

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum ASSOCIADO A SEMENTES DE
SOJA**

GRAZIELI FROTAS DOS REIS

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL**

2013

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E CONTROLE DE *Sclerotinia*
sclerotiorum ASSOCIADO A SEMENTES DE SOJA**

GRAZIELI FROTAS DOS REIS

Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROF. Dra. LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

R375d Reis, Grazieli Frotas dos.
Detecção, transmissão e controle de *Sclerotinia sclerotiorum* associado a sementes de soja / Grazieli Frotas dos Reis – Dourados, MS : UFGD, 2013.
64 f.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo). 2. Sementes de soja. I. Bacchi, Lilian Maria Arruda. II. Título.

CDD: 632.4

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*
ASSOCIADO A SEMENTES DE SOJA**

por

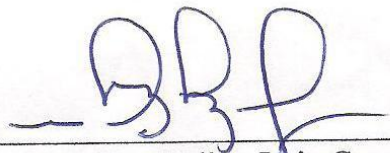
Grazieli Frotas dos Reis

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

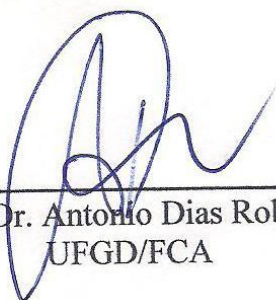
Aprovada em 27 /02 /2013



Prof.^a. Dr.^a. Lilian Maria Arruda Bacchi
Orientadora – UFGD/FCA



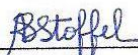
Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni
Co-Orientador – UFGD/FCA



Prof. Dr. Antonio Dias Robaina
UFGD/FCA



Dr.^a. Maria Izabel Kruger Giurizatto
IAGRO



Prof.^a. Dr.^a. Adriana Viana Schwan Stoffel
UNIGRAN

Aos meus pais, José Alves dos Reis Filho e Vilma Frotas,
Aos meus irmãos Marcelo e Simone,
Ao meu esposo Marcelo Zanin,
por sempre acreditarem em mim

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre incentivou e apoiou meus estudos.

Ao meu esposo Marcelo Zanin pelo amor, carinho e principalmente paciência.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lilian Maria Arruda Bacchi, pelo apoio, dedicação, paciência e orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Phd. Walber Luiz Gavassoni, pelos conselhos, orientação e exemplo de dedicação na vida acadêmica.

Aos demais professores da FCA-UFGD e do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA), pelos ensinamentos teóricos e práticos dispensados.

Ao técnico do laboratório de Fitopatologia Bruno Cesar Alvaro Pontim, pela grande ajuda e amizade.

Aos estagiários do laboratório que muito me ajudaram nos trabalhos desta pesquisa: Luana, Géssica, João Eugênio, Cássio, Evelin e Kenya.

Aos amigos Lucia Hirata, Lenita Conus, Luciano Venturoso, Anderson Bergamim, Fábio Souza, Anísio Nunes, Cláudia Zanella, Keila de Lucena, pelos bons momentos e amizade sincera que construímos.

Aos colegas de pós-graduação por compartilharem o caminho.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul- FUNDECT, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pelo apoio financeiro para realização do projeto.

À Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal- Iagro, em especial a Dr^a. Maria Izabel Kruger Giurizatto, e ao laboratorista Vicente Mário de Faria Maciel pelo apoio para realização dos trabalhos.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização do curso.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão e reconhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	4
TRANSMISSÃO SEMENTE – PLÂNTULA DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM SOJA.....	8
Resumo	8
Abstract.....	9
Introdução	10
Material e Métodos	1
Resultados e Discussão	1
Conclusão.....	1
Referências Bibliográficas	16
MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM SEMENTES DE SOJA.....	1
Resumo	1
Abstract.....	2
Introdução	19
Material e Métodos	21
Resultados e Discussão	23
Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas	29
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM SEMENTES DE SOJA PRODUZIDAS NO MATO GROSSO DO SUL.....	29
Resumo:	29

Abstract:.....	29
Introdução	29
Material e Métodos	34
Resultados e Discussão	36
Conclusões	36
Referências Bibliográficas	43
AÇÃO DE FUNGICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL, PRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43
Resumo:..	43
Abstract	47
Introdução	47
Material e Métodos	50
Resultados e Discussão	52
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	62

RESUMO GERAL

Avaliou-se detecção, transmissão e controle de *Sclerotinia sclerotiorum* associados a sementes de soja. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da UFGD em Dourados-MS. Com o objetivo de avaliar a transmissão semente-plântula do patógeno, sementes de soja inoculadas artificialmente com o patógeno foram misturadas a sementes sadias, estabelecendo-se cinco níveis de incidência (0, 2, 4, 8 e 10%). As sementes foram semeadas em solo + areia, em caixas plásticas, marcando-se a posição das sementes inoculadas. Avaliou-se a porcentagem de emergência aos 7 e 15 dias após a semeadura. O fungo foi observado em todas as plântulas oriundas de sementes inoculadas, mesmo naquelas que não apresentavam sintomas da doença. Nas plantas imediatamente ao lado das inoculadas, detectou-se a presença do patógeno em cerca de 39% delas à temperatura de 22° C, e 16,4% a 27° C. Nas plantas em segunda posição, a porcentagem média de presença do fungo foi de 23,35% e 8,75%, para 22 e 27° C, respectivamente. Lotes de sementes de soja produzidas e comercializadas no Mato Grosso do Sul nas safras 2008/09 e 2009/10 foram analisados quanto à sanidade pelo método do rolo de papel. A frequência de *S. sclerotiorum* variou de 1,2% a 11,1% na safra 2008/09 e 1% a 9,1% na safra 2009/10, enquanto que a incidência na safra 2008/09 ficou entre 0,25% e 0,75% e na safra 2009/10 foi de 0,25% a 1,5%. Estudando a sensibilidade *in vitro* de *S. sclerotiorum* aos fungicidas: cloreto de benzalcônio, captana, fluazinam, fluopiram, iprodiona, procimidona e tiofanato metílico em seis concentrações (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 µg.mL⁻¹) e cinco repetições, observou-se menor taxa de crescimento com o uso do fungicida procimidone a 0,1 µg.mL⁻¹. A partir de 1 µg.mL⁻¹ os fungicidas fluazinam e procimidone inibiram por completo o crescimento micelial e por consequência a produção de escleródios do fungo. Em doses superiores, os fungicidas captana, fluopiram, iprodiona e tiofanato metílico, mostraram-se eficientes em inibir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* alcançando 100% de inibição na germinação miceliogênica, enquanto o fungicida cloreto de benzalcônio inibiu em apenas 16% o desenvolvimento do fitopatógeno, não afetando a produção de escleródios.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, transmissão, detecção, controle químico

GENERAL ABSTRACT

The detection, transmission and control of *Sclerotinia sclerotiorum* associated with soybean seeds were as studied under laboratory conditions. The experiments were conducted in the laboratory of Phytopathology UFGD in the Dourados - MS. Aiming to evaluate the seed - seedling transmission of the pathogen, soybean seed artificially inoculated with the pathogen were mixed with healthy seeds, establishing five levels of incidence (0 , 2 , 4 , 8 and 10%). The seeds were sown in soil + sand in plastic boxes , marking the position of the inoculated seeds. We evaluated the percentage of emergence at 7 and 15 days after sowing. The fungus was observed in all inoculated seedlings derived from seeds, even those who had no symptoms of disease. On the inoculated plants immediately adjacent to, the presence of the pathogen was about 39 % of them at 22 ° C and 16.4% at 27 ° C. In the second position, the average percentage of presence of the fungus was 23.35% and 8.75% to 22 to 27 ° C, respectively. Lots of seeds produced and marketed in Mato Grosso do Sul in 2008/2009 and 2009/2010 harvests in were analyzed for sanity by the method of the paper roll. The frequency of *S. sclerotiorum* ranged from 1.2% to 11.1% in 2008/2009 and 1% to 9.1% in the 2009/2010 harvest, whereas the incidence in 2008/2009 was between 0.25% and 0.75% in the 2009/2010 crop was 0.25%. to 1.5% Studying the in vitro susceptibility of *S. sclerotiorum* to fungicides: benzalkonium chloride, captan, fluazinam, fluopiram, iprodione, procymidone and thiophanate methyl in six concentrations (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg. mL⁻¹) and five replicates, we observed lower growth rate with the use of the fungicide procymidone 0.1 µg.mL⁻¹. From 1 µg.mL⁻¹ the fluazinam and procymidone completely inhibited the mycelial growth and consequently the production of sclerotia of the fungus. At higher doses, the fungicides captan, fluopiram, iprodione and thiophanate methyl were effective in inhibiting the growth of *S. sclerotiorum* reaching 100% inhibition in miceliogênica germination, while the fungicide benzalkonium chloride inhibited only 16 % of the pathogen development without affecting the production of sclerotia.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, transmission, detection, chemical control

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial de grãos, principalmente da cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill). O país é o segundo maior produtor da oleaginosa e na safra 2011/12 alcançou índices de produção de 66,38 milhões de toneladas em uma área de 25 milhões de hectares. Mato Grosso do Sul se destaca em 5º lugar na produção nacional, com 4,62 milhões de toneladas e produtividade média de 2.550 kg.ha⁻¹, segundo dados da CONAB (2012).

Diversos fatores podem interferir na máxima produtividade da cultura e como principal limitante pode-se citar a ocorrência de doenças (GOULART, 2005). Patógenos podem acometer a cultura em todas as fases do desenvolvimento, e os danos decorrentes da associação patógeno-semente resultam na diminuição da emergência de plântulas e da produtividade, podendo causar prejuízos para todo o sistema agrícola com a disseminação de doenças, tornando regiões impróprias para o cultivo de determinada espécie. Desta forma, no controle de qualidade é cada vez mais importante a sanidade das sementes, pois a presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento (ITO e TANAKA, 1993).

A qualidade das sementes pode ser definida como sendo o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam sua capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizada pela sua germinação, vigor e produtividade (MARCOS FILHO, 2005).

Várias doenças de importância econômica estão associadas à transmissão via semente. O patógeno pode ser carregado internamente e/ou transportado por frações impuras do lote, que podem conter micélios, corpos de frutificação e esporos de fungos; cistos ou galhas de nematóides, células e partículas bacterianas (MACHADO, 2000; BALARDIN et al., 2005).

O agente causal do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary)), está entre os patógenos de maior destaque na cultura da soja. A doença vem recebendo atenção nos últimos anos pelo aumento de áreas contaminadas em vários estados do país como Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais, com perdas da ordem de 30%, podendo atingir até 100% em períodos chuvosos, caso medidas preventivas não sejam adotadas (CARREGAL et al., 2005; JACCOUD FILHO, et al., 2010; JULIATTI e JULIATTI, 2010; LEITE, 2005).

O fungo pode se associar às sementes como micélio dormente em seu interior ou acompanhando as sementes, na forma de escleródios (DHINGRA, 2005). A associação deste patógeno com a semente constitui uma das vias mais efetivas de introdução e disseminação de inóculo em novas regiões.

Em 27 de fevereiro de 2009 foi colocada em consulta pública a Portaria N° 47 do MAPA, que estabelece níveis de tolerância de pragas para Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas (PQNR). No caso da soja, foi proposto nível de tolerância 0 (zero) para a presença de escleródios de *S. sclerotiorum*, em 500 gramas de sementes secas, inspecionadas com lente de aumento. Todavia, vale ressaltar que o fungo pode também ser disseminado via micélio dormente, infectando a semente. Yang et al. (1998) comprovaram a transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente de soja internamente infectada, demonstrando que a mesma é um agente de disseminação do patógeno para novas áreas.

Hoffman et al. (1998), estudando a qualidade de sementes de soja produzidas em campos infestados pelo patógeno *S. sclerotiorum*, constataram a presença do fungo em um índice 0,3 a 0,7% nas sementes, representando um potencial significativo de propagação do patógeno e da doença. Mesmo sendo considerada baixa a taxa de transmissão, existe a necessidade de se detectar *S. sclerotiorum* em sementes naturalmente contaminadas, que serão comercializadas pelas regiões produtoras de soja do país, pois cada semente contaminada pode produzir mais de um escleródio e este, por si só, pode produzir até 20 apotécios com a capacidade individual de liberar 2.000.000 ascósporos em 10 dias (STEADMAN, 1983).

O estabelecimento de níveis de tolerância em programas de certificação de sementes é uma alternativa que pode auxiliar no controle e introdução do mofo-branco para novas regiões. Existem vários métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, reprodutibilidade, economicidade e rapidez de resultados (MACHADO, 2002; BRASIL, 2009). As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) recomendam o teste de papel de filtro (*blotter test*); incubação no rolo de papel; método incubação em meio agar-bromofenol (NEON) para soja além da inspeção visual das sementes. Apesar das técnicas recomendadas, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos e/ou ajustados a fim de minimizar alguns problemas nos testes já estabelecidos como padrão, como por exemplo, redução do tempo de avaliação de amostras e custos das análises, diminuição de riscos aos operadores e necessidade de

garantir viabilidade na amostragem de lotes em laboratórios de rotina (BARROCAS, 2011).

Juntamente com a necessidade de identificar a presença do patógeno em lotes de semente, outra grande questão são as formas de controle do patógeno. O controle de *S. sclerotiorum* é dificultado principalmente pela formação de estruturas de resistência, os escleródios, que podem sobreviver vários anos na ausência do hospedeiro e pela falta de eficiência dos fungicidas normalmente utilizados. Assim, as recomendações para o controle da doença baseiam-se no sistema integrado de medidas, como rotação de culturas, espaçamento entrelinhas, uso de fungicidas, controle biológico e utilização de sementes isentas do patógeno (JÚNIOR e ABREU, 2000; VIEIRA et al., 2001; LEITE, 2005; EMBRAPA, 2008).

Em função da expansão da ocorrência de mofo-branco e o consequente aumento de danos causados por esta doença à cultura da soja nas últimas safras, em 2008 foram iniciadas as atividades que deram origem ao ensaio cooperativo de controle químico de mofo-branco em soja, fruto de discussões da XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (MEYER e CAMPOS, 2011). Até o início de 2012 não havia produtos registrados pelo MAPA para controle de *S. sclerotiorum* na cultura da soja. A partir de meados de 2012, alguns produtos já utilizados para controle do patógeno em outras culturas foram alterados e ou incluídos para o controle de *S. sclerotiorum* na cultura da soja e hoje 16 produtos estão registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2012).

Neste sentido, a presente pesquisa objetivou: avaliar a taxa de transmissão de *S. sclerotiorum* via semente-plântula; comparar os métodos de incubação utilizados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, visando avaliar sua eficiência para análise em rotina de laboratórios; analisar os lotes de sementes de soja recebidos pelo Laboratório de Análise de Sementes Oficial da Iagro de Dourados/MS, produzidos e comercializados no estado do Mato Grosso do Sul quanto a presença deste fungo; e testar diferentes grupos químicos de fungicidas no controle do patógeno *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

BALARDIN, C. R.; CELMER, A. F.; COSTA, E. C.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.

BARROCAS, E. N. Métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Informativo Abrates**, v. 21, n. 3, p. 15, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. /Secretaria de Defesa Agropecuária/Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009, 200p.

CARREGAL, L. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C. **Saiba mais sobre Mofo Branco.** 2005 Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?ID=2065>> Acesso em: 25 jul. 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE SAFRA BRASILEIRA. **Acompanhamento de safra brasileira:** grãos, décimo levantamento, julho, 2012. Brasília: Conab, 2012. 29p.

DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária.** Viçosa: UFV, 2005. p.75-112.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil - 2009 e 2010.** Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 262 p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, n.13).

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de soja com fungicidas. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária.** Viçosa: UFV, 2005. p. 451-478.

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

ITO, M. F.; TANAKA, M. A. D. S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides.** Campinas: Fundação Cargill, 1993. 48 p.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do

Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010. p 226-228.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. Podridão Branca da haste de soja: Manejo e Uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia: **Composer**, 2010.

JÚNIOR, M. L.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 521-526, 2000.

LEITE, R. M. V. B. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, (**Comunicado Técnico, 76**) p.1-3. 2005.

MACHADO, A. Q. Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M. e NAKAGAWA, J. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 522-588.

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

MEYER, M. C., CAMPOS, H. D. Projeto em rede para avaliar a eficiência de produtos químicos no manejo do mofo branco em soja. In: **XI Simpósio Brasileiro de Patologias de Sementes**, Informativo **ABRATES** vol. 21, n. 3, 2011.

STEADMAN, J. R.. White mold-a serious yields-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, p. 346-350, 1983.

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

YANG, X. B., WORKENEH, F., LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v. 82, p. 264, 1998.

TRANSMISSÃO SEMENTE – PLÂNTULA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA

RESUMO: *Sclerotinia sclerotiorum* tem nas sementes um potencial veículo de disseminação, podendo estar internamente na forma de micélio dormente. Buscando avaliar o potencial de transmissão do patógeno, dois ensaios foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados. Foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo utilizadas 50 sementes por parcela. Sementes de soja inoculadas artificialmente com o patógeno foram misturadas a sementes sadias, estabelecendo-se cinco níveis de incidência (0, 2, 4, 8 e 10%). As sementes foram semeadas em solo + areia, em caixas plásticas, marcando-se a posição das sementes inoculadas. Avaliou-se a porcentagem de emergência aos 7 e 15 dias após a semeadura. As plântulas oriundas das sementes inoculadas, bem como suas vizinhas até a segunda posição, foram desinfetadas superficialmente e colocadas sobre meio Neon, para observar a presença do patógeno. O experimento foi conduzido em duas temperaturas (22 e 27° C). Não foi detectado efeito dos níveis de incidência de *S. sclerotiorum* testados sobre a emergência da soja. O fungo foi observado em todas as plântulas oriundas de sementes inoculadas, mesmo naquelas que não apresentavam sintomas da doença. Nas plantas imediatamente ao lado das inoculadas, o fungo foi detectado em cerca e 39% delas à temperatura de 22° C, e 16,4% a 27° C. Nas plantas em segunda posição, a porcentagem média de presença do fungo foi de 23,35% e 8,75%, para 22 e 27° C, respectivamente.

Palavras-chave: Taxa de transmissão, mofo branco, semente-plântula.

SEED –SEEDLING TRANSMISSION OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN SOYBEAN

ABSTRACT: *Sclerotinia sclerotiorum* has in seeds a potential vehicle for dissemination and may be internally in the seed as dormant mycelium. To assess the potential of pathogen transmission, two trials were conducted at the Universidade Federal da Grande Dourados. The experimental design used was a randomized blocks with five treatments and four replications, with 50 seeds per plot. Soybean seed artificially inoculated with the pathogen were mixed with healthy seeds establishing five levels of incidence (0, 2, 4, 8 and 10%). The seeds were sown in soil + experimental ground, plastic boxes, marking the position of the inoculated seeds. We evaluated the percentage of emergence at 7 and 15 days after sowing. The seedlings from inoculated seeds as well as their neighbors to the second position were superficially disinfected and placed on Neon media, to observe the presence of the pathogen. The experiment was conducted at two temperatures (22 and 27 ° C). No effects were detected of the levels of incidence on soybean emergence. The fungus was observed in all seedlings from inoculated seeds, even those that had no symptoms of disease. In plants immediately adjacent to the inoculated, fungus has been detected in approximately 39% of them at a temperature of 22 ° C, and 16.4% at 27 ° C. In plants in second position, the mean percentage of presence of the fungus was 23.35% and 8.75%, for 22 and 27 ° C, respectively.

Key-words: transmission rate, incidence, seed-seedling.

INTRODUÇÃO

A importância do aspecto sanitário no controle da qualidade de sementes vem sendo reconhecida de forma crescente. A transmissão de patógenos por sementes é um mecanismo eficiente pelo qual os fitopatógenos são introduzidos em novas áreas de cultivo, disseminados a longas distâncias e distribuídos através da população de plantas como focos de inóculo (TANAKA e MACHADO, 1985).

A patologia de sementes, com o auxílio da epidemiologia, pode contribuir com importantes ferramentas para o estudo da transmissão de patógenos por sementes e comparar epidemias a partir de sementes com diferentes níveis de inóculo. A patologia de sementes estuda os problemas diretamente relacionados às sementes como a porcentagem de sementes infectadas em determinado lote e a taxa de transmissão semente-plântula. A epidemiologia ocupa-se com a dinâmica de crescimento da doença e os danos causados pelo patógeno. Dessa associação pode-se inferir a importância relativa da presença do inóculo nos danos causados pela doença (BERGAMIN FILHO, 2005).

Além dos aspectos de transmissão e suas consequências epidemiológicas, a presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento (ITO e TANAKA, 1993).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco, é considerado na atualidade um dos principais patógenos na cultura da soja. Níveis de tolerância para o patógeno vêm sendo amplamente estudados. O MAPA pela Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, propôs nível zero para presença de escleródios em uma amostra de 1000 gramas de feijão, e 500 gramas de soja e girassol, entretanto, os níveis de tolerância para o patógeno não contemplam padrões para a presença do patógeno na forma de micélio dormente nas sementes, sendo esta uma forma de infecção com potencial para transmissão da doença.

Em áreas livres do patógeno, quando o inóculo não está presente no solo, uma epidemia da doença pode ser iniciada por meio de sementes contaminadas internamente pelo micélio dormente do fungo, ou por meio de escleródios associados ao lote de sementes (TU, 1988). A transmissão do fungo via semente também pode ocorrer por este estar aderido à superfície da semente ou no interior da mesma (camadas externas ou no embrião).

A taxa de transmissão corresponde à relação matemática entre o nível de ocorrência do patógeno presente na amostra em laboratório, determinado por teste de sanidade e a doença no campo. A simples presença de um patógeno em um lote de sementes ou no campo de produção não é suficiente para assegurar a sua transmissão às gerações subsequentes (MACHADO e POZZA, 2005).

No entanto, para *S. sclerotiorum*, a determinação de sua taxa de transmissão constitui importante subsídio para o estabelecimento do padrão de tolerância deste patógeno, dentro do processo de certificação de sementes (BOTELHO et al., 2010).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de emergência de plântulas e sanidade de plantas originadas de sementes com diferentes níveis de *Sclerotinia sclerotiorum*, sob duas condições de temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de soja, cultivar Dom Mario 7.0i (BMx Magma RR), foram inoculadas com um isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, mantido na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UFGD. Escleródios do fungo, armazenados no refrigerador, foram transferidos para meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar), colocando-se um escleródio na posição central da superfície do meio contido em placas-de-petri. As placas foram mantidas em câmaras incubadoras a 25° C, por 5 dias. Após esse período, sementes foram colocadas sobre as colônias do fungo, sendo incubadas por 30 horas a 20° C, no escuro, segundo Peres et al. (1998).

As sementes inoculadas foram misturadas a sementes sadias a fim de se obter cinco níveis de incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes (0; 2; 4; 8 e 10%). Para todos os níveis utilizou-se 200 sementes, sendo que para se obter o nível de incidência de 2% misturou-se quatro sementes inoculadas em 196 sementes sadias, e assim por diante até se obter o nível de 10% de incidência.

Duzentas sementes de cada nível foram semeadas em caixas plásticas, contendo como substrato uma mistura de solo e areia na proporção 2:1. Cinquenta sementes foram semeadas por caixa e marcou-se com um palito de dente a posição de cada semente inoculada na caixa, estas foram mantidas em sala de incubação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22° C. Em um segundo ensaio, a mesma metodologia foi utilizada, entretanto, o experimento foi mantido em casa de vegetação com temperatura de 27° C.

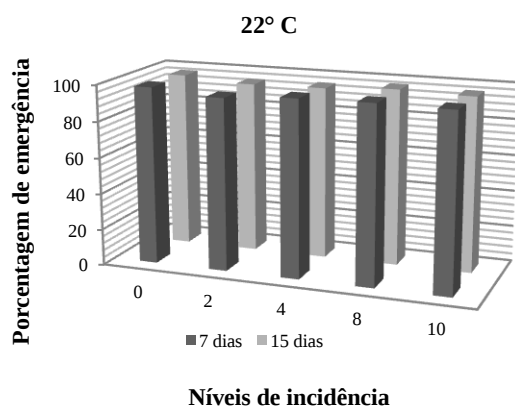
Foi avaliada a porcentagem de emergência de plântulas e as plântulas com sintomas de tombamento aos sete e quinze dias após a emergência. As plântulas originadas das sementes inoculadas, bem como as suas vizinhas até a segunda posição, foram desinfetadas superficialmente com álcool e hipoclorito de sódio, lavadas em água esterilizada e colocadas sobre meio Neon (BDA + antibióticos + azul de bromofenol), para observar o desenvolvimento do patógeno. Sendo um meio de cultura diferencial com coloração azulada, a mudança de coloração para amarelo indica a presença de *S. sclerotiorum*.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco tratamentos e quatro repetições de 50 sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão com auxílio do SANEST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância revelaram que não houve efeito dos níveis de incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes sobre a emergência da soja. Os tratamentos com diferentes níveis de incidência (2, 4, 8 e 10%) não diferiram da testemunha não inoculada aos sete e aos quinze dias nas condições de incubação de 22° C (Figura 1A) e 27° C (Figura 1B).

A



B

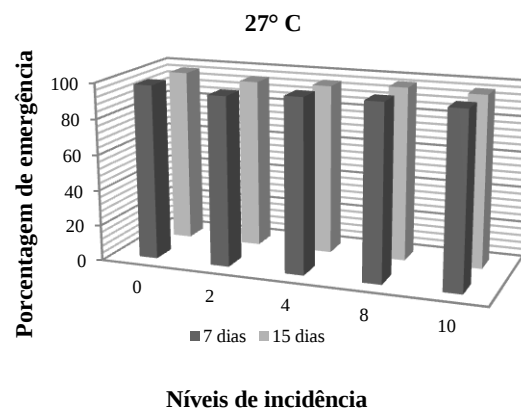


Figura 1. Porcentagem de emergência de plântulas de soja oriundas de amostras de sementes com diferentes níveis de incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*. A (temperatura média 22° C); B (temperatura média 27° C).

Muitas sementes contaminadas podem não germinar, mas podem resultar na produção de micélio e escleródios. Tu (1988), estudando a capacidade da sobrevivência de *S. sclerotiorum* em sementes infectadas por meio de micélios dormentes nos cotilédones, observou que sementes infectadas semeadas em terra/areia e que não germinaram, apodreceram e, no seu lugar, formaram de três a seis escleródios, concluindo que a detecção de micélios dormentes na semente do patógeno é importante não somente na disseminação do fungo, mas também na epidemiologia da doença.

S. sclerotiorum foi observado em todas as plântulas oriundas de sementes inoculadas, mesmo naquelas que não apresentavam sintomas da doença. Nas plantas

imediatamente ao lado das inoculadas, o fungo foi detectado em cerca de 39% delas à temperatura de 22° C e 16,4% a 27° C. Nas plantas em segunda posição, a porcentagem média de presença do patógeno foi de 23,5% e 8,75%, para 22° e 27° C, respectivamente (Figuras 2A e 2B).

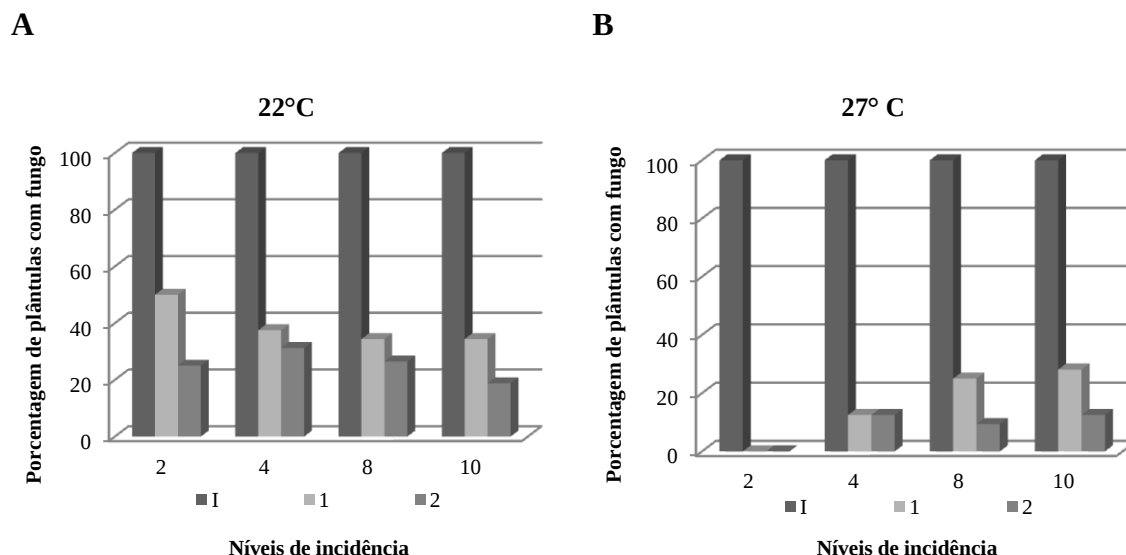


Figura 2. Porcentagem de plântulas com a presença do fungo (I- inoculada, 1- adjacentes de primeira posição e 2- adjacentes de segunda posição). **A**- Ensaio em sala de incubação (temperatura média 22° C), **B**- Ensaio em casa de vegetação (temperatura média 27° C).

A detecção de *S. sclerotiorum* em plântulas oriundas de sementes inoculadas e em plântulas adjacentes ocorreu independentemente do aparecimento de sintomas, ou seja, plântulas assintomáticas apresentaram a presença do fungo. Botelho et al. (2010), analisando plantas de soja desenvolvidas a partir de sementes inoculadas, observaram taxa de transmissão de até 33,5% em plantas sem sintomas.

Henneberg (2011), no entanto, ressalta que a transmissão de *S. sclerotiorum* pelas sementes não depende apenas da constatação de sua presença, mas também de fatores externos como os ambientais e bióticos, os inerentes ao patógeno como patogenicidade, agressividade e potencial de inóculo e ao hospedeiro como a suscetibilidade/resistência, mecanismos de resistência.

Workneh e Yang (2000) observaram maior incidência de *S. sclerotiorum* nas regiões de Minnesota e Iowa (Estados Unidos) em função das condições ambientais

favoráveis. Manosso Neto et al. (2010), ao estudarem a incidência de *S. sclerotiorum* em plantas de soja semeadas em oito épocas (safra 2009/10), observaram que a incidência é maior nas semeaduras realizadas entre setembro e outubro, concluindo que as condições ambientais e as épocas de semeadura podem propiciar o desenvolvimento da doença, tornando-as áreas de risco para produção de sementes de soja.

Segundo Dhingra (2005), um limite de tolerância considerado seguro para um conjunto de condições ambientais pode ser desastroso ou muito rígido para outro. Assim, a determinação do efeito ambiental sobre a transmissão deve ser considerada nas decisões sobre níveis de tolerância em programas de certificação de sementes (MC GEE, 1995).

Neste trabalho, embora tenha sido detectada transmissão semente-plântula de *S. sclerotiorum* de 100% nas temperaturas de 22 e 27° C, a disseminação para as plântulas vizinhas foi maior na temperatura mais baixa. Leite et al. (2000) destacam que a temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio situa-se entre 18 e 25° C. A melhor temperatura para a germinação dos escleródios do fungo e desenvolvimento de apotécio está entre 10 a 21° C (ALMEIDA et al., 2005).

Embora constatada uma alta taxa de transmissão nos ensaios desenvolvidos neste trabalho, é importante salientar que em condições experimentais, tudo leva ao desenvolvimento do patógeno. A transmissão de *S. sclerotiorum* de sementes inoculadas para vizinhas de até segunda posição, pode ter grande relação ao fato das sementes serem semeadas em bandejas onde não se consegue estabelecer o mesmo padrão de distância entre sementes que se tem no campo.

Hoffman et al. (1998), estudando a qualidade de sementes de soja produzidas em campos infestados pelo patógeno *S. sclerotiorum* observaram a incidência de 0 a 95% no campo e constataram a presença do patógeno em um índice 0,3 a 0,7% nas sementes, considerando que o risco de transmissão pela semente é baixo. Ainda que a taxa de transmissão por micélio dormente seja bastante baixa em um lote de sementes, a sua importância reside na possibilidade da introdução do inóculo em novas áreas de cultivo (HENNING, 2004).

Yang et al. (1998) comprovaram a transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente de soja internamente infectada, demonstrando que a mesma é um agente de disseminação do patógeno para novas áreas. Neste sentido, o uso de sementes isentas do fungo se torna um dos principais meios de controle de inóculo da doença na fase inicial.

CONCLUSÃO

Todas as plântulas oriundas de sementes infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* apresentaram o fungo, independente da presença de sintomas.

A transmissão entre plântulas é maior a 22° C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja. In: KIMATI et al. (Eds) **Manual de Fitopatologia**, Vol. II, 4 ed. São Paulo : Editora Agronômica Ceres, 2005, p. 569-588.
- BERGAMIN FILHO, A. Função de dano e epidemiologia de patógenos veiculados por sementes. . In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 35-54.
- BOTELHO, S. L.; BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; MARTINS, R. S. **Transmissão de *Sclerotinia sclerotiorum* por sementes de soja**. In: XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá. Tropical Plant Pathology, v. 35, p. 250-250. 2010. (Suplemento).
- DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 75-112.
- HENNEBERG, L. Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de soja. 2011. 73 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p. (Documentos, 235).
- HOFFMAN, D. D., HARTMAN, G. L., MUELLER, D. S., LEITZ, R. A., NICKELL, C. D., AND PEDERSEN, W. L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 82, n. 7, p. 826-829, 1998.
- ITO, M. F.; TANAKA, M. A. D. S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. 48 p.
- LEITE, R. M. V. B.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; CASTIGLIONI, V. B. R. Incidência de podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 81-84, 2000.
- MACHADO, J. da C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 375-398.
- MANOSSO NETO, M.O.; JACCOUD-FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Análise, distribuição e quantificação do “Mofo Branco” (*Sclerotinia sclerotiorum*) em diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná. In: XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá. **Resumo**. 2010. Tropical Plant Pathology v. 35, p. 287, 2010. (Suplemento)

MC GEE, D. C. Epidemiological approach to disease management through seed technology. **Annual Review Phytopathology**, v. 33, p. 445-466, 1995.

PERES, A. P.; MACHADO, J. C.; NASSER, L. C. B. Metodologia para obtenção de sementes de feijão e soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 413, 1998.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. da C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, v. 11, p. 40-46, 1985.

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

WORKNEH, F., YANG, X. B. Prevalence of sclerotinia stem rot of soybeans in the north-central Unites States in relation to tillage, climate, and latitudinal positions. **Phytopathology**, v. 90, n.12, p. 1375-1382. 2000.

YANG, X. B., WORKNEH, F., LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v. 82, n. 2, p. 264, 1998.

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO: Pela grande importância das sementes na disseminação de *S. sclerotiorum* e devido ao aumento de áreas produtoras de soja contaminadas nos últimos anos pelo patógeno, objetivou-se avaliar a sensibilidade dos testes de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes incubação em papel de filtro por 14 e 30 dias, rolo de papel e meio Neon. Sementes de soja inoculadas artificialmente foram misturadas a sementes sadias, estabelecendo assim quatro níveis de incidência do patógeno (0%, 2%, 4% e 8%). Duzentas sementes, divididas em amostras de 50 sementes foram incubadas seguindo as metodologias. Todos os métodos utilizados foram capazes de identificar *S. sclerotiorum* nas amostras testadas. Os métodos de detecção em papel de filtro por 30 dias e rolo de papel superestimaram os resultados, o método de papel de filtro por 14 dias e meio Neon apresentaram alta acurácia, entretanto, no meio Neon houve alto índice de contaminação.

Palavras-chave: Detecção, metodologias, patologia de sementes.

METHODS FOR DETECTION OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT: For the great importance of seed in the spread of *S. sclerotiorum* and due to increasing of soybean regions contaminated by the pathogen in recent years, we aimed to evaluate the sensitivity of testing for *S. sclerotiorum*: incubation on filter paper for 14 and 30 days, paper roll and Neon methods already reported in the literature. Seeds of soybean were inoculated and mixed to healthy seeds, thereby establishing four levels of pathogen incidence (0%, 2%, 4% and 8%). Two hundred seeds were divided into samples of 50 seeds and incubated following the methodologies. All methods were able to identify *S. sclerotiorum* in the samples tested. The methods of detection on filter paper for 30 days and paper roll overestimated the results, the method of filter paper for 14 days and Neon method showed high accuracy, however in the Neon method was a high rate of contamination.

Key-words: Detection, methodologies, seed pathology.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura que está sujeita ao ataque de vários microrganismos. Muitos desses microrganismos são agentes causais de doenças que podem ser transmitidas pelas sementes, destacando-se as causadas por fungos, não somente por aparecerem em maior número, como pelos prejuízos causados em termos de rendimento e qualidade das sementes (FRANÇA NETO e HENNING, 1984). A associação de fitopatógenos e sementes tem sido responsável por prejuízos em diferentes níveis na cadeia produtiva (GOULART, 2005).

O mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, tem sido uma doença de destaque nas principais regiões produtoras de soja do Brasil, com perdas de produção da ordem de 30%, podendo atingir até 100% em períodos chuvosos, caso medidas preventivas não sejam adotadas (CARREGAL et al., 2005; JACCOUD FILHO et al., 2010; LEITE, 2005).

A disseminação do fungo pode ocorrer pelos ascósporos que são liberados das ascas e ejetados no ar, pelos escleródios transportados na água de irrigação e/ou associados às sementes, e por meio das sementes infectadas, que têm um importante papel na infestação de áreas indenens e no estabelecimento da doença no início do ciclo da cultura (BIANCHINI et al. 1997; TU, 1988).

O fungo pode se associar às sementes como micélio dormente em seu interior ou acompanhando as sementes, na forma de escleródios. As sementes funcionam como fonte de inóculo, sendo responsáveis pela introdução de patógenos em novas áreas ou a reintrodução em áreas onde já existe. De acordo com a literatura, uma semente infectada corresponde a 2.000.000 de focos de infecção, considerando a formação de um escleródio por semente (STEADMAN, 1983).

A infestação de novas áreas é um sério problema, pois os escleródios podem permanecer viáveis por mais de 11 anos no solo (BOLTON et al., 2006). Além de ser uma doença altamente destrutiva, o controle é extremamente difícil, pois é praticamente impossível a erradicação do patógeno depois de introduzido na área (LOBO JUNIOR, 2010).

Uma das mais importantes estratégias de manejo de doenças é o diagnóstico preciso de patógenos, nas sementes, evitando a entrada do organismo na área. A Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) propõe que sejam recusados

lotes de sementes de soja que apresentam um escleródio em uma amostra de 500 gramas.

Entretanto, medidas obrigatórias sobre a presença do patógeno em semente na forma de micélio ainda não foram adotadas. Yang et al. (1998) comprovaram a transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente de soja infectada demonstrando que a mesma é um agente de disseminação do patógeno para novas áreas. Silva et al. (2008) observaram a formação de escleródios em sementes de feijão submetidas a teste de patologia, recomendando a não utilização dessas sementes.

Para o fungo *S. sclerotiorum*, a observação visual da presença de escleródios no lote de sementes deve ser aliada a outras técnicas. É recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), o teste de papel de filtro (*blotter test*) para culturas como soja, girassol, algodão, feijão e ervilha; incubação no rolo de papel e/ou o método incubação em meio agar-bromofenol (NEON) para soja e feijão e inspeção visual utilizando lupa para soja, algodão e feijão. Apesar das técnicas recomendadas, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos e/ou ajustados a fim de minimizar alguns problemas nos testes já estabelecidos como padrão, como por exemplo, redução do tempo de avaliação de amostras e custos das análises e diminuição de riscos aos operadores (BARROCAS, 2011).

O objetivo do trabalho, foi comparar metodologias existentes para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* e avaliar a precisão e acurácia dos testes, a fim de se estabelecer qual teste seria o mais indicado para avaliação de lotes de sementes em laboratórios de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no período de junho a setembro de 2009 no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Primeiramente, escleródios de um isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, mantidos na micoteca do laboratório de Fitopatologia da UFGD, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar), colocando-se um escleródio na posição central do meio solidificado. As placas foram mantidas em câmaras incubadoras a 25° C, durante 7 dias. Após o crescimento micelial por completo nas placas, discos de micélio de 3 mm foram retirados e novamente incubados em placas de Petri a fim de se obter colônias puras, em condições de incubação descritas anteriormente. Após 5 dias, quando as colônias de *S. sclerotiorum* já haviam tomado toda a placa, procedeu-se a inoculação das sementes. Assim, 50 sementes de soja foram colocadas nas placas de Petri (9cm) contendo *S. sclerotiorum*, ficando em contato com o micélio do fungo por um período de 30 horas, incubados a 20° C, sob escuro contínuo, de acordo com Peres et al. (1998).

Após o período de incubação, as sementes inoculadas foram misturadas com sementes sadias de modo a obter quatro níveis de incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes (0, 2, 4 e 8% de sementes inoculadas). Com esses diferentes níveis de incidência, avaliou-se a precisão e acurácia dos métodos em detectar o fungo *S. sclerotiorum*. Comparou-se os seguintes testes de sanidade de sementes:

1) Método do papel de filtro - “Blotter test” a 7 °C (BRASIL, 2009) : foram utilizadas caixas “gerbox” (11 x 11 x 3,5 cm), previamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 5%, contendo como substrato duas folhas de papel de filtro, esterilizadas em autoclave e umedecidas com água esterilizada na proporção 2,5 vezes a massa do papel seco e sobre estas foram dispostas sementes escolhidas aleatoriamente, utilizando 20 sementes por “gerbox”, totalizando-se 200 sementes.

Em seguida, as sementes foram incubadas a 7 °C durante 30 dias em escuro contínuo. As avaliações foram realizadas a cada seis dias, por meio da observação visual da formação de escleródios;

2) Método do papel de filtro - “Blotter Test” a 15 °C (KOCH E MENTEN, 2000): desenvolvido conforme descrito no item (1), porém com incubação a 15° C por 14 dias, em escuro contínuo.

3) Método de Incubação de Rolo de Papel (PARISI et al. 2006): consistiu na utilização do rolo de papel de germinação (Germitest ®), 28 x 37,5 cm, previamente esterilizado em autoclave e umedecido com água esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Cinquenta sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel de germinação sendo cobertas por outra do mesmo papel. Foi realizado o exame laboratorial de 200 sementes, distribuídas em quatro rolos, que posteriormente foram incubadas na vertical por 7 dias em câmara a 20° C dentro de sacos plásticos, para manter a umidade durante a incubação. As avaliações foram realizadas por meio da observação visual da formação de escleródios. Quando não foi possível a sua observação, plântulas infectadas e sementes mortas (circundadas por micélio característico de *Sclerotinia sclerotiorum*) foram transferidas para caixas gerbox, contendo duas folhas de papel de filtro previamente umedecido com água, e em seguida, incubadas sob regime de 12 horas de luz por 12 horas de escuro contínuo, a 20° C, por 3 dias, para observação da formação de escleródios nas sementes e plântulas;

4) Método de Incubação em Meio Agar-bromofenol (Neon) (PERES et al. 2002) : utilizou-se o meio de cultura constituído de Batata- Dextrose- Agar (BDA) + 150 mg.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina, + 150 mg.L⁻¹ de penicilina G + 150 mg.L⁻¹ de azul de bromofenol, sendo que vinte mililitros do meio foram vertidos em placas de Petri de 9 cm. Após solidificação do meio, 10 sementes foram incubadas por placa, totalizando 20 placas, a 18 + 2 °C, por sete dias, no escuro. As avaliações foram realizadas a partir de cinco dias de incubação, observando a formação do halo amarelo em torno da semente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente do método utilizado, observou-se sensibilidade dos testes para detecção do patógeno em amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, entretanto, a porcentagem de incidência na amostra e a detectada nas sementes foi superestimada pelas metodologias utilizadas, com o aumento do nível de incidência proposto na amostra, verificou-se acréscimo no número de sementes infectadas com *S. sclerotiorum*, confirmando relatos existentes na literatura, onde se utilizou a inoculação artificial para se avaliar a sensibilidade de métodos de detecção do fungo (PERES et al., 2002; NAPOLEÃO et al., 2006; HENNEBERG et al., 2012).

Nota-se na Figura 1, que no método de incubação em papel de filtro a 7 °C por 30 dias (BRASIL, 2009), a porcentagem de sementes contaminadas identificadas foi maior do que os níveis propostos na amostra.

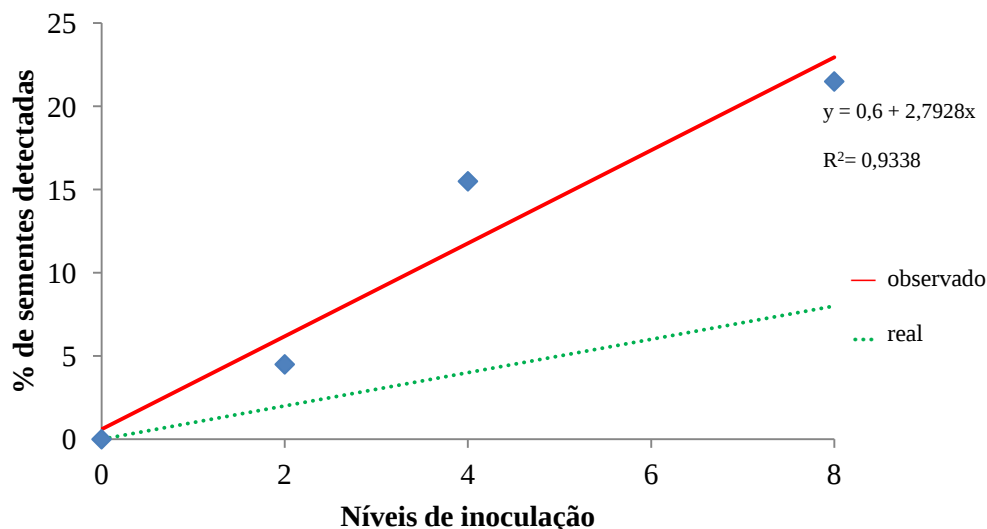


FIGURA 1. Detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja com diferentes níveis de inoculação pelo método de incubação em papel filtro por 30 dias. Dourados, MS/ 2010.

Essa diferença entre os níveis propostos e os níveis encontrados, demonstra baixa acurácia do teste. Isto pode ser devido a dois fatores, sendo o primeiro o fato das sementes serem inoculadas artificialmente, neste tipo de inoculação não é possível se estabelecer com precisão a carga de inóculo que está acompanhando a semente. Souza et al (2008) ressaltaram que em inoculações artificiais o potencial de infecção do

patógeno é maior, o que facilita o seu desenvolvimento em condições de incubação utilizadas nos testes de sanidade, pois o fungo depende somente do ambiente favorável para se desenvolver. Outro fator importante a ser considerado é o período de incubação das sementes. Os dados observados demonstram que 30 dias de incubação é tempo suficiente para o fungo se desenvolver ao ponto de contaminar sementes vizinhas às inoculadas, interferindo no resultado final. Este fato pode ser afirmado, comparando o teste do papel de filtro com incubação de 30 dias ao mesmo teste com período de incubação de 14 dias (Figura 2).

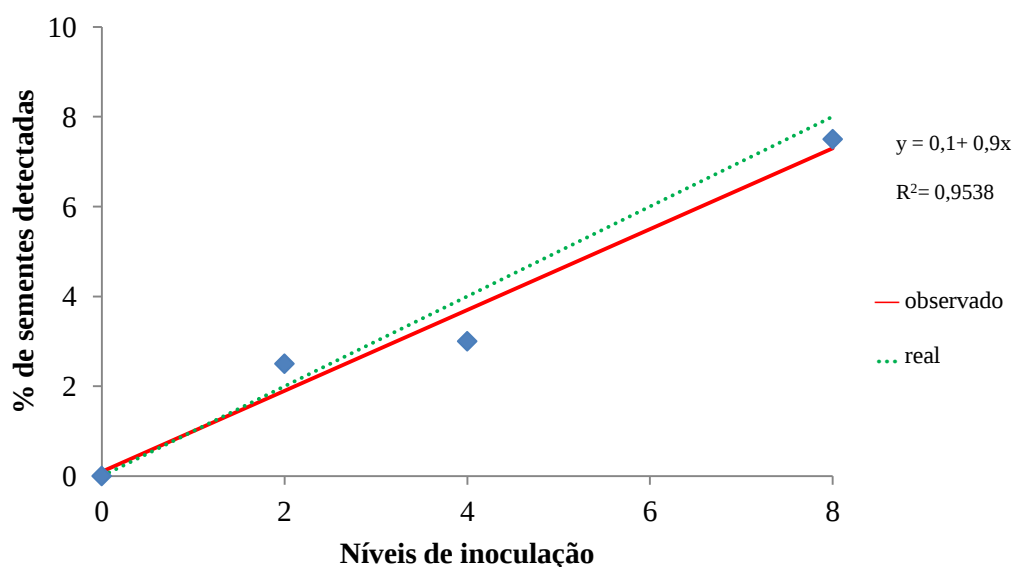


FIGURA 2. Detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja com diferentes níveis de inoculação pelo método de incubação em papel filtro por 14 dias. Dourados, MS/ 2010.

Observa-se uma maior acurácia no método de incubação em papel de filtro por 14 dias, onde a porcentagem de sementes detectadas foi mais próxima da esperada. Ainda é possível observar contaminação de sementes sadias ocasionada por sementes inoculadas, mas em menor escala. Nos maiores níveis de inoculação utilizados (4% e 8%), a possibilidade de mais sementes contaminadas estarem dentro de uma mesma caixa gerbox facilita o contato do micélio do fungo com sementes sadias, aumentando o número de sementes que deveriam ser detectadas.

Nas avaliações do método de incubação em papel de filtro observa-se com nitidez o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* sobre o papel utilizado no teste, a

partir de 20 dias de incubação nota-se a contaminação de sementes vizinhas e até de todas as sementes dentro de um mesmo gerbox.

Avaliando o teste de incubação em rolo de papel por 14 dias, constatou-se que os resultados foram semelhantes aos observados para o teste papel filtro por 30 dias (Figura 3). A incidência do patógeno detectada ao final do teste foi maior do que a esperada para todos os níveis que foram propostos.

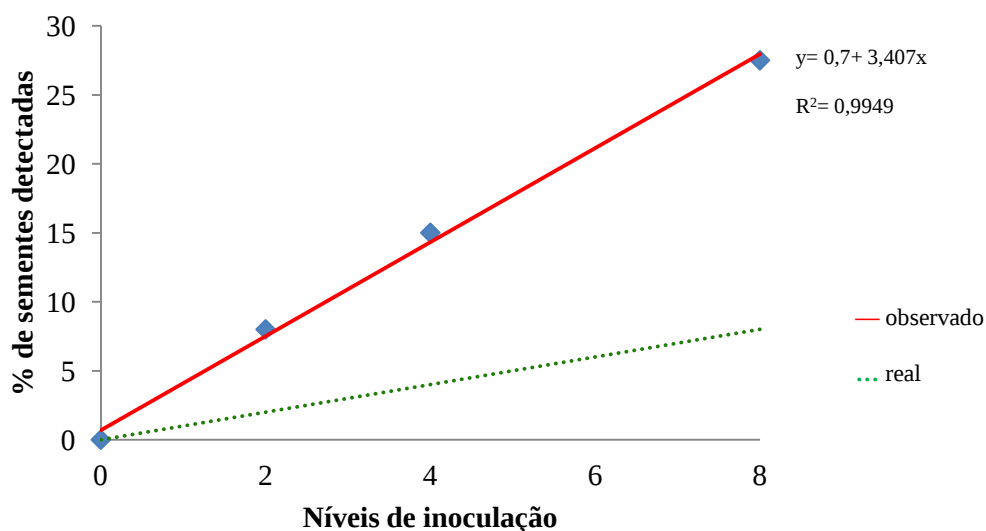


FIGURA 3. Detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja com diferentes níveis de inoculação pelo método do rolo de papel. Dourados, MS/ 2010.

A proximidade das sementes e o fácil desenvolvimento do patógeno sobre o papel utilizado no teste podem ser explicação para alta incidência observada em todos os níveis propostos. Parisi et al. (2006) apresentaram como uma desvantagem do teste em rolo de papel, a dificuldade de separar as sementes infectadas das saudáveis, ou seja, sementes infectadas podem contaminar as sementes vizinhas saudáveis, assim superestimar a incidência do patógeno *S. sclerotiorum*.

A facilidade de montagem e leitura do teste, aliado ao fato de ser um método barato e de baixíssimo risco, são fatores que devem ser considerados para o emprego da metodologia em análises de rotina.

O método de incubação das sementes utilizando o meio Neon obteve respostas satisfatórias quanto ao fator acurácia (Figura 4).

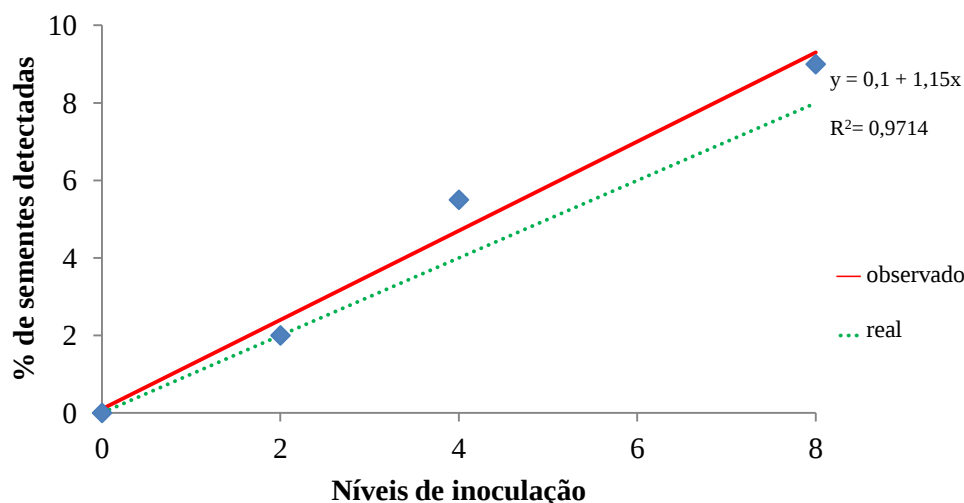


FIGURA 4. Detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja com diferentes níveis de inoculação pelo método de incubação em meio ágar bromofenol (Neon). Dourados, MS/ 2010.

O princípio do teste baseia-se na mudança de cor do meio do azul para o amarelo, devido ao ácido oxálico produzido pelo patógeno. A presença de ácido altera o pH do meio, fazendo com que o azul de bromofenol, um indicador ácido-base, mude de cor quando o pH atinge valores entre 4,6 e 3,0 (NASSER et al., 1995).

O meio Neon apresenta como vantagem a rapidez na obtenção dos resultados. A partir do terceiro dia de incubação as observações começam a ser realizadas para verificar a formação de halo amarelo ao redor das sementes. A visualização de micélio superficial sobre o meio na zona do halo amarelado, partindo das sementes, confirma a presença do fungo *S. sclerotiorum*.

Quando existe dúvida nos resultados, as sementes suspeitas são retiradas e incubadas em caixas gerbox em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 20°C de 3 a 4 dias para possível formação de escleródios. Entretanto, a rapidez com que se obtêm os resultados, esbarra na morosidade do preparo do meio e montagem do teste, tornando-se um grande inconveniente para o emprego da metodologia em análises de rotina, onde demandaria um emprego maior de mão de obra.

Outro ponto a se destacar, reside no fato do meio apresentar alto índice de contaminação por outros patógenos, isso pode ser devido ao enriquecimento do substrato, o que possibilita condições adequadas para o rápido desenvolvimento de fungos antagonistas ou indesejáveis (HENNEBERG, 2011).

A variação da porcentagem de sementes infectadas detectas em relação ao número de sementes infectadas na amostra, demonstra que os métodos existentes ainda precisam de ajustes, entretanto todos foram eficientes em identificar a presença de *S. sclerotiorum*, devendo chamar atenção para a maior acurácia observada nos métodos onde o período de incubação das sementes é menor, método de incubação em papel de filtro de filtro por 14 dias e em meio Neon. O tempo pode ser crucial nos resultados dos testes, já que dessa maneira a contaminação de sementes saudáveis por sementes infectadas é menor.

O fato dos métodos de incubação em papel de filtro e rolo de papel superestimarem a incidência do fungo na forma de micélio em sementes tem pouca importância para *S. sclerotiorum*, já que mesmo observando o nível de tolerância sugerido de zero escleródios em 500 gramas de sementes, sabe-se que a contaminação por micélio passa despercebida se estas não forem submetidas a testes de sanidade eficazes. O que realmente deve ser considerado é se o método apresenta a possibilidade de detecção de *S. sclerotiorum* por meio de um procedimento simples, sensível, de baixo custo e que possa ser facilmente aplicável em análises de rotina.

Henneberg (2011), avaliando diferentes métodos de identificação de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja de áreas contaminadas naturalmente, ressalta que não observou repetibilidade dos resultados, pois quando o mesmo método de detecção de *S. sclerotiorum* foi repetido para a mesma amostra, obteve resultados diferentes, o que pode possibilitar a interpretação de resultados como falso negativo.

As baixas incidências relatadas para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, raramente ultrapassando 2% (PERES, 1996), não torna menos relevante a detecção do patógeno em sementes, baseado no fato de que o mofo branco tem causado perdas expressivas na produção de soja e devido a importância das sementes na disseminação da doença.

Ainda que os testes de sanidade não sejam obrigatórios, deve haver um consenso da comunidade científica e de órgãos públicos responsáveis de que a detecção preventiva de *S. sclerotiorum* constitui-se uma das medidas mais econômicas e importantes para se evitar a introdução do patógeno em novas áreas e sua disseminação em lavouras comerciais.

CONCLUSÕES

Em todos os métodos avaliados foi possível detectar *S. sclerotiorum* em sementes inoculadas artificialmente.

Os métodos de incubação em papel de filtro por 14 dias e incubação em meio NEON, tiveram respostas semelhantes quanto à acurácia, ou seja, os níveis encontrados de incidência estavam mais próximos dos níveis propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROCAS, E. N. Métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Informativo Abrates**, v. 21, n. 3, p. 15, 2011.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda, v.2, p.376-399, 1997.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1-16, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAVE, 2009. 365 p.
- CARREGAL, L. H.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C. **Saiba mais sobre Mofo Branco**. 2005. Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?ID=2065>> Acesso em: 25 nov. 2012.
- FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de semente de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 39 p. 1984. (Circular Técnica, 9).
- GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de soja com fungicidas. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 451-478.
- HENNEBERG, L. Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de soja. 2011. 73 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PANOBIANCO M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.6, p.763-768, 2012.
- JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília. **Resumos**: Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010. p 226-228.
- KOCH, E. F. A.; MENTEN, J.O.M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.26, n. 2, p.276-279, 2000.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, p.1-3. 2005. (Comunicado Técnico, 76).

LOBO JUNIOR, M. **Mofo Branco – *Sclerotinia sclerotiorum***. Bahia – Fundação BA. p.12-13. 2010. (Fundação BA. Boletim Passarela da Soja, Ano 02, n. 2).

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.; LOPES, C.; CAFÉ FILHO, A. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. 2 p.180-182, 2006.

NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, suplemento, p. 376, 1995.

PARISI, J. J. D.; PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, S. H. F. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.3, p.288-290, 2006.

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. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras.

PERES, A. P.; MACHADO, J. C.; NASSER, L. C. B. Metodologia para obtenção de sementes de feijão e soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.3, p.413, 1998.

PERES, A. P.; NASSER, L. C. B.; MACHADO, J. C. Use of semi selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n. 2, p.123-127, 2002.

SILVA, G. C.; GOMES, D. P.; KRONKA, A. Z.; MORAES, M. H. Qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.29-34, 2008.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.41-48, 2008.

STEADMAN, J. R. White mold - a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.

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

YANG, X. B.; WORKENEH, F.; LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v.82, n. 2, p.264, 1998.

***Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA PRODUZIDAS NO MATO GROSSO DO SUL**

RESUMO: O aumento de áreas contaminadas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em diversas regiões produtoras do país, seu potencial de dano e difícil controle, o colocam, no momento, como um dos patógenos de maior importância para a cultura da soja. *S. sclerotiorum* tem nas sementes sua principal via de disseminação a longas distâncias. As sementes podem estar infectadas com o fungo na forma de micélio dormente ou contaminadas com escleródios. A Portaria n. 47, de 26 de fevereiro de 2009, estabelece nível de tolerância para *S. sclerotiorum* de zero escleródios em 500 gramas de sementes, entretanto os escleródios podem facilmente ser retirados de lotes de sementes, durante o beneficiamento, porém, aquelas infectadas com micélio dificilmente são detectadas sem um teste mais específico e ajuda de laboratório especializado. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes de soja produzidas no Mato Grosso do Sul nas safras 2008/09 e 2009/10. Para isso, 365 lotes da safra 2008/09 e 675 lotes da safra 2009/10, de 21 municípios do MS foram analisados quanto à sanidade pelo o método do rolo de papel. A frequência de *S. sclerotiorum* variou de 1,2% a 11,1% a na safra 2008/09 e 1% a 9,1% na safra 2009/10, enquanto que a incidência na safra 2008/09 ficou entre 0,25% e 0,75% e na safra 2009/10 foi de 0,25% a 1,5%.

Palavras-chave: Mofo branco, inóculo primário, qualidade sanitária.

***Sclerotinia sclerotiorum* IN SOYBEAN SEED PRODUCED IN MATO GROSSO DO SUL**

ABSTRACT: The rise of contamination by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in various regions of the country, its potential damage and difficult control, place it at the moment as one of the pathogens of greatest importance to the soybean crop. *S. sclerotiorum* has its seeds as the main mechanism of spread over long distances. The seeds may be infected with the fungus mycelium or contaminated with sclerotia. The normative law no. 47 of 26 February 2009 establishing the standard of tolerance for *S. sclerotiorum* sclerotia from zero in 500 grams of seeds, but the sclerotia can easily be removed from seed lots during processing, however, those infected with mycelium are hardly detected without a test more specific and specialized laboratory to help. Given the above, aimed to evaluate the occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seed lots produced in Mato Grosso do Sul in 2008/09 and 2009/10 crops. For this, 365 lots of the 2008/09 and 675 lots of 2009/10 crop of 21 municipalities in MS were analyzed for sanity by the method of the paper roll. The frequency of *S. sclerotiorum* ranged from 1.2% to 11.1% to in 2008/09 and 1% to 9.1% to in 2009/10, whereas the incidence in the 2008/09 crop was between 0.25 % and 0.75% and in 2009/10 was 0.25%. to 1.5%.

Key-words: White mold, primary inoculum, sanitary quality.

INTRODUÇÃO

O bom desempenho de uma cultura depende da qualidade das suas sementes, pois elas contêm todo o potencial genético que a planta pode expressar (MENEZES et al., 2011). No entanto, esse desempenho pode variar entre lotes de uma mesma espécie ou cultivar, dependendo dos seus aspectos físicos, sanitários, genéticos e fisiológicos (MARCOS FILHO, 2005).

Entre vários fatores que podem influenciar a qualidade das sementes, está a associação destas com microrganismos. A presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos na redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento (ITO e TANAKA, 1993).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um patógeno de importância mundial por ocorrer tanto em regiões temperadas quanto subtropicais e tropicais, além de ser um fungo polífago, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (BOLTON et al., 2006). O fungo pode estar presente internamente na semente na forma de micélio dormente ou misturado ao lote através de sua estrutura de resistência, o escleródio, facilitando a disseminação do patógeno a longas distâncias.

A utilização de sementes livres do fungo é uma medida que visa diminuir a disseminação do patógeno. A adoção de padrões de tolerância para o patógeno vem sendo amplamente estudada. O MAPA pela Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, propôs nível zero para presença *S. sclerotiorum* em 1000 gramas de sementes de feijão e 500 gramas de sementes soja e girassol quanto à presença de escleródios, entretanto, não existem níveis para a presença do patógeno na forma de micélio dormente nas sementes, sendo esta uma forma de infecção com potencial para transmissão da doença.

Os métodos de detecção do patógeno em sementes disponíveis hoje são satisfatórios (KOCH e MENTEN, 2000; PERES et al., 2002; PARISI et al., 2006; BRASIL, 2009), mas por não serem oficialmente exigidos, dificilmente são empregados, talvez por demandarem certa mão de obra, ou pelos custos. O fato é que o aumento de áreas contaminadas com *S. sclerotiorum* preocupa e pode ser um alerta para que novas medidas com relação ao controle da qualidade sanitária de sementes devam ser adotadas. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes de soja produzidas no Mato Grosso do Sul nas safras 2008/09 e 2009/10.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de lotes de sementes de soja, fornecidas pelo Laboratório de Análise de Sementes Oficial da Iagro de Dourados/MS das safras 2008/09 e 2009/10, foram submetidos aos testes de inspeção visual e avaliados quanto a presença de *S. sclerotiorum* pelo método de incubação em rolo de papel (PARISI et al., 2006), recomendados pelas RAS (BRASIL, 2009). Os testes foram realizados nos laboratórios de Sementes e Fitopatologia, da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. Foram analisadas amostras de 365 lotes da safra 2008/09 e 675 lotes da safra 2009/10, de diferentes categorias de sementes de soja. O número de lotes de sementes analisados de cada município e suas respectivas categorias de semente consta no Quadro 1.

Quadro 1. Relação de amostras de sementes de soja fornecidas pela Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO) e suas respectivas categorias.

Municípios	Safras													
	2008/09							2009/10						
	Categoria de Semente													
	S1	S2	C1	C2	B	G	T	S1	S2	C1	C2	B	G	T
Água Clara	*	*	*	*	*	*		0	2	0	0	0	0	2
Amambai	2	14	0	0	0	0	16	0	4	0	0	0	0	4
Antônio João	*	*	*	*	*	*		5	3	0	5	0	0	13
Bandeirantes	*	*	*	*	*	*		2	0	1	0	0	0	3
Caarapó	0	2	7	0	0	0	9	2	4	0	6	0	0	12
Campo Grande	*	*	*	*	*	*		3	0	1	12	0	0	16
Chapadão do Sul	4	26	3	4	0	0	37	0	12	0	6	0	0	18
Coxim	*	*	*	*	*	*		0	1	0	0	0	0	1
Costa Rica	7	6	6	6	2	0	27	25	22	4	0	0	0	51
Dourados	5	16	3	4	12	10	50	11	22	4	17	29	6	100
Fátima do Sul	*	*	*	*	*	*		0	0	0	1	0	0	1
Itaporã	3	3	5	1	0	0	12	*	*	*	*	*	*	
Jaraguari	11	13	7	0	0	0	31	8	13	1	3	0	0	25
Laguna Caarapã	0	0	1	0	0	0	1	1	3	3	4	0	0	11
Maracajú	5	3	3	0	1	0	12	9	0	2	25	0	1	37
Pedro Gomes	*	*	*	*	*	*		0	4	0	0	0	0	4
Ponta Porã	36	41	6	1	0	0	84	78	59	0	10	0	0	147
Rio Brilhante	7	1	8	1	0	0	17	*	*	*	*	*	*	*
São Gabriel do Oeste	19	32	4	5	8	0	68	59	102	13	28	0	0	203
Sidrolândia	0	1	0	0	0	0	1	10	2	0	10	0	0	22
Terenos	*	*	*	*	*	*		2	0	0	2	0	0	4
TOTAL							365							674

* município sem amostras na safra

Inspeção Visual da Amostra de Sementes: Utilizou -se uma amostra de 500 g de sementes de soja para avaliação da pureza física, através da inspeção visual verificando-se a presença ou não de escleródios de *S. sclerotiorum*. Para auxiliar a observação das sementes, utilizou-se uma lupa (BRASIL, 2009).

Teste de sanidade: Para avaliação da presença de *S. sclerotiorum* nos lotes de sementes, utilizou-se o método de incubação em rolo de papel (PARISI et al., 2006). Para condução do ensaio, amostras de 500 gramas de sementes foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em sala climatizada com temperatura de 20° C até o momento de realização do teste de sanidade, que consistiu na incubação das sementes em rolo de papel de germinação (Germitest[®]), 28 x 37,5 cm, previamente esterilizado em autoclave e umedecido com água esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Cada rolo foi constituído de três folhas de papel de germinação: duas sob as sementes e uma cobrindo-as. Foram submetidas ao teste 400 sementes por amostra, distribuídas em oito subamostras de 50 sementes por rolo.

Os rolos foram colocados na posição vertical por 7 dias em câmara a 20° C dentro de sacos plásticos para manter a umidade durante a incubação. As avaliações foram realizadas por meio da observação visual da formação de micélio característico ou escleródios. Quando não foi possível o diagnóstico, plântulas infectadas e sementes mortas (circundadas por micélio característico de *Sclerotinia sclerotiorum*) foram transferidas para caixas gerbox, contendo duas folhas de papel de filtro previamente umedecidas com água, e em seguida, incubadas sob o regime de 12 horas de luz por 12 horas de escuro contínuo, a 20° C, por 3 a 4 dias para confirmação de presença do fungo pela observação da formação de escleródios nas sementes e plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 100 sementes, totalizando 400 sementes (BRASIL, 2009). Fizeram-se as médias das quatro repetições de sementes com fungo encontrado para cada lote avaliado individualmente. Com esses dados, foram determinadas a frequência por município (porcentagem de lotes contaminados com *S. sclerotiorum* no município) e a incidência (porcentagem de sementes contaminadas com *S. sclerotiorum* na amostra avaliada) de ocorrência do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de inspeção visual não foi detectada a presença de *S. sclerotiorum* em nenhum dos 1039 lotes avaliados nas safras 2008/09 e 2009/10. A ausência de escleródios se deve ao fato que durante o processo de beneficiamento de sementes de soja, a separação de escleródios pode ser realizada pelo uso do separador espiral seguido da mesa de gravidade (HENNING, 2004; LEITE, 2005). Teles (2012), avaliando amostras de cultivares de soja coletadas em diferentes fases em uma unidade de beneficiamento de sementes (UBS), constatou que a partir da etapa de pré-limpeza, associada à etapa de limpeza, não foram mais encontrados escleródios, demonstrando ser o beneficiamento uma ferramenta útil para o controle de *S. sclerotiorum*, pois pode diminuir ou eliminar os escleródios associados às sementes, mostrando ser eficiente na eliminação do inóculo na forma de escleródios. Com isso, o beneficiamento pode ajudar a reduzir a quantidade de inóculo que poderia retornar às áreas de plantio na forma de escleródios. Napoleão (2001) observou que o beneficiamento das sementes de feijão, além de eliminar escleródios na pré-limpeza, diminuiu o número de sementes infectadas por *S. sclerotiorum*, pois estas, em geral mais leves, foram separadas das sementes maiores e de melhor qualidade.

Na avaliação sanitária para identificação de *S. sclerotiorum*, amostras de lotes de sementes de soja produzidos no Mato Grosso do Sul em diferentes municípios, nas duas safras avaliadas, apresentaram-se contaminados pelo patógeno.

Na safra 2008/09 o estado do Mato Grosso do Sul plantou uma área de soja equivalente a 1.711.468 hectares (IBGE, 2009), os municípios avaliados na safra em questão respondem por 70,24% dessa área. Dos 365 lotes avaliados provenientes de 13 municípios, *S. sclerotiorum* esteve presente em cinco lotes. A maior frequência entre os municípios com lotes contaminados foi observada em Caarapó (11,1%), a menor frequência entre os municípios com lotes contaminados foi de 1,2% verificada no município de Ponta Porã, também observou-se amostras contaminadas em lotes provenientes de Chapadão do Sul, Maracajú e São Gabriel do Oeste, com as frequências de 5,4%, 8,3% e 1,5% respectivamente (Figura 1A).

Na safra 2009/10, a área plantada da leguminosa, segundo dados do IBGE (2010), foi de 1.511.818 hectares, os municípios que tiveram amostras de lotes avaliados, representam 66,88% do total dessa área. Os municípios que apresentaram

maior frequência de lotes contaminados foram Laguna Caarapã (9,1%), Jaraguari (4%), São Gabriel do Oeste (1,5%) e Dourados (1%) (Figura 1B).

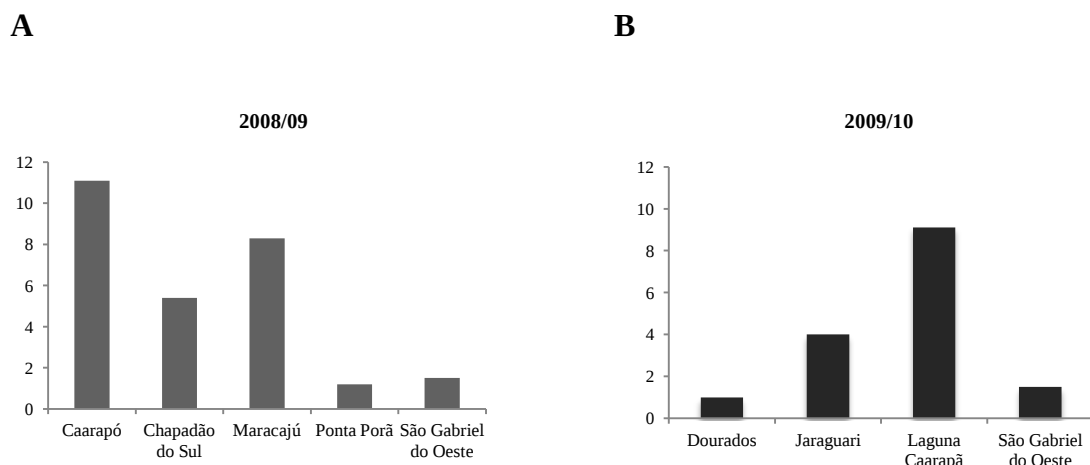


Figura 1. Frequência por município de Mato Grosso do Sul de lotes de soja contaminados por *Sclerotinia sclerotiorum* nas safras 2008/09 e 2009/10.

Na safra 2008/09, os municípios com lotes contaminados representaram 50,3% do total plantado no estado, já na safra seguinte 2009/10 esse índice diminuiu sendo estes municípios representativos de cerca de 28,8% da área plantada com soja no MS (IBGE, 2009). A presença do fungo *S. sclerotiorum*, nas regiões produtoras de sementes, serve de alerta para todo sistema produtivo, os danos ocasionados pelo patógeno e seu difícil controle, podem afetar o sistema produtor de soja com danos inestimáveis.

A incidência de *S. sclerotiorum* nos lotes avaliados da safra 2008/09 variou de 0,25% a 0,75%, já nos lotes da safra 2009/10 a incidência máxima do fungo foi de 1,5%, sendo verificada a presença do patógeno em diferentes categorias de sementes e cultivares (Quadro 2). Peres (1996) verificou que a detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão e soja raramente ultrapassa o índice de 2%, estando os índices encontrados neste levantamento de acordo com os descritos na literatura. Nasser et al. (1999), em levantamento realizado, observaram que os testes empregados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes comerciais de feijão apresentam sensibilidade de 0,25 a 2,30%, ressaltando que apesar da baixa porcentagem (0,25% - 1 em 400

sementes), esta representa 625 focos primários da doença (para uma população de 250.000 plantas.ha⁻¹).

Quadro 2. Incidência de *S. sclerotiorum* em lotes contaminados de sementes de soja produzidos e comercializados em Mato Grosso do Sul, nas safras 2008/09 e 2009/10.

Safra	Local	Categoria	Cultivar	Incidência (%)
2008/09	Caarapó	C1	BMX POTÊNCIA RR	0,25
2008/09	Chapadão do Sul	C2	G 8101 RR	0,75
2008/09	Chapadão do Sul	S2	CD 240 RR	0,5
2008/09	Maracajú	B	NA 5909 RG	0,25
2008/09	Ponta Porã	S1	CD 214 RR	0,5
2008/09	São Gabriel do Oeste	C1	M 7211 RR	0,25
2009/10	Dourados	B	BRS 246 RR	0,25
2009/10	Jaraguari	S2	BMX POTÊNCIA RR	0,25
2009/10	Laguna Caarapã	C2	NK 7059 RR	0,25
2009/10	São Gabriel do Oeste	C1	BRS FAVORITA RR	1,25
2009/10	São Gabriel do Oeste	C2	TMG 123 RR	1,5
2009/10	São Gabriel do Oeste	S2	M 7211 RR	0,25

O objetivo do teste de sanidade é determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e, conseqüentemente, do lote, obtendo-se informações confiáveis para comparar a qualidade de diferentes lotes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (HENNING, 1994; MACHADO, 2000).

A Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), e seu regulamento aprovado pelo Decreto no 5.153, de 23 de julho de 2004 (BRASIL, 2004), objetiva garantir a identidade e a qualidade do material de multiplicação e de reprodução vegetal produzido, comercializado e utilizado em todo o território nacional, através da certificação de sementes, que tem por objetivo a produção de sementes mediante controle de qualidade em todas as suas etapas, incluindo o conhecimento da origem genética e o controle de gerações.

O Decreto nº 5.153 (BRASIL, 2004) estabelece em seu Art. 35, as categorias de sementes genética, básica, certificada de primeira geração (C1), certificada de segunda geração (C2), S1 e S2. Nas categorias básicas, C1, C2, S1 e S2, a qualidade é garantida por padrões mínimos de germinação, purezas física e varietal e sanidade, exigidos por normas de produção e comercialização estabelecidos e controlados pelo governo (EMBRAPA, 2008). As sementes S1 e S2, apesar de não serem certificadas, são produzidas e comercializadas por produtores registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (RENASSEM).

A identificação de sementes contaminadas por *S. sclerotiorum* em lotes de categoria de sementes certificadas (básicas, C1 e C2), reacende a discussão sobre a implantação de níveis de tolerância para o patógeno. Ao se considerar apenas a presença de escleródios em uma amostra de 500 gramas, *S. sclerotiorum* transita livremente na forma de micélio dormente nas sementes. Neste levantamento 66,7% das amostras contaminadas foram diagnosticadas nas categorias de sementes certificadas, isso não quer dizer que o sistema é ineficiente, mas deve-se adotar medidas para detecção de *S. sclerotiorum* a fim de evitar a introdução do patógeno em áreas livres. Para tanto, o estudo mostra que a obrigatoriedade de testes de sanidade pode ser uma medida eficaz de controle do patógeno.

Não existe um histórico sobre a presença de *S. sclerotiorum* nas áreas onde as sementes foram produzidas, mas sabe-se que na soja, a frequência e a incidência de fungos nas sementes são variáveis em função de inúmeros fatores, principalmente das condições de clima durante o ciclo da cultura. Maiores níveis de infecções normalmente ocorrem em condições de abundante precipitação durante a maturação das sementes, agravando-se quando a colheita é retardada devido ao excesso de umidade (YORINORI, 1988).

Não se encontram dados na literatura sobre a suscetibilidade das cultivares de soja infectadas por *S. sclerotiorum* neste levantamento, para que se possa relacionar com a detecção na semente. Existe a hipótese de que o ciclo da cultivar poderia influenciar a incidência do patógeno na semente, em função do maior período de floração. Yang et al. (1999) verificaram que a incidência de *S. sclerotiorum* em cultivares de soja está relacionada com grupos de maturação. Segundo os autores, cultivares de ciclo longo são mais suscetíveis devido o período de florescimento ser maior, período no qual se observa bastante infecção, em função da liberação dos ascósporos.

Essa hipótese, entretanto, não pôde ser comprovada, uma vez que neste levantamento, o grupo de maturação das cultivares identificadas com a presença de *S. sclerotiorum* varia de 6,1 a 7,9, sendo consideradas de ciclo precoce e superprecoce para o Mato Grosso do Sul (Quadro 3). Henneberg, (2011), também não observou relação entre o ciclo da cultivar e a incidência de *S. sclerotiorum*, avaliando amostras de sementes de soja de regiões naturalmente infectadas, o autor identificou a presença do patógeno na cultivar Don Mario 5,8i considerada de ciclo superprecoce.

Neste levantamento, 58% das cultivares contaminadas por *S. sclerotiorum* possuíam flores brancas (Quadro 3), podendo ter alguma relação entre a cor da flor e a incidência de *S. sclerotiorum* como sugerido por Grau et al. (1982, que verificaram que cultivares de soja de flores roxas foram menos suscetíveis à *S. sclerotiorum* do que as de flores brancas. Garcia e Juliatti (2012) não encontraram relação entre a resistência à doença com a cor da flor, observando comportamento resistente a moderadamente resistente independente da cor da flor da cultivar.

Quadro 3. Grupo de maturação, ciclo e cor da flor de cultivares de soja contaminadas por *Sclerotinia sclerotiorum* nas safras 2008/09 e 2009/10 no Mato Grosso do Sul.

Cultivar	Grupo de Maturação	Ciclo	Cor da Flor
BMX POTÊNCIA RR	6.7	Semi Precoce	Branca
G 8101 RR	6.7	Semi Precoce	Roxa
CD 240 RR	6.9	Semi Precoce	Branca
NA 5909 RG	5.8	Precoce	Roxa
CD 214 RR	6.7	Semi Precoce	Branca
M 7211 RR	7.2	Semi Precoce	Roxa
BRS 246 RR	7.2	Semi Precoce	Branca
NK 7059 RR	6.1	Precoce	Branca
BRS FAVORITA RR	7.9	Semi Precoce	Roxa
TMG 123 RR	7.4	Semi Precoce	Branca

A identificação de *S. sclerotiorum* em áreas produtoras de semente no Mato Grosso do Sul é de grande importância, principalmente pelo potencial de disseminação

do patógeno e seu difícil controle, demonstrando assim que novas normas de produção e comercialização devem ser estabelecidas. Medidas que impeçam o avanço do patógeno devem ser tomadas, e neste sentido a obrigatoriedade dos testes de identificação de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes é relevante para manutenção do sistema produtor de soja.

CONCLUSÕES

A inspeção visual de uma amostra de 500 gramas de sementes de soja, não é o suficiente para determinar a qualidade sanitária do lote quanto à presença de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Com o uso do método de incubação em rolo de papel a 20° C por sete dias, foi possível identificar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes de soja.

A frequência de *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de lotes de sementes de soja produzidos no Mato Grosso do Sul variou de 1,2% a 11,1% na safra 2008/09 e 9,1% a 1% na safra 2009/10.

A incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* na safra 2008/09 ficou entre 0,25% e 0,75%, já na safra 2009/10 foi de 0,25% a 1,5%.

Os dados obtidos neste levantamento servem de alerta para o aprimoramento do sistema de controle de qualidade sanitária de sementes no país, e ressaltam a necessidade de se implementar níveis de tolerância para o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003 (dispõe sobre o sistema Nacional de Sementes e Mudanças). **Diário oficial da União**: Brasília, 6 de agosto de 2003. Seção 1, p.1-4.

BRASIL. Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004 (aprova Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003). **Diário oficial da União**: Brasília, 26 de julho de 2004. Seção 1, p.6-18.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil - 2009 e 2010**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 262 p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, n.13).

GARCIA R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inoculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.

GRAU, C.R.; RADKE, V.L.; GILLESPIE, F.L.; Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease** v. 66, p. 506-508, 1982.

HENNEBERG, L. Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de soja. 2011. 73 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

HENNING, A. A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 43 p. (Documentos, 90).

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p. (Documentos, 235).

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**, 2009. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 17 jan. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**, 2010. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 17 jan. 2013.

ITO, M.F.; TANAKA, M.A.S. **Soja - principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 1-2.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005, p.1-3. (Comunicado Técnico, 76).

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

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

MENEZES, V. O.; PERDOSO, D. C.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; ETHUR, L. Z.; SANTOS, R. F.; TUNES, L. M. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 193-199, 2011.

NAPOLEÃO, R. L. **Efeito do sistema de plantio, da irrigação e do espaçamento sobre o mofo-branco do feijoeiro, causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. 2001. 72 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

NASSER, L. C. B.; ARANCIBIA, R. C.; NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, suplemento, p. 309, 1999.

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.), **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 288-290, 2006.

PERES, A. P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias**. 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

YORINORI, J. T. Importância do aspecto sanitário em programas de produção de semente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3, 1988, Lavras. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, p. 29-32.

AÇÃO DE FUNGICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL, PRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO: Neste estudo avaliou-se a sensibilidade *in vitro* de *S. sclerotiorum* aos fungicidas: cloreto de benzalcônio, captana, fluazinam, fluopiram, iprodiona, procimidona e tiofanato metílico em seis concentrações (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e cinco repetições. Foi analisado o crescimento micelial da colônia fúngica, a porcentagem de inibição do crescimento micelial, a produção e massa de escleródios. Os resultados revelaram que o efeito dos fungicidas sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* foi dependente das concentrações utilizadas. Constatou-se maior atividade antifúngica conforme se aumentou a concentração dos fungicidas. Com exceção do cloreto de benzalcônio, todos os fungicidas foram eficazes em reduzir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. A menor taxa de crescimento foi verificada, com o uso do fungicida procimidone a 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os fungicidas fluazinam e procimidone inibiram por completo o crescimento micelial e por consequência a produção de escleródios do fungo. Em doses superiores, os fungicidas captana, fluopiram, iprodiona e tiofanato metílico, mostraram-se eficientes em inibir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* alcançando 100% de inibição na germinação miceliogênica, enquanto o fungicida cloreto de benzalcônio inibiu em apenas 16% o desenvolvimento do fitopatógeno, não afetando a produção de escleródios.

Palavras-chave: Mofo branco, fungicidas, controle químico.

FUNGICIDE ACTION ON MYCELIAL GROWTH, GERMINATION OF SCLEROTIA AND PRODUCTION OF *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT: This study evaluated *in vitro* susceptibility of *S. sclerotiorum* with fungicides: benzalkonium chloride, captan, fluazinam, fluopiram, iprodione, procymidone and methyl thiophanate in six concentrations (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 microg.mL⁻¹) and five replicates. We analyzed the mycelial growth of fungal colony, the percentage of mycelial growth inhibition, and mass production of sclerotia. The results showed that the effect of fungicides on the development of *S. sclerotiorum* was dependent on the concentrations used. Antifungal activity was increased as the concentration of fungicides. Except as benzalkonium chloride, all fungicides were effective in reducing mycelial growth of *S. sclerotiorum*. The lowest growth rate was observed with the use of the fungicide procymidone at 0.1 microg.mL⁻¹. From 1 microg.mL⁻¹, procymidone and fluazinam completely inhibited mycelial growth and consequently the production of sclerotia of the fungus. In higher doses, the fungicide captan, fluopiram, iprodione and thiophanate methyl were effective in inhibiting the growth of *S. sclerotiorum*, reaching 100% inhibition in germination while the fungicide benzalkonium chloride inhibited in only 16% of pathogen development, not affecting the production of sclerotia.

Key-words: White mold, fungicides, chemical control.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é, atualmente, uma das culturas de maior importância no Brasil e no mundo. Na safra 2011/2012, os EUA foi o maior produtor mundial do grão com 84,2 milhões de toneladas, seguidos pelo Brasil, com produção de 66,5 milhões de toneladas e a previsão para a próxima safra é que o país se torne o maior produtor mundial da oleaginosa (USDA, 2012).

Dentre os principais fatores que limitam o rendimento da soja, as doenças são as mais importantes. De acordo com Yorinori e Feksa (2001), a ocorrência de doenças é o fator limitante para obtenção de alto rendimento na produção de sementes de soja. Várias são as doenças que podem acometer a cultura, merecendo destaque as ocasionadas pelos fungos. A disseminação dos fungos pode ser feita pelo vento, água, inseto e animais, e através das sementes, a forma mais eficiente de disseminação dos fitopatógenos, que uma vez veiculados à semente têm maior chance de provocar doença nas plantas oriundas da mesma e se espalhar para outras plantas sadias, iniciando uma epidemia. (CARMONA et al., 2004; DHINGRA, 2005; TORRES e JÚNIOR (2009)).

A maioria dos patógenos da soja é transmitida pela semente e o uso de sementes portadoras destes, provenientes de diferentes áreas de produção, tem sido importante causa de introdução e aumento de novas doenças ou de raças fisiológicas de patógenos. O uso de sementes sadias ou o seu tratamento químico, evitaria a disseminação (NEERGARD, 1979; MACHADO, 1988; ZAMBOLIM, 2005; SOMDA et al., 2008).

Um dos grandes problemas na cultura refere-se ao mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary), também conhecido como podridão de esclerotínia. Além de atacar mais de 400 espécies hospedeiras, o patógeno pode sobreviver no solo por vários anos na ausência de hospedeiros, por meio de suas estruturas de resistência, os escleródios (BOLTON et al., 2006). Estes podem ser disseminados pelo transporte de solo contaminado, água de irrigação, misturados às fezes de animais que se alimentaram de plantas contaminadas e, ainda, misturados às sementes (TU, 1998).

O controle do mofo-branco é considerado difícil devido à ausência de cultivares resistentes, e algumas características do patógeno como produção de estruturas de resistência, sobrevivência no solo por vários anos na ausência de hospedeiros ou sob condições desfavoráveis, à sua ampla gama de hospedeiros, ao elevado número de ascósporos produzidos por apotécio e sua rápida e longa

disseminação a partir da fonte produtora, à sua sobrevivência em sementes sob a forma de micélio dormente ou escleródios aderidos às mesmas e também devido à dificuldade de se atingir os sítios de infecção através do controle químico. Desta forma, o controle mais efetivo baseia-se em um programa integrado com diversas práticas culturais (LEITE, 2005).

Esta doença vem, comprovadamente, trazendo prejuízos significativos aos sojicultores de vários estados produtores, como Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Bahia (FURLAN, 2008). Além das perdas diretas, existem também aquelas indiretas, como a condenação de áreas para a produção de sementes, o aumento do custo de produção e os custos ambientais decorrentes do controle químico (PAULA JUNIOR et al., 2008).

O uso de sementes certificadas, de procedência conhecida e com sanidade comprovada é fundamental para evitar a introdução do patógeno na área (LEITE, 2005). O tratamento das sementes com fungicidas pode ser adotado como medida de segurança para reduzir a possibilidade de transmissão do fungo por meio de micélio dormente (LEITE, 2005; ZAMBOLIM, 2005). Steadman (1979) relata ainda que a importância da infecção na flor e de um microclima favorável fornecem a base para o controle do mofo-branco. A utilização do controle químico, integrado a outras práticas culturais, pode prevenir o aparecimento da doença, visando proteger as flores da infecção pelos ascósporos produzidos em apotécios.

Segundo Furlan (2008), o fungicida a ser aplicado, deve ser posicionado no alvo no momento correto e de forma adequada para se obter controle econômico e racional da doença. As pulverizações devem ser realizadas uniformemente, com boa distribuição nos tecidos da planta e, se possível, alcançando a superfície do solo, onde surgem os apotécios e desenvolvem-se os micélios. A primeira pulverização deve ser feita preventivamente na abertura das primeiras flores.

Em função da expansão da ocorrência de mofo branco e o consequente aumento de danos causados por esta doença à cultura da soja nas últimas safras, em 2008 foram iniciadas as atividades que deram origem ao ensaio cooperativo de controle químico de mofo branco em soja, fruto de discussões da XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (MEYER e CAMPOS, 2011). Até o início de 2012 não havia produtos registrados pelo Ministério da Agricultura para controle de *S. sclerotiorum* na cultura da soja. A partir de meados de 2012, alguns produtos já utilizados para controle do patógeno em outras culturas foram alterados e ou incluídos

para o controle de *S. sclerotiorum* na cultura da soja e hoje 16 produtos estão registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes fungicidas em diferentes doses quanto ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Para a obtenção do inóculo, um escleródio foi colocado no centro de placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo meio BDA (Batata-dextrose-água), estas foram fechadas com filme PVC e levadas à câmara de incubação à temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, e fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Após este período, retiraram-se, com auxílio de um perfurador de 0,6 cm de diâmetro, os discos de micélio da margem das colônias e transferiu-os para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio BDA para obtenção de colônias puras. As colônias do isolado, em cultura pura, com 7 dias de idade constituiu a fonte de inóculo para a montagem deste ensaio.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, envolvendo sete fungicidas: cloreto de benzalcônio (Fegatex®), captana (Captan®750 TS), fluazinam (Frownicide®), fluopiram (Verango® 500 SC), iprodiona (Rovral®), procimidona (Sumilex®) e tiofanato metílico (Cercobim® 700 PM) em seis concentrações (0,1, 0,5; 1; 2,5; 5; 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e uma testemunha, totalizando 43 tratamentos.

A mistura de produto com o meio de cultura BDA foi realizada quando este ainda se encontrava em fase líquida, temperatura próxima de 45°C , após autoclavagem. O meio homogeneizado foi vertido em placas de Petri, 20 mL por placa, e depois de sua solidificação, efetuou-se a repicagem de um disco micelial de 0,4 cm de diâmetro de *S. sclerotiorum*, retirado das colônias puras com sete dias de idade, no centro da superfície do meio de cultura com os respectivos tratamentos. Posteriormente as placas de Petri foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a uma temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas a cada 12 horas, perdurando até o momento que as colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999).

Para avaliação dos tratamentos foram analisados o crescimento micelial e a porcentagem de inibição do crescimento. Para obtenção do crescimento micelial, as placas foram riscadas em sentido perpendicular, no intuito de mensurar o crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada uma média por placa.

A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da colônia fúngica foi calculada com a fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada fungicida em relação a testemunha (CELOTO et al., 2008). A taxa de crescimento foi mensurada conforme Benício et al. (2003), onde os dados foram plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) os dias de incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial da colônia e (b) a taxa de crescimento micelial, determinada pelo coeficiente de regressão.

Os dados obtidos de porcentagem de inibição foram transformados em arco seno da raiz de $x/100$, e submetidos à análise de variância com auxílio do programa SANEST. As médias dos fungicidas foram comparadas por meio do teste de Tukey a 1% de probabilidade, e as concentrações submetidas à análise de regressão.

Sete dias após o término das avaliações do crescimento micelial, os escleródios produzidos em cada placa foram recolhidos e computou-se o número de escleródios formados e massa total por parcela. Em seguida, procedeu-se a desinfecção superficial dos escleródios com água estéril e uma solução de hipoclorito à concentração de 1%. Os escleródios foram mergulhados por 30 segundos na solução e 30 segundos em água estéril, repetindo-se o processo por três vezes. Após esse procedimento os escleródios foram incubados em caixas gerbox contendo meio ágar-água, e mantidos à temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, por um período de 60 dias, para verificar o poder germinativo. Foram considerados escleródios germinados aqueles que apresentaram formação de estipes e apotécios. O delineamento experimental utilizado para a produção de escleródios foi inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SANEST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância revelaram interação significativa entre os fatores fungicidas x doses, sendo observado que o efeito dos fungicidas sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* foi dependente das doses utilizadas.

Nota-se na Figura 1 que o fungicida cloreto de benzalcônio promoveu uma redução linear sobre a taxa de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, verificando-se maior atividade antifúngica nas maiores concentrações, entretanto até a maior dose utilizada $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o fungicida não foi capaz de anular o crescimento micelial do patógeno (Figura 1). Possivelmente, com doses superiores às avaliadas neste estudo o fungicida cloreto de benzalcônio poderia apresentar melhores resultados, conforme relatado por Garcia et al. (2010), que verificaram uma diminuição no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* utilizando $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungicida.

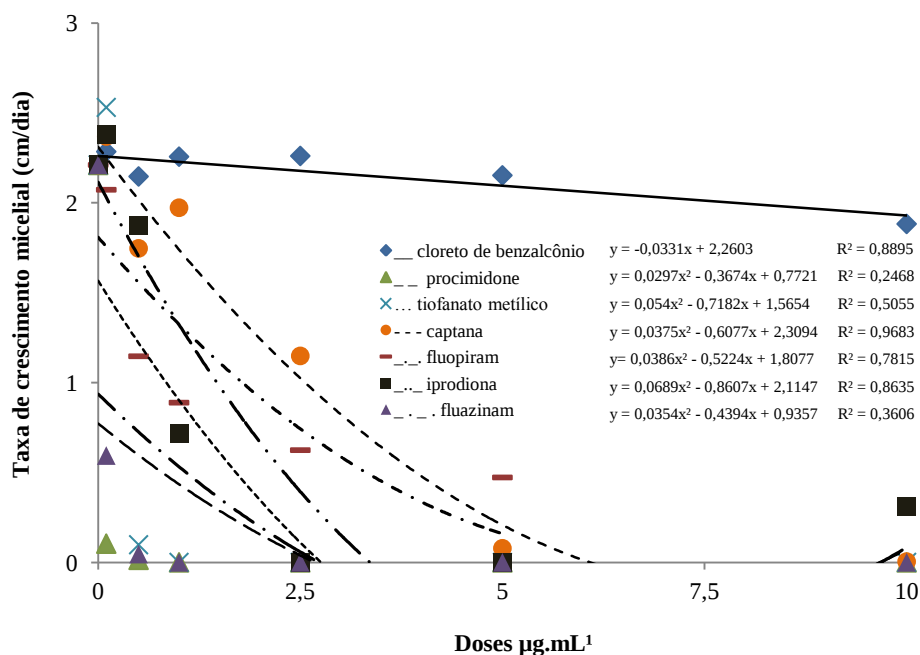


Figura 1. Taxa de crescimento micelial (cm/dia) *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de fungicidas em diferentes doses. Dourados, MS, 2011.

Os fungicidas procimidone e fluazinam se destacaram a partir da concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando uma elevada redução na taxa de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Garcia et al. (2010) obtiveram respostas semelhantes com a

mesma concentração para o fungicida fluazinam, já para o fungicida procimidone a melhor resposta foi com a concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Constatou-se com a utilização de doses superiores a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os fungicidas procimidone e fluazinam, a total supressão do crescimento micelial do patógeno. Ferreira et al. (2009) também relataram o bom desempenho dos fungicidas procimidone e fluazinam em reduzir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com concentrações de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente.

O efeito na taxa de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* submetido ao meio de cultura com adição do fungicida captana foi mais expressivo a partir da dose $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo observado na maior dose crescimento quase nulo do patógeno.

O fungicida fluopiram apresentou respostas satisfatórias sobre a redução da taxa de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, notando-se um efeito dose dependente, ou seja, menor taxa de crescimento micelial nas maiores doses testadas (Figura 1). Ferreira et al. (2009) observaram completa inibição do desenvolvimento vegetativo de *S. sclerotiorum* in vitro com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de fluopiram.

Os fungicidas iprodiona e tiofanato metílico tiveram comportamento semelhante na redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com o uso de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Quadro 1), igualando-se ao efeito de procimidone e fluazinam. A partir da concentração $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ os fungicidas iprodiona e tiofanato metílico inibiram totalmente o crescimento micelial. Ferreira et al. (2009) concluíram que a dose de 10 mg.L^{-1} de tiofanato metílico foi mais eficiente em inibir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* in vitro. Figueiredo et al. (2010) relataram a eficiência do tiofanato metílico na inibição do crescimento micelial de quatro isolados de *S. sclerotiorum* na concentração de 1 ppm.

No Quadro 1 são apresentados os resultados do desdobramento para os fungicidas, dentro de cada concentração utilizada, para a taxa de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Foi observado maior crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, em todas as concentrações testadas, quando submetido ao tratamento com cloreto de benzalcônio, evidenciando o menor potencial deste fungicida no controle do fitopatógeno.

Quadro 1. Média da taxa de crescimento micelial (cm/dia) de *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de fungicidas em diferentes doses. Dourados, MS, 2011.

Fungicidas	Doses					
	0,1	0,5	1	2,5	5	10
Captana	2,37 AB	1,75 A	1,97 A	1,15 B	0,078 BC	0,004 B
Cloreto de Benzalcônio	2,28 AB	2,15 A	2,26 A	2,26 A	2,15 A	1,88 A
Fluazinam	0,59 C	0,05 C	0 D	0 D	0 C	0,00 B
Fluopiram	2,07 B	1,15 B	0,89 B	0,62 C	0,47 B	0,39 B
Iprodiona	2,38 AB	1,87 A	0,72 D	0 D	0 C	0,00 B
Procimidona	0,10 D	0,014 C	0 D	0 D	0 C	0,00 B
Tiofanato Metílico	2,53 A	0,098 C	0,014 D	0 D	0 C	0,00 B
CV%	0,41					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Sclerotinia sclerotiorum foi sensível a todos os fungicidas utilizados a partir da concentração 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, exceto para cloreto de benzalcônio, no entanto, reduções significativas sobre o diâmetro da colônia fúngica foram constatadas apenas quando se empregou as maiores concentrações. A taxa de crescimento micelial na testemunha foi de 2,21 cm.dia^{-1} .

Nota-se, no Quadro 1, o efeito fungicida de fluazinam e procimidona na concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que em concentração maior, de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o mesmo efeito pode ser observado para os fungicidas iprodiona e tiofanato metílico. Estes fungicidas foram considerados altamente eficientes, pois limitaram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* mesmo nas menores concentrações.

Analisando o efeito das diferentes concentrações dos fungicidas em relação à porcentagem de inibição de *S. sclerotiorum* (Figura 2), foram considerados altamente eficientes os fungicidas que inibiram acima de 50% o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, foram estes, fluazinam e procimidona em 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tiofanato metílico em 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, fluopiram e iprodiona em 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e captana em 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os fungicidas proporcionaram, a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, altas porcentagens de inibição sobre *S. sclerotiorum*, exceto o fungicida cloreto de benzalcônio. Observa-se incremento na porcentagem de inibição até a maior concentração com a utilização do fungicida captana. Verificaram-se altas inibições, 50,41, 96,71 e 99,97%, sobre o crescimento do fungo, na presença das concentrações de 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O mesmo pode ser observado para o fungicida fluopiram, que proporcionou alta porcentagem de inibição, 60,91%, a partir da

concentração $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Embora seja relatada alta atividade antifúngica destes fungicidas, as maiores porcentagens de inibição foram constatadas com o fungicida procimidone e fluazinam, que alcançaram 100% de inibição nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, evidenciando desta forma, maior atividade antifúngica destes fungicidas.

O fungicida procimidone inibiu em 95% o desenvolvimento do fungo já na menor concentração ($0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$), sendo responsável pela total inibição da germinação miceliogênica a partir $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Garcia et al. (2012), avaliando atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais sobre *S. sclerotiorum*, observaram inibição no crescimento micelial do fungo em 63% com o uso do óleo de Karanja e 43% com o extrato vegetal de pimenta longa, entretanto o uso do fungicida procimidone na dose de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu 100% do crescimento micelial.

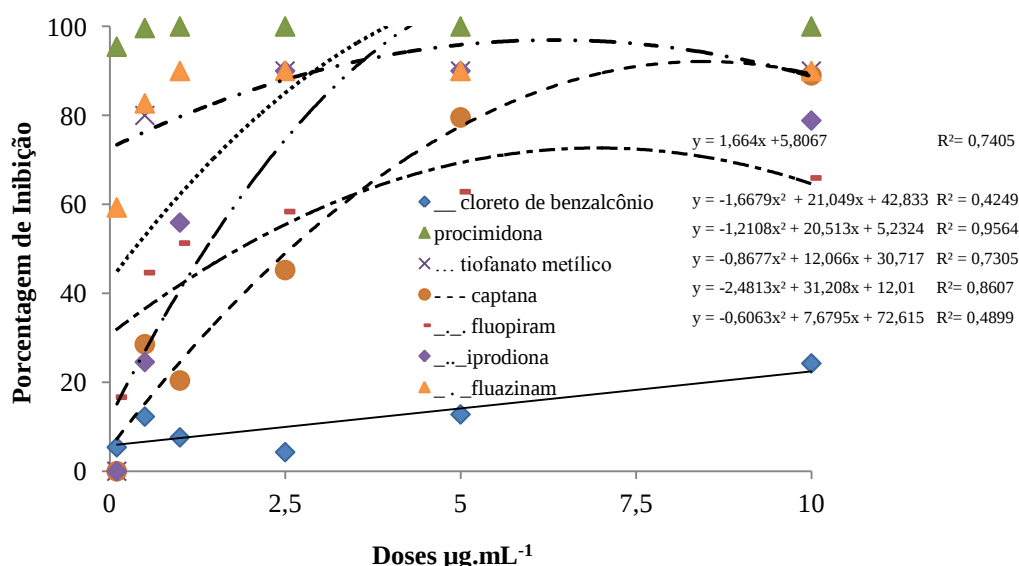


Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* submetido a fungicidas em diferentes doses. Dourados, MS, 2011.

O fungicida fluazinam também merece destaque, pois proporcionou alta porcentagem de inibição (73,4%) na dose de $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, enquanto os fungicidas captana, iprodiona e tianato metílico não afetaram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* na mesma dose. (Quadro 2). Resultados semelhantes foram relatados por Matheron e Porchas (2004), os autores observaram redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* de 78% utilizando $0,01 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de fluazinam e a completa inibição do crescimento micelial com $1,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ do ingrediente ativo. Zancan et al. (2012)

verificaram 100% de inibição do crescimento micelial de dois isolados de *S. sclerotiorum* na presença dos fungicidas procimidone e fluazinam com concentração de 5 ppm.

Quadro 2. Média da porcentagem de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de fungicidas em diferentes doses. Dourados, MS, 2012.

Fungicidas	Doses (µg.ml ⁻¹)											
	0,1		0,5		1		2,5		5		10	
Cloreto de Benzalcônio	0,88	CD	4,53	D	1,76	C	0,56	C	4,89	C	16,87	C
Procimidona	95,56	A	99,66	A	100	A	100	A	100	A	100	A
Tiofanato metílico	0	D	96,98	A	99,88	A	100	A	100	A	100	A
Captana	0	D	22,84	C	12,15	C	50,41	B	96,71	A	99,97	A
Fluopiram	8,21	C	49,41	B	60,91	B	72,52	B	79,17	B	83,38	B
Iprodiona	0	D	17,28	CD	68,59	B	100	A	100	A	100	A
Fluazinam	73,96	B	98,39	A	100	A	100	A	100	A	100	A
CV%	14,84											

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Com o uso do fungicida tiofanato metílico na dose $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, constatou-se alta inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, chegando a 100% de inibição do crescimento micelial com o aumento das doses. Estes resultados discordam dos apresentados por Zancan et al. (2012) que relataram o bom desempenho do fungicida em inibir o crescimento micelial de dois isolados de *S. sclerotiorum*, entretanto não observaram a inibição completa do fitopatógeno mesmo na concentração de 500 ppm de tiofanato metílico. Costa e Costa (2004) observaram 75 % de redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* após 15 dias de incubação em meio contendo tiofanato metílico.

Mueller et al. (2002) verificaram a inibição do crescimento in vitro de *S. sclerotiorum* com uso de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de tiofanato metílico, os autores destacam a importância dos testes in vitro para se identificar potenciais ingredientes ativos no controle do patógeno, mas ressaltam o fato que pode haver sensibilidade ao fungicida dependendo do isolado de *S. sclerotiorum*. Neste mesmo estudo a variação na sensibilidade para tiofanato metílico foi observada em 91 isolados indicando que existe um potencial de resistência a fungicidas em *S. sclerotiorum*.

Conforme relatado anteriormente, o fungicida cloreto de benzalcônio não obteve boas respostas quanto a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, que chegou a apenas 16% (Quadro 2).

Analisando o efeito dos fungicidas sobre a produção e peso de escleródios observou-se diferença significativa entre os tratamentos. A melhor resposta obtida com o fungicida procimidone, ocorreu na concentração $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou uma média de produção de apenas 2 escleródios, inibindo por completo a produção de escleródios a partir da concentração $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado esperado já que o fungicida inibiu em 100% o crescimento micelial do fitopatógeno (Quadro 3).

Quadro 3. Médias do número de escleródios, massa total (g) e massa por escleródios (mg) formados por *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro, sob influência de fungicidas em diferentes doses.

Número de Escleródios						
Fungicidas	Doses µg.mL ⁻¹					
	0,1	0,5	1	2,5	5,0	10,0
Captana	26,2 B	24,8 B	22,8 A	21,8 A	0,8 B	1 B
Cloreto de benzalcônio	25 A	24 B	29,4 A	29,4 A	29,6 A	24,6 A
Fluazinam	14,4 B	1,8 C	0 B	0,2 B	1 B	0,6 B
Fluopiram	24 A	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B
Iprodiona	28,8 A	39,2 A	3,4 B	0 B	0 B	0 B
Procimidone	2 C	1,2 C	0 B	0 B	0 B	0 B
Tiofanato Metílico	25,4 A	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B
CV%	9,12					
Massa de Escleródios (gramas)						
Fungicidas	Doses µg.mL ⁻¹					
	0,1	0,5	1	2,5	5,0	10,0
Captana	0,142 B	0,139 A	0,140 A	0,117 A	0,003 B	0,006 B
Cloreto de benzalcônio	0,147 A	0,138 A	0,144 A	0,132 A	0,129 A	0,122 A
Fluazinam	0,086 B	0,014 B	0 B	0,002 B	0,007 B	0,006 B
Fluopiram	0,136 A	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B
Iprodiona	0,150 A	0,135 A	0,018 B	0 B	0 B	0 B
Procimidone	0,022 C	0,01 B	0 B	0 B	0 B	0 B
Tiofanato Metílico	0,152 A	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B
CV%	0,036					
Massa/ Escleródios (mg)						
Fungicidas	Doses µg.mL ⁻¹					
	0,1	0,5	1	2,5	5,0	10,0
Captana	5,44 B	5,61 AB	6,19 A	5,25 A	2,98 AB	5,90 A
Cloreto de benzalcônio	5,93 B	5,79 AB	4,92 AB	4,65 AB	4,41 A	4,99 A
Fluazinam	4,86 B	8,31 A	0 C	1,72 BC	5,91 A	6,00 A
Fluopiram	5,70 B	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B
Iprodiona	5,20 B	3,48 B	0,018 B	0 C	0 C	0 C
Procimidone	12,14 A	5,26 AB	0 C	0 C	0 B	0 B
Tiofanato Metílico	6,09 B	0 C	0 C	0 C	0 B	0 B
CV%	3,37					

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Zancan et al. (2012) também observaram reduções na produção de escleródios de *S. sclerotiorum* quando da utilização do fungicida procimidone, entretanto relatam que somente a concentração de 500 ppm do fungicida afetou por completo a produção das estruturas de resistência.

Destacaram-se também os fungicidas tiofanato metílico e fluopiram que obtiveram 100% de eficiência em inibir a produção de escleródios, a partir da concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Bowen et al. (2000) relataram o efeito inibitório no crescimento micelial e na germinação de escleródios de *S. minor* com o uso de tiofanato metílico a partir da dose de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ingrediente ativo. Dentre diversos fungicidas testados em experimento a campo em área infestada por *S. sclerotiorum*, a produção de escleródios foi significativamente inferior no tratamento com fluopiram (HENNING et al. 2009).

Borelli et al. (2012) relataram o bom desempenho na inibição da formação de escleródios dos fungicidas fluazinam, procimidone e tiofanato metílico com concentrações variando de 0,1 a 10 ppm.

O uso do fungicida captana inibiu quase por completo a produção de escleródios in vitro, não diferindo estatisticamente dos fungicidas fluazinam, fluopiram, iprodiona e procimidone a partir da concentração $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Quadro 3).

Mueller et al. (2002) comprovaram controle superior a 98% na redução de escleródios formados a partir de sementes, em 2 anos de estudo, pelo uso de captan + pentachloronitrobenzene + thiabendazole. Considerando que 2% de sementes infectadas, em um hectare, representam mais de 6.000 potenciais pontos de infecção em uma população de $300.000 \text{ plantas.ha}^{-1}$, o risco de infestação é alto. Nelson (1998) afirma que 0,5 escleródios por 800 cm^3 podem resultar em uma significativa incidência de doença em um ciclo da cultura.

Com relação aos escleródios formados em cada tratamento, ocorreram duas situações distintas entre os fungicidas utilizados, na primeira, houve formação de escleródios no tratamento, no entanto, foi verificada a inviabilidade do escleródio, já que após 60 dias de incubação, estes não haviam germinado. Em outra situação não houve produção de escleródios (Quadro 4).

Quadro 4. Médias da porcentagem de germinação de escleródios produzidos sob influência de fungicidas em diferentes doses.

% de germinação de escleródios						
Fungicidas	Doses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	0,1	0,5	1	2,5	5	10
Captana	61,4	67,09	49,6	78,81	0	0
Cloreto de Benzalcônio	11,75	32,83	34,6	41,45	41,47	21,44
Fluazinam	40,04	0	*	0	37,5	66,67
Fluopiram	74,08	*	*	*	*	*
Iprodiona	19,71	0	16,66	*	*	*
Procimidona	30	0	*	*	*	*
Tiofanato Metílico	6,15	*	*	*	*	*

Apotécios por escleródios						
Fungicidas	Doses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	0,1	0,5	1	2,5	5	10
Captana	0,37	0,63	0,44	0,64	*	*
Cloreto de benzalcônio	0,16	0,34	0	0,48	0,43	0,6
Fluazinam	0,13	*	*	*	0,4	0,4
Fluopiram	0,35	*	*	*	*	*
Iprodiona	0,12	*	0,35	*	*	*
Procimidona	0	*	*	*	*	*
Tiofanato Metílico	0	*	*	*	*	*

* não houve produção de escleródios

Pode-se observar na concentração $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ que houve germinação dos escleródios formados em todos os fungicidas. As maiores porcentagens de germinação ocorreram para os escleródios formados na presença dos fungicidas fluopiram (74,08%), captana (61,4%), fluazinam (40,04%) e procimidona (30%). Os escleródios produzidos na testemunha, sem fungicida, apresentaram porcentagem média de germinação de 3,48%. Nota-se que baixas concentrações dos fungicidas influenciaram a germinação dos escleródios.

S. sclerotiorum foi capaz de produzir escleródios em todas as concentrações testadas em meio contendo o fungicida captana (Quadro 3), entretanto os escleródios produzidos nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não germinaram (Quadro 4).

Escleródios produzidos em meio com cloreto de benzalcônio em todas as doses utilizadas foram capazes de germinar e formar apotécios.

Os fungicidas tiofanato metílico e fluopiram apresentaram os melhores resultados, já que *S. sclerotiorum* não foi capaz de produzir escleródios na presença dos dois fungicidas a partir da concentração $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta mesma concentração, o fungo produziu escleródios em meio contendo procimidona, mas estes não germinaram, a partir da dose $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o fungicida inibiu a produção de escleródios por *S. sclerotiorum*.

Escleródios produzidos em meio com os fungicidas procimidona e tiofanato metílico na concentração $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, germinaram, mas não houve formação de apotécios, ficando os escleródios limitados à emissão de estipes (Quadro 4).

Os resultados obtidos sobre a germinação de escleródios, não são conclusivos, já que a testemunha ao longo do período de avaliação também apresentou baixa porcentagem de germinação, fatores como luminosidade durante este período e oscilações na temperatura podem influenciar a germinação dos escleródios.

O uso de fungicidas tem sido o método mais usado no controle de doenças causadas por *S. sclerotiorum* devido à falta de resistência genética em suas hospedeiras (BARDIN e HUANG, 2001). O efeito de fungicidas sobre a produção de escleródios de *S. sclerotiorum* é um fator importante a ser analisado, já que as epidemias ocasionadas pelo fungo iniciam, na maioria das vezes, com a liberação dos ascósporos por apotécios, os quais são produzidos através da germinação carpogênica de escleródios do patógeno (BOLAND e HALL, 1987).

CONCLUSÕES

Os fungicidas procimidona e fluazinam apresentaram maior eficácia no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, por proporcionarem total inibição sobre o crescimento micelial, além de anularem a produção de escleródios do fitopatógeno a partir da concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Iprodiona, tiofanato metílico, captana e fluopiram também inibiram por completo o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em doses superiores a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cloreto de benzalcônio inibiu em apenas 16% a germinação miceliogênica do fitopatógeno na maior dose estudada, não afetando a produção de escleródios in vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2012.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88-98, 2001.
- BENICIO, V.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F. M.; BENICIO, M. J.; FELISMINO, D.C. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.180-183, 2003.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of white mold bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.9, p.218-224, 1987.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BORELLI, J. A.; BROMEL, L. G.; FURLAN, S. H. Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial e a produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM. **Tropical Plant Pathology**, v. 38 (Suplemento), 2012.
- BOWEN, C.; MELOUK, H. A.; JACKSON, K. E.; PAYTON, M. E. Effect of a select group of seed protectant fungicides on growth of *Sclerotinia minor* in vitro and its recovery from infested peanut seed. **Plant Disease**, v.84, n. 11, p. 1217-1220, 2000.
- CARMONA, M.; ZWEEGMAN, J.; REIS, E.M. Detection and transmission of *Drechslera avenae* from oat seed. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 3, p. 319-321, 2004.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- COSTA G. R.; COSTA J. L. S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n.3, p. 133-138, 2004.
- DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 75-112.
- FERREIRA, L. C.; MEYER, M. C.; TERAMOTO, A. Efeito de fungicidas na inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* isolado de soja. In: **IV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, Londrina, v.1, p. 107-110, 2009. (Documento 312).

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

FURLAN, S. H. Importância e manejo do mofo-branco na cultura da soja. **Revista Plantio Direto**, edição 107, p. 28-31, 2008.

GARCIA R. Á.; JULIATTI F. C.; BARBOSA K. A. G.; CASSEMIRO T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, Jan./Feb. 2012.

GARCIA, R. A.; SANTOS, R. C.; LOBO JÚNIOR, M.; MEYER, M. C.; OLIVEIRA, R. M.; CUNHA, M. G. Sensibilidade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* à fungicidas. In: XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2010, Brasília. Anais da XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Londrina - PR: Embrapa Soja, 2010. v. 1. p. 213-214.

HENNING, A. A.; PAULA, F. Y. H. DE; MOMTEMEZZO, C. A. O.; BOSSE, E. J.; BERGONSI, J. S. S. Avaliação de princípios ativos para o controle químico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja – safra 2008/2009. **Informativo ABRATES**, v.19, n.1, p.29-31, 2009.

LEITE, R. M. V. B. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, (**Comunicado Técnico, 76**) p.1-3. 2005.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

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

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D. Projeto em rede para avaliar a eficiência de produtos químicos no manejo do mofo branco em soja. In: **XI Simpósio Brasileiro de Patologias de Sementes**, Informativo **ABRATES**, v. 21, n. 3, 2011.

MUELLER, D. S.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, v. 86, n. 1, p. 26-31, Jan. 2002.

NELSON, B. Biology of *Sclerotinia*. In: **Proceedings of the sclerotinia workshop**. 1998.

PAULA JUNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO, J. E. S. **Manejo do mofo-branco do feijoeiro**. Epamig, mar. 2008, 4 p. (Circular Técnica, 13).
SOMDA, I.; SANOU, J.; SANON, P. Seed-Borne Infectin of Farmer-Saved Maize Seeds by Pathogenic Fungi and Therir Transmission to Seedlings. **Plant Pathology Journal**. v. 7, n. 1, p. 98-103, 2008.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.

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

TORRES, J. P.; JÚNIOR, T. A. F. da S. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* in common bean seeds from the state of Paraná (Brazil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, 2009.

TU, C. The role of mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1998.

USDA. United States Department of Agriculture. Reports, 2012. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br>> Acesso em: 15 jan. 2013.

YORINORI, J. J.; FEKSA, H. Importância da podridão da soja (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: Reunião de Pesquisa da Soja Região Central do Brasil, 2001, Londrina. **Resumo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2001. p.119. (Documentos 157).

ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV- DFP, 2005. 502 p.

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