uma vez que foram utilizados materiais e equipamentos disponíveis na rotina de um laboratório de sanidade de sementes. Já o critério reprodutibilidade não foi devidamente avaliado, exigindo a realização da aferição em diferentes laboratórios, analisando sub-amostras de uma amostra única portadora de *S. sclerotiorum*, utilizando o método indicado.

4.2. Incidência de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão

As incidências de *S. sclerotiorum* nas amostras de sementes de feijão analisadas encontram-se na Tabela 4.

Utilizando-se a metodologia de incubação das sementes em papel de filtro, mantido à temperatura de 15°C e escuro contínuo por 15 dias (segundo resultado obtido em 4.1.), foi possível a detecção de *S. sclerotiorum* em porcentagens que variaram de 0,25% a 2,25%, com incidência média de 0,75%, tendo sido detectado em aproximadamente 35,1% do total de amostras analisadas.

Figura 1 - Sementes de feijão, incubadas em papel de filtro, à temperatura de 15°C e escuro contínuo após 14 dias, contendo escleródios (E) e micélio (M) típicos de *S. sclerotiorum*.

Tabela 4 – Incidência de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão analisadas pelo método do papel de filtro a 15°C, escuro contínuo, por 14 dias.

N.A. ¹	% ²	N.A.	%	N.A.	%
1	1,50*	39-43	0,00	72	0,75
2	0,25	44	0,50	73	0,50
3 a 5	0,00	45	0,00	74 a 76	0,00
6	0,50	46	0,50	77	0,25
7	0,00	47 a 50	0,00	78	0,50
8	0,00	51	1,00	79 a 81	0,00
9	0,50	52	1,50	82	0,75
10	0,00	53	2,25	83 a 87	0,00
11	0,00	54	1,75	88	0,25
12	1,00	55	0,00	89 a 98	0,00
13	0,00	56	0,25	99	0,25
14	0,50	57	0,00	100 a 107	0,00
15 a 23	0,00	58	0,00	108	0,25
24	1,25	59	0,50	109 a 111	0,00
25	0,00	60	2,00	112	0,50
26	0,00	61	0,00	113	0,00
27	0,75	62	0,00	114	0,00
28 a 30	0,00	63	1,50	115	0,50
31	0,50	64	1,75	116 a 120	0,00
32	0,25	65	0,50	121	0,50
33	0,75	66	0,00	122	0,50
34	0,00	67	2,25	123 a 125	0,00
35	0,75	68	0,50	126 a 128	0,50
36	0,50	69	0,00	129	0,75
37	2,25	70	0,00	130	0,00
38	0,50	71	0,50	131 e 132	0,00

*Média de 4 repetições de 100 sementes.

¹ N.A. = Número da amostra.

²% = Incidência de *S. sclerotiorum* em porcentagem.

Steadman (1975), utilizando o método do plaqueamento de sementes em ágar-água, detectou *S. sclerotiorum* de 48% das amostras de sementes colhidas de plantas infectadas e de 6% das amostras de sementes colhidas de plantas aparentemente sadias. Patrício et al. (1995) analisaram 618 amostras de sementes de feijão do Estado de São Paulo e detectaram *S. sclerotiorum* em 18 amostras (2,9%), utilizando o método do rolo de papel. Goulart (1984) não conseguiu detectar *S. sclerotiorum* em nenhuma das 48 amostras de soja analisadas, utilizando os métodos de papel de filtro com 2,4-D e plaqueamento em BDA. Salustiano (1987) detectou *S. sclerotiorum* em 9% das amostras de semente de girassol analisadas pelo método de papel de filtro com 2,4-D.

Apesar de todas as amostras serem originadas de campos infectados, a detecção de *S. sclerotiorum* em 35,1% das amostras deve-se, provavelmente, a dois fatores: baixa severidade da doença em alguns campos, não chegando a afetar a produção de sementes ou devido ao fato de, segundo Verdugo & Fucikovsky Zak (1980), a incidência de *S. sclerotiorum* em sementes ser determinada pela fase de desenvolvimento em que se encontra a semente no momento do ataque do fungo, sendo observada maior incidência quando a mesma está em estado leitoso do que quando em maturação fisiológica.

O conhecimento do estágio de desenvolvimento das plantas no qual a infecção se traduz em maior transmissão para as sementes, e destas para as plântulas, pode ser de grande valor em trabalhos de inspeção sanitária de campos. Essas informações permitem determinar em que época a incidência da doença na planta pode significar maiores riscos de contaminação ou infecção das sementes, sendo que, de maneira geral, a incidência de doenças no período entre o florescimento e o início da maturação fisiológica das sementes faz com que os riscos de contaminação ou infecção dessas sejam maiores (Machado, 1988).

Um fato relevante é que, nas amostras onde foi detectado, nem sempre *S. sclerotiorum* foi observado em associação com sementes menores, enrugadas ou esbranquiçadas, mas também com sementes aparentemente saudáveis, dados que estão de acordo com os obtidos por Steadman (1975) e Verdugo & Fucikovsky Zak (1980), que trabalharam com sementes de feijão e detectaram *S. sclerotiorum* tanto em sementes “anormais” como em sementes aparentemente normais. Estes resultados indicam que a remoção de sementes anormais de um lote não garante sementes livres do patógeno, evidenciando a importância da análise de sanidade e de uma metodologia apropriada para a detecção de *S. sclerotiorum*.

Os resultados de incidência obtidos com o método do papel de filtro a 15°C em escuro contínuo por 15 dias, estão de acordo com os relatados por alguns autores, utilizando outros métodos. Oliveira et al. (1995), detectaram 0,65% e 0,70% de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão utilizando o método do papel de filtro com congelamento e plaqueamento em ágar, respectivamente. Patricio et al. (1995) obtiveram incidência de 0,25% a 3,0%, quando utilizaram o método do rolo de papel. Karl (1997) encontrou 0 a 0,75% utilizando o meio semi seletivo Neon.

Uma vez que o padrão de tolerância proposto para o patógeno em questão é zero e *S. sclerotiorum* foi detectado em 35,1% das amostras analisadas, o índice de rejeição destas amostras seria considerado muito alto, caso as mesmas fossem originárias de campos de produção de semente. Tal índice causaria grande impacto por estar fora do objetivo da proposta de um padrão de tolerância que, segundo Menten (1997), deve ter um valor que promova a rejeição de 10 a 20% dos lotes com incidência mais alta do patógeno.

4.3. Relação entre o número de escleródios no refugo e a incidência de *S. sclerotiorum* na respectiva amostra de sementes de feijão

Os resultados obtidos com o número de escleródios presentes no refugo e a incidência (%) de *S. sclerotiorum* na respectiva amostra de sementes encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Incidência de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão cujos refugos continham escleródios.

Lote	Nº de escleródios ¹	Incidência (%) ²
1	80	0,0
2	40	0,0
3	41	0,0
4	52	0,0
5	54	0,5
6	62	0,0
7	55	0,0
8	68	0,0
9	49	0,0
10	37	0,0
11	97	0,0
12	61	0,0

¹ Nº de escleródios em 500 g do refugo.

² Média de 4 repetições de 100 sementes, analisadas pelo método do papel de filtro a 15°C e escuro contínuo, por 14 dias.

O coeficiente de correlação simples obtido ($r = - 0,0724$), indica uma correlação muito fraca, quase nula, não significativa. A falta de

correlação indica que a presença de escleródios de *S. sclerotiorum* no refugo não implica na incidência do patógeno na amostra de sementes.

Essa ausência de correlação pode ser explicada pelo fato que, muitas vezes, os escleródios que contaminam o lote vêm misturados com partículas do solo e são originados da própria área, onde a doença ocorreu na safra anterior. Outra possibilidade é de serem originadas de plantas que foram atacadas de modo tão severo que não chegaram a produzir sementes, ou ainda, essa falta de correlação pode ser devido à época de aparecimento da doença no campo e estágio de desenvolvimento da planta, mais precisamente das sementes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Goulart (1984) quando trabalhou com sementes de soja e não conseguiu detectar a presença de *S. Sclerotiorum* em nenhuma das amostras analisadas, apesar de haver escleródios do fungo na fração impura correspondente a várias destas amostras.

De acordo com Machado (1994), para patógenos como *S. sclerotiorum*, que produzem estruturas de resistência (escleródios) que se misturam às sementes, o exame da fração impura torna-se indispensável, uma vez que esta porção acompanha as sementes por ocasião da semeadura. Ainda, segundo Neergard (1979), o exame da fração impura deve fazer parte da análise de sanidade em programas de controle de qualidade. Em estudo realizado por Pittis & Machado (1987), utilizando a matéria inerte removida de sementes de soja durante o beneficiamento, foi possível não só a identificação de escleródios de *S. sclerotiorum*, mas também a presença do referido fungo nesta fração, utilizando o teste de sanidade.

Nas amostras analisadas pelo teste de sanidade não foi observada a presença de escleródios misturados às sementes, provavelmente por terem sido eliminados durante o beneficiamento, que para o caso do patógeno em questão, torna-se uma etapa muito importante, por representar

uma chance de eliminar os escleródios presentes no lote e consequentemente, melhorar a qualidade sanitária do mesmo. De acordo com Silva (1995), o beneficiamento representa a última oportunidade de atenuação dos problemas presentes no lote produzido, sendo uma etapa que exige cuidados voltados à eficiente remoção de componentes indesejáveis no lote, sem afetar sua identificação e sem promover misturas ou danos mecânicos.

Uma vez que *S. sclerotiorum* é um patógeno que pode estar associado às sementes não só como contaminante na forma de escleródios, mas também internamente, como micélio dormente, o presente estudo evidencia que, para assegurar a real qualidade sanitária de sementes de feijão, torna-se importante não só a análise do refugo de um lote, mas também a análise de sanidade da amostra, uma vez que não foi possível estabelecer uma correlação entre essas duas frações.

4.4. Efeito de *S. sclerotiorum* sobre o desenvolvimento inicial de sementes naturalmente infectadas

Para estes testes de germinação e emergência em campo foram selecionadas 9 amostras de sementes de feijão com diferentes incidências de *S. sclerotiorum* e uma amostra onde não foi detectado o fungo (utilizado como testemunha), a partir das análises realizadas em 4.2.

Na Tabela 6 são apresentadas amostras utilizadas com suas respectivas incidências de *S. sclerotiorum*, bem como os resultados dos testes de germinação incubados sob temperaturas de 20 e 25° C e do teste de emergência em campo.

De acordo com os resultados apresentados, é possível observar que entre as amostras testadas (com exceção da testemunha), foram obtidas incidências de 0,50 a 2,25%.

Tabela 6 – Incidência de *S. sclerotiorum* em 10 amostras de sementes de feijão e seu efeito na germinação, sob duas temperaturas e emergência em campo.

Amostra	Incidência (%)	Germinação (%)			Emergência (%)
		20° C	25° C	Médias	
305	2,25*	84a** B***	90aA	87 ^a b	92*a
406	2,25	84a B	91aA	88ab	89 a
209	2,00	85a B	86aA	86 b	88 a
110	1,75	86a B	88aA	87ab	88 a
404	1,75	87a B	88aA	88ab	85 a
12A	1,25	88a B	92aA	90ab	92 a
5D	1,00	84a B	93aA	89ab	92 a
13B	0,75	86a B	93aA	90ab	82 a
B2D	0,50	91a B	94aA	93a	91 a
B4A(testemunha)	0,00	89a B	95aA	92a	93 a
Média		86 B	91 A		89
CV% =		4,14			8,80

*Médias de 4 repetições de 100 sementes.

** Médias de 4 repetições de 50 sementes.

*** Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas na horizontal.

Medias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pelos resultados encontrados nos testes de germinação não houve diferença estatística a nível de 5% de probabilidade, entre as amostras infectadas e a testemunha, para nenhuma das duas temperaturas utilizadas para incubação. Essas duas temperaturas, foram testadas com o intuito de verificar se, em uma delas o fungo seria mais favorecido, ou seja, apresentaria algum efeito sobre a germinação porém, de acordo com trabalhos conduzidos

por Abawi & Grogan (1975), Weiss et al. (1980) e Boland & Hall (1987), o desenvolvimento da doença é possível sob as duas temperaturas utilizadas. Em nenhum dos dois casos foram observadas plântulas infeccionadas, com escleródios ou micélio típicos do patógeno.

Segundo a análise estatística realizada para o teste de germinação, houve diferença significativa entre as médias de germinação obtidas para cada temperatura, sendo 25°C a que demonstrou resultados mais favoráveis (Tabela 6). Diferenças significativas também foram observadas entre as médias de germinação obtidas para cada amostra, tendo a testemunha e a amostra B2D (0,5% de incidência) apresentado resultados superiores, inclusive diferindo da amostra 209 (2% de incidência).

Apesar da amostra 209 ter apresentado a pior média de germinação, não há condições de dizer se tal desempenho é em função da qualidade fisiológica da semente ou efeito do fungo, uma vez que amostras com incidência de *S. sclerotiorum* muito próximas à da amostra em questão (305, 406, 110 e 404) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com a testemunha.

Nicholson et al. (1972) verificaram que, quando *S. sclerotiorum* foi recuperado em porcentagens maiores do que 25%, houve redução na germinação *in vitro* e na emergência de sementes de soja em campo. Steadman (1975) conduziu teste de germinação *in vitro* e relatou que as sementes de feijão não germinaram somente quando o fungo se desenvolveu primeiro, o que ocorre geralmente nas sementes de aspecto anormal.

Tu (1988) trabalhou com uma amostra de sementes de feijão, com incidência de 89% e observou uma baixa porcentagem de germinação (12,5%), sendo que, das plântulas germinadas, 55% morreram devido a "damping-off", causado por *S. sclerotiorum* infectando o hipocótilo.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos com sementes de feijão, com porcentagens de infecção natural semelhantes e que tivessem

utilizado a mesma metodologia aqui apresentada (rolo de papel), de modo a verificar o efeito do patógeno na germinação de sementes, em condições de laboratório.

Para o teste de emergência em campo (Tabela 6) também não foram obtidos resultados que diferissem significativamente da testemunha a 5% de probabilidade, concordando com os dados obtidos nos testes de germinação, realizados em laboratório. Durante a realização do teste, os dados de temperatura (mínima, média e máxima), porcentagem de umidade relativa e precipitação foram obtidos diariamente no posto meteorológico da Estação Experimental da Agroflora, em Bragança Paulista, onde o teste foi conduzido (Anexos A e B). A irrigação foi realizada duas vezes ao dia, objetivando a manutenção de um microclima favorável à ocorrência do patógeno. Os dados obtidos para o mês de julho mostram uma temperatura média de 16,7°C, com máxima de 23,6°C, mínima de 9,8°C e umidade relativa de 80,7%. Para o mês de agosto, a temperatura média foi 18,1°C, com máxima de 26,5°C, mínima de 9,8°C e umidade relativa na faixa de 69,4%, demonstrando que as condições de temperatura e umidade locais, eram favoráveis ao aparecimento do patógeno, de acordo com a literatura consultada (Abawi & Grogan, 1975; Weiss et al., 1980; Boland & Hall, 1987). Os resultados apresentados estão de acordo com os obtidos por Steadman (1975) em casa de vegetação que, trabalhando com sementes provenientes de campos infectados, verificou que as sementes não deram origem a plântulas com sintoma de mofo branco, mesmo quando foram utilizadas sementes esbranquiçadas.

4.5. Efeito de *S. sclerotiorum* no desenvolvimento inicial de sementes inoculadas artificialmente

4.5.1. Inoculação artificial de sementes com *S. sclerotiorum*

Uma vez que a incidência de *S. sclerotiorum* detectada em amostras naturalmente infectadas foi baixa (máximo de 2,25%), não tendo sido observados efeitos na germinação e emergência, optou-se pela inoculação artificial de sementes, de modo a se obter taxas mais elevadas de infecção do patógeno.

Os resultados de incidência de *S. sclerotiorum*, nas sementes de feijão inoculadas artificialmente, com 3 isolados diferentes, pelo método de contato por 30 horas, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Incidência de *S. sclerotiorum* (%) em sementes de feijão inoculadas com 3 isolados, com ou sem assepsia superficial.

Isolados	Sem assepsia	Com assepsia	Médias
H.LI	47,25*aA**	27,75 ^a B	37,50a
339 L2	53,50 aA	18,50 bB	36,00ab
Rib L3	44,75 aA	17,50 bB	31,13 b
Testemunha	0,00	0,00	
Média	48,50 A	21,25 B	
CV(%) = 8,40			

*Média de 4 repetições de 100 sementes.

**Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas na horizontal.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise de variância não mostrou serem significativas, a 5% de probabilidade, as diferenças na incidência de *S. sclerotiorum*, obtidas para cada isolado, quando as sementes não foram submetidas a assepsia superficial. A incidência do patógeno foi significativamente superior nas sementes não submetidas à assepsia.

Quando a assepsia foi realizada nas amostras, previamente à instalação do teste, a análise de variância mostrou diferenças significativas de incidência, a 5% de probabilidade, sendo que as sementes inoculadas com o isolado HL1, apresentaram maior incidência, quando comparadas com as sementes inoculadas com os demais isolados. Tal resultado pode ser explicado pelo fato do isolado HL1 ser mais agressivo quando comparado com os demais, resultando em maior porcentagem de infecção.

A assepsia superficial permitiu verificar se o patógeno estava interna ou externamente associado às sementes e, portanto, a eficiência do método na obtenção de sementes infectadas, mostrando-se a metodologia de contato por 30 horas eficiente para esta finalidade.

Na natureza, a maneira mais comum de associação de patógenos com as sementes é o transporte interno, com o inóculo presente na testa, tegumento ou embrião (Tanaka, 1990). É, portanto, de grande interesse a obtenção de sementes infectadas nos processos de inoculação artificial, de maneira semelhante à que ocorre naturalmente, para serem utilizadas em experimentos para avaliar os efeitos sobre as sementes e plântulas (morte, tombamento, debilitação da plântula), transmissão e epidemiologia.

Neste estudo, os resultados de incidência, obtidos com os diferentes isolados de *S. sclerotiorum* com e sem assepsia, foram bem superiores aos obtidos por Peres (1996), quando trabalhou com sementes de feijão inoculadas com 4 isolados diferentes e obteve incidências de 0,0 a 31,0% e 0,0 a 8,6% em sementes com e sem assepsia, respectivamente. De acordo com essa autora, pode ocorrer afinidade de alguns isolados por certas

espécies, devido a fatores como composição química, anatomia e nível de vigor.

4.5.2. Efeito de *S. sclerotiorum* na germinação de sementes inoculadas artificialmente

Na Tabela 8 encontram-se os resultados dos testes de germinação incubados a 20 e 25°C, bem como a porcentagem de plântulas lesionadas, observadas nestes testes, realizados com sementes de feijão inoculadas artificialmente, com três isolados diferentes.

Tabela 8 – Porcentagem de germinação e plântulas lesionadas obtidas a partir de sementes inoculadas com 3 isolados e incubadas sob duas temperaturas.

Isolados	Germinação(%)			P.L.(%) ¹		
	20°C	25°C	Médias	20°C	25°C	Médias
H L1	85*a**A	87aB	86a	15aA	10aB	13a
339L2	78 a A	87aB	83a	21aA	11aB	16a
RibL3	85 a A	87aB	86a	14aA	10aB	12a
Testemunha	86 a A	88aB	87a	0	0	
Média	83 A	87 B		17A	10B	
CV(%) =	5,66			14,42		

* Média de 4 repetições de 50 sementes.

** Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas na horizontal.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹P.L. – Plântulas normais lesionadas + plântulas anormais lesionadas.

Segundo os resultados apresentados na Tabela 8 não houve diferença estatística significativa, a nível de 5% de probabilidade, entre as porcentagens de germinação obtidas com as sementes inoculadas e a testemunha, sendo que as médias de germinação obtidas para cada isolado também não diferiram da testemunha. A única diferença significativa observada, para este teste, foi entre as médias de germinação obtidas em cada temperatura e, seguindo o resultado obtido em 4.4, a temperatura que se mostrou mais favorável foi 25°C. Os resultados obtidos indicam, a princípio, que o referido fungo não é capaz de prejudicar o feijão em sua fase inicial, partindo-se da inoculação artificial de sementes com micélio.

De acordo com a literatura disponível, *S. sclerotiorum* é um patógeno que, na maioria das vezes, causa infecção em plantas hospedeiras quando estas apresentam ferimentos ou após passar o fungo por uma fase de nutrição exógena (Chaves, 1964).

Goulart (1984) trabalhou com sementes de soja inoculadas com três formas diferentes de inóculo de *S. sclerotiorum* (ascosporos, micélio e escleródios) e verificou que, quando foi utilizada a suspensão de ascosporos, o efeito sobre a germinação foi mais drástico, comparado com a inoculação de sementes com micélio, que apesar de provocar redução na germinação, não apresentou resultados que diferissem da testemunha. Salustiano (1987) trabalhou com sementes de girassol inoculadas com as mesmas formas utilizadas por Goulart (1984) e concluiu que *S. sclerotiorum* não foi capaz de causar danos na fase inicial de desenvolvimento da planta.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, pode-se notar que não foram obtidas plântulas infeccionadas, mas plântulas denominadas lesionadas (equivale ao número de plântulas anormais deformadas, com lesão, somadas com as plântulas normais com lesão).

Essas plântulas foram denominadas lesionadas pois, ao contrário do que ocorreu com a testemunha, algumas plântulas originadas a partir de

sementes inoculadas apresentaram lesões necróticas no cotilédone (Figura 2); porém quando as mesmas foram incubadas em papel de filtro a 20°C, após 5 dias, não houve crescimento micelial nem formação de escleródios típicos de *S. sclerotiorum*.

Os resultados de plântulas lesionadas apresentados demonstram que, a exemplo do que ocorreu com o teste de germinação não houve diferença entre os resultados obtidos para cada isolado; porém, sob temperatura de 20°C, foi obtida uma média superior de plântulas lesionadas, diferindo estatisticamente do resultado obtido a 25°C.

Segundo Tanaka & Machado (1985) qualquer tipo de associação de patógenos com as sementes não assegura necessariamente o desenvolvimento de doenças, por ocasião da sementeira. A porcentagem de ocorrência de um patógeno na semente, determinada em laboratório, indica o perigo potencial de transmissão, assim como a porcentagem de germinação indica o potencial da semente produzir uma plântula normal. Para que essa potencialidade possa se desenvolver, há necessidade da interação de um complexo de fatores bióticos, durante o processo de germinação. Ainda de acordo com esses autores, a utilização de sementes portadoras de patógenos pode resultar, entre outras situações, na emergência e desenvolvimento de plântula sadia, ou seja, embora presente na semente, o patógeno não foi transmitido, por qualquer motivo que tenha impedido a infecção da plântula.

De acordo com Lumsden (1979), no processo de patogênese por *S. sclerotiorum*, são secretadas enzimas pectinolíticas e ácido oxálico, importantes na degradação da lamela média que une as células. Segundo o mesmo autor, a produção de ácido oxálico pelo patógeno é responsável por um abaixamento do pH, facilitando a ação das enzimas pectinolíticas, durante a patogênese, sendo considerado um forte agente quelante de cálcio e outros cátions, assim ele se liga com os cátions mono e divalentes, inibidores da maceração dos tecidos, causando os sintomas da doença.

O fato do fungo, mesmo estando associado à semente, não ter ocasionado a infecção de plântulas, apenas lesões nos cotilédones, pode ser explicado pela ausência de nutrientes exógenos, impedindo a produção de ácido oxálico e continuidade do processo de patogênese. Peres (1996), relatou que a falta de uma fonte de energia no substrato pode ter ocasionado a não produção de ácido oxálico. Purdy & Grogan (1954) mostraram que o crescimento de *S. sclerotiorum* e a formação de escleródios ocorreram apenas quando alguns nutrientes como P, K, Mg, N e C na forma orgânica estavam presentes ao meio, indicando a necessidade para alguns isolados, de uma fonte de energia para o crescimento em seus hospedeiros ou em meio de cultura.

Abawi & Grogan (1975) trabalharam com *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e verificaram que a infecção por micélio proveniente de escleródio, não foi observada no campo, atribuindo o fato à ausência de uma fonte de energia exógena. De acordo com Purdy (1979), apesar das plântulas jovens poderem ser atacadas por micélio proveniente de escleródios do solo, resultando em "damping-off", este problema não ocorre com frequência.

Figura 2 - Lesões necróticas observadas em algumas plântulas originadas a partir de sementes inoculadas artificialmente.

5. CONCLUSÕES

1. O método do papel de filtro, com incubação sob temperatura de 15°C em escuro contínuo, por um período de 14 dias, é uma alternativa viável para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão;
2. Utilizando-se o método do papel de filtro com incubação por 14 dias a 15°C foi possível a detecção de *S. sclerotiorum* em 35,1% das amostras provenientes de campos com ocorrência de mofo branco;
3. Não há correlação entre a presença de escleródios no refugo e a incidência de *S. sclerotiorum* na respectiva amostra de sementes de feijão;
4. *S. sclerotiorum* não causou nenhum dano ao desenvolvimento inicial de plântulas originadas de sementes naturalmente infectadas, com incidência de 0,50 a 2,25% do patógeno;
5. A inoculação de sementes de feijão com micélio de *S. sclerotiorum* não causou redução na germinação, sob duas temperaturas, mesmo tendo-se obtido infecção superior à encontrada em amostras naturalmente infectadas.

ANEXOS

Anexo A – Dados do Posto Meteorológico da Estação Experimental da Agroflora, em Bragança Paulista, do mês de julho de 1997.

DIA	° C					% U.R	PRECIP.	OBSERVAÇÕES
	TEMP. MIN	TEMP. MAX	TEMP. MEDIA	BULBO UMIDO	BULBO SECO			
1	12.4	23.0	17.7	13.2	14.4	89	00	Tempo nublado
2	11.4	20.0	15.7	16.6	19.8	72	00	Tempo bom c/nebulosidade
3	16.8	26.0	21.4	20.3	20.2	100	00	Tempo bom c/nebulosidade
4	9.2	22.0	15.6	17.4	21.4	65	00	Tempo parcialmente nublado
5	9.8	23.4	16.6	15.3	17.3	80	00	
6	9.7	23.6	16.7	15.2	17.3	80	70	
7	11.4	21.0	16.2	16.4	17.6	90	00	Tempo nublado
8	13.2	25.0	19.1	15.4	17.2	80	00	Tempo bom
9	9.4	23.2	16.3	15.3	17.2	80	00	
10	10.0	27.0	18.5	18.0	20.0	81	00	Tempo bom
11	9.4	27.0	18.2	17.6	19.4	81	00	Tempo nublado
12	9.7	23.3	16.5	15.2	17.2	80	00	
13	9.6	23.4	16.5	15.0	17.2	80	00	
14	8.0	26.0	17.0	14.0	16.0	79	00	Tempo bom
15	9.5	23.6	16.6	15.3	17.3	79	00	Tempo bom
16	11.0	27.0	19.0	17.4	22.0	58	00	
17	10.8	28.0	19.4	20.0	24.0	67	00	Tempo bom
18	9.8	23.4	16.6	15.3	17.3	80	00	
19	9.6	23.6	16.6	15.2	17.2	80	00	
20	9.7	23.5	16.6	15.2	17.3	80	00	
21	12.0	28.0	20.0	13.4	13.6	100	02	Tempo nublado
22	11.4	15.0	13.2	14.0	15.0	89	10	Tempo nublado
23	2.4	21.0	11.7	12.4	13.6	88	00	Tempo nublado
24	11.4	22.0	16.7	14.4	16.4	79	00	Tempo parcialmente nublado
25	11.6	22.0	16.8	14.2	16.4	79	00	Tempo bom
26	9.8	23.6	16.7	15.3	17.3	80	00	
27	9.6	23.5	16.6	15.2	17.2	80	00	
28	5.2	25.0	15.1	12.3	13.5	88	00	Tempo bom
29	5.4	26.0	15.7	13.0	15.0	79	00	Tempo bom
30	6.4	15.0	10.7	13.0	14.6	89	00	Tempo bom
31	7.4	27.0	17.2	13.4	16.2	69	00	Tempo bom c/nebulosidade

MEDIA: 9.77 23.58 16.68 15.29 17.29 80.68

TOTAL: 82

Anexo B – Dados do Posto Meteorológico da Estação Experimental da Agroflora, em Bragança Paulista, do mês de agosto de 1997.

DIA	° C					° U.R	PRECIP.	OBSERVAÇÕES
	TEMP. MIN	TEMP. MAX	TEMP. MEDIA	BULBO UMIDO	BULBO SECO			
1	7.0	28.0	17.5	14.2	17.0	70	00	Tempo bom
2	6.4	31.0	18.7	18.2	19.6	90	00	Tempo nublado
3	15.0	26.0	20.5	15.0	16.4	89	00	Tempo nublado
4	13.0	19.0	16.0	16.2	19.4	72	00	Tempo bom c/nebulosidade
5	9.8	26.3	18.1	15.1	18.2	71	00	
6	9.6	26.4	18.0	15.0	18.3	71	00	
7	10.2	29.0	19.6	17.2	21.6	65	00	Tempo bom
8	11.2	28.0	19.6	13.3	14.4	89	00	Tempo nublado
9	9.2	15.4	12.3	10.2	12.2	76	00	Tempo bom c/nebulosidade
10	5.2	16.0	10.6	8.4	12.3	54	01	Tempo bom c/nebulosidade
11	7.2	18.0	12.6	10.6	13.4	66	00	Tempo bom
12	5.0	25.0	15.0	12.6	15.4	68	00	Tempo parcialmente nublado
13	7.2	25.0	16.1	13.4	18.0	53	00	Tempo bom
14	8.2	27.0	17.6	13.8	16.6	69	00	Tempo bom
15	9.5	26.4	18.0	14.9	18.4	71	00	
16	8.0	29.0	18.5	22.2	22.1	100	00	Tempo bom
17	7.4	30.0	18.7	14.3	17.4	70	00	Tempo bom
18	10.0	29.0	19.5	16.0	22.6	50	00	Tempo bom
19	11.4	30.0	20.7	15.8	21.6	49	00	Tempo bom
20	9.6	26.2	17.9	15.1	18.2	71	00	
21	12.0	30.0	21.0	16.2	19.8	72	00	Tempo parcialmente nublado
22	12.0	25.0	18.5	17.6	20.0	72	00	Tempo parcialmente nublado
23	13.3	31.0	22.2	17.0	21.0	65	00	Tempo bom
24	15.0	25.0	20.0	16.0	16.1	90	20	Tempo chuvoso
25	9.7	26.4	18.1	15.0	18.3	71	00	
26	10.6	23.0	16.8	14.4	16.3	79	00	Tempo bom c/nebulosidade
27	9.0	26.3	17.7	15.1	18.4	71	00	
28	9.0	30.0	19.5	16.4	19.6	72	00	Tempo bom
29	9.6	31.0	20.3	15.2	21.4	49	00	Tempo bom
30	11.1	31.0	21.1	16.1	22.2	50	00	Tempo bom
31	12.1	31.0	21.6	17.2	24.2	46	00	Tempo bom

MEDIA: 9.79 26.46 18.13 15.09 18.40 69.39

TOTAL: 21

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.65, n.3, p.300-309, Mar. 1975.
- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.899-904, Aug. 1979.
- ABAWI, G.S.; POLACH, F.J.; MOLIN, W.T. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.65, n.6, p.673-678, June 1975.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.896-899, Aug. 1979.
- ADAMS, P.B.; TATE, C.J. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. **Plant Disease Reporter**, v.60, n.6, p.515-518, June 1976.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

- BEVERSDORF, W.D.; HUME, D.J. Ex Rico 23 White bean. **Canadian Journal of Plant Science**, v.61, n.4, p.1017-1018, Oct. 1981.
- BLODGETT, E.C. The *Sclerotinia* rot disease of beans in Idaho. **Plant Disease Reporter**, v.30, n.5., p.137-144, May 1946.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.9, n.3, p.218-224, Sept. 1987.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, n.2, p.93-108, June 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CARDOSO, J.E. Mofo branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. p.111-122 (EMBRAPA, CNPAF. Documentos, 50).
- CHAVES, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Experientiae**, v.4, n.2., p.69-133, Nov. 1964.
- COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. **Phytopathology**, v.65, n.3, p.250-255, Mar. 1975.

CORRADINI, H.I. Características em cultura pura e patogenicidade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). De Bary, associados a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) na região do Alto Parnaíba-MG. Lavras, 1989. 59p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

EMBRAPA. Serviço de Produção de Sementes Básicas. **Padrões estaduais de sementes**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1993, 47p.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1994. v.60, 856p.

GOULART, A.C.P. Avaliação do nível de ocorrência e efeitos de *Phomopsis* sp e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Lavras, 1984. 80p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

HAWTHORNE, B.F. *Sclerotinia minor* on lettuce: effect of plant growth on susceptibility to infection. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.17, n.3, p.307-392, Aug. 1974.

HOMECHIN, M. Situação atual da ocorrência de podridão de *Sclerotinia* causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15, São Paulo, 1982. **Fitopatologia Brasileira**, v.7, n.3, p.476, out.1982.

HUNGERFORD, C.W.; PITTS, R. The *Sclerotinia* disease of beans in Idaho. **Phytopathology**, v.43, n.9, p.519-521, Sept. 1953.

- KARL, A.C. Mofo branco, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em feijoeiro irrigado: estudos epidemiológicos, comparação de sistemas de cultivo e de cultivares. Brasília, 1997. 117p. Dissertação (M.S.) - Universidade de Brasília.
- KERR, E.D.; STEADMAN, J.R.; NELSON, L.A. Estimation of white mold disease reduction of yield and yield components of dry edible beans. **Crop Science**, v.18, n.2, p.275-279, Mar./Apr. 1978.
- KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap.19, p.297-318.
- KRUGNER, T.L; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. ; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. V.1, cap.4, p.46-96.
- KULIK, M.M. Symptomatology and epidemiology of several green bean diseases incited by seed-borne fungi. **Seed Science and Technology**, v.12, n.3, p.841-850, 1984.
- Le TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v.69, n.8 p.887-890, Aug. 1979.
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap.10, p.276-298.

- LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.890-896, Aug. 1979.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília. MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107p.
- MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. In: LUZ, W.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1994. v.2, p.229-263.
- MENEZES, J.R. Testes de sanidade de sementes de feijão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 18, p.395-405.
- MENEZES, J.R. Manejo integrado das doenças do feijoeiro irrigado. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJÃO, 5., Piracicaba, 1994. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1994, p.112-122.
- MENEZES, J.R. Controle integrado das doenças do feijoeiro comum irrigado por pivô central. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18, Piracicaba, 1995. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, p.65, jan./mar. 1995.
- MENTEN, J.O.M. Patologia de sementes: generalidades. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 1, Piracicaba, 1988. **Palestras**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p.1-28.

- MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. (Ed.) **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba-Agro, 1995. p.115-136.
- MENTEN, J.O.M. Situação dos padrões de sanidade de sementes. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 20, São Paulo, 1997. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.86-89, jan./mar. 1997.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, M.M.. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-86.
- NATTI, J.J. Epidemiology and control of bean white mold. **Phytopathology**, v.61, n.6, p.669-679, June 1971.
- NEERGARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1979. 2v.
- NEWTON, H.C.; SEQUEIRA, L. Ascospores as the primary infective propagule of *Sclerotinia sclerotiorum* in Wisconsin. **Plant Disease Reporter**, v.56, n.9, p.798-802, Sept. 1972.
- 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**, v.62, n.11, p.1261-1263, Nov. 1972.

- OLIVEIRA, S.H.F.; RECCO, C.A.; SUGAHARA, E; OLIVEIRA, D.A. Avaliação comparativa da fungigação e aplicação convencional de fungicidas para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.3-4, p.249-252, jul./dez. 1995.
- PATRICIO, F.R.A.; NETO, M.L.; BARROS, L.C.S.; ATALLA, L.M.P.; PIANOSKI, J.; FERREIRA, M.L.; BASTOS, F.M. Qualidade sanitária de sementes certificadas de feijão produzidas no Estado de São Paulo em 1994. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18., Piracicaba, 1995. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, p.58, jan./mar. 1995.
- PATTERSON, C.L.; GROGAN, R.G. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.69, n.9, p.766-770, Sept. 1985.
- PERES, A.P. Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias. Lavras, 1996. 51p. Dissertação (M.S.). Universidade Federal de Lavras.
- PITTIS, J.E.; MACHADO, J.C. Analysis of mycoflora of inert matter removed during the processing of soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.4, p.408-410, dez. 1987.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.875-880, Aug. 1979.

- PURDY, L.H.; GROGAN, R.C. Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. **Phytopathology**, v.44, n.1, p.36-38, Jan. 1954.
- REZENDE, L.O.C.; PESSANHA, B.M.R.; CAMPACCI, C.A.; HORINO, I. Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão vagem. **O Biológico**, v.35, n.1, p.8-12, jan.1969.
- RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases**. 4 ed. Zurich: ISTA, 1990.
- SANTOS, A.F.; ATHAYDE, J.F. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na região serrana do Estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, v.30, n.169, p.242-244, maio/jun. 1983.
- SALUSTIANO, M.E. Detecção de fungos e efeito de *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishiara, *Alternaria zinniae* Pape e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). Lavras, 1987. 73p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- SILVA, W.R. Controle de qualidade. In: MENTEN, J.O.M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba-Agro, 1995.p.7-19.
- STEADMAN, J.R. Nature and epidemiological significance of infection of bean seed by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.65, n.11, p.1323-1324, Nov. 1975.

- STEADMAN, J.R. White mold - a serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease**, v.67, n.4, p.346-350, Apr. 1983.
- SUTTON, D.C.; DEVERALL, B.J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v.32, n.3, p.251-261, Sept. 1983.
- TANAKA, M.A.S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. Piracicaba, 1990. 111p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- TANAKA, M.A.S.; MACHADO, J.C. Patologia de Sementes. **Informe Agropecuário**. v, 11, n.122, p.40-46, fev. 1985.
- TU, J.C. The role of white mold - infected white bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Journal of Phytopathology**, v.121, n.1, p.40-50, Jan. 1988.
- TU, J.C. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in nary bean. **Microbios**, v.57, n.231, p.85-91, 1989a. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1990-91./
- TU, J.C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, v.73, n.4, p.281-285, Apr. 1989b.
- VERDUGO, F.G.; FUCIKOVSKY ZAK, L. Algunos factores relacionados con el control de *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf y Dumont, agente causal del moho blanco del frijol. **Agrociência**, v.39, p.3-8, jan./mar.1980.

- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1988. 231p.
- VIEIRA, R.F. Mofo branco no feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v.17, n.178, p.54-63, 1994.
- WEISS, A.; KERR, E.D.; STEADMAN, J.R. Temperature and moisture influences on development on white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) on great northern beans. **Plant Disease**, v.64, n.8, p.757-759, 1980.
- WILLETS, H.J.; WONG, J.A.L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, v.46, n.2, p.101-165, Apr./June, 1980.