

**USO DE RESTRITORES HÍDRICOS NA
DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM
SEMENTES DE FEIJÃO, SOJA E ALGODÃO
PELO MÉTODO DE INCUBAÇÃO EM MEIO
ÁGAR-AZUL DE BROMOFENOL (NEON)**

VIVIAN HIKARI KAWASAKI

2010

VIVIAN HIKARI KAWASAKI

**USO DE RESTRITORES HÍDRICOS NA
DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum*
EM SEMENTES DE FEIJÃO, SOJA E ALGODÃO
PELO MÉTODO DE INCUBAÇÃO EM MEIO
ÁGAR-AZUL DE BROMOFENOL (NEON)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Kawasaki, Vivian Hikari.

Uso de restritores hídricos na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão pelo método de incubação em meio Agar-Azul de bromofenol (Neon) / Vivian Hikari Kawasaki. – Lavras : UFLA, 2010.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Patologia. 2. Teste de sanidade. 3. Mofo branco. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

VIVIAN HIKARI KAWASAKI

USO DE RESTRITORES HÍDRICOS NA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE FEIJÃO, SOJA E ALGODÃO PELO MÉTODO DE INCUBAÇÃO EM MEIO ÁGAR-AZUL DE BROMOFENOL (NEON).

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010

Profa. Maria das Graças Guimarães Carvalho

UFLA

Prof. Mário Sobral de Abreu

UFLA

Prof. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de cumprir mais uma etapa.

À Universidade Federal de Lavras, por todo o aprendizado adquirido durante o mestrado.

Ao CNPq, por ter possibilitado e financiado este trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. José da Cruz Machado, pelos conhecimentos transmitidos e pela experiência demonstrada.

Aos professores Maria das Graças Guimarães Carvalho e Mário Sobral de Abreu, pela participação na banca de avaliação e pelas valiosas contribuições.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, por todos esses anos de trabalho em equipe, união e companheirismo admiráveis.

Aos colegas e professores do Departamento de Fitopatologia, que contribuíram para esse título.

Aos meus pais, Celso e Elisa, e meus irmãos, Raphael e Érica, pelo amor e dedicação recebida, me motivando sempre e acreditando no meu sucesso desde o início.

Aos meus familiares que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Marcelo La Selva, pelo constante apoio, incentivo, paciência e companheirismo sempre que preciso.

À minha turma de Ciências Biológicas que, apesar da distância, está sempre muito presente em minha vida, em especial a Joyce e a Fernanda, que foram indispensáveis nesta etapa.

E a todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Importância econômica das culturas do feijão, soja e algodão no Brasil.....	4
2.2 Importância do mofo branco nas culturas do feijão, algodão e soja	5
2.3 Sintomas e aspectos epidemiológicos do mofo branco.....	6
2.4 Métodos de controle da doença.....	9
2.5 Testes de sanidade para detecção do patógeno em sementes.....	12
2.6 O uso da restrição hídrica na detecção do patógeno em sementes.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Ensaio 1 - Avaliação do crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em substrato ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos	17
3.1.1 Origem e obtenção dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
3.1.2 Preparo dos meios de cultura	18
3.2 Ensaio 2 - Avaliação dos efeitos da restrição hídrica na protrusão radicular de sementes de feijão, soja e algodão	21
3.3 Ensaio 3 - Avaliação da eficácia do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja	21
3.4 Ensaio 4 - Avaliação dos efeitos do regime de luz na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijão, soja e algodão, por meio do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos.....	24
3.5 Ensaio 5 - Avaliação da metodologia de detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja e feijão naturalmente infectadas, pelo método ágar-bromofenol com modificações	24
3.6 Ensaio 6 - Avaliação do comportamento de fungos comumente associados às sementes de feijão, soja e algodão em meio ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Ensaio 1 - Comportamento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em substrato ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos.....	27
4.2 Ensaio 2 - Efeitos da restrição hídrica na protrusão radicular de sementes de feijão, soja e algodão	32
4.3 Ensaio 3 - Efeitos dos substratos do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijão e soja	35

4.4 Ensaio 4 - Efeitos do regime de luz na detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em sementes de feijão, soja e algodão, por meio do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos.....	37
4.5 Ensaio 5 - Comparação da metodologia de detecção de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja e feijão naturalmente infectadas, pelo método ágar-bromofenol com modificações	40
4.6 Ensaio 6 - Comportamento de fungos comumente associados às sementes de feijão, soja e algodão em meio ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos	41
5 CONCLUSÕES	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

KAWASAKI, Vivian Hikari. **Uso de restritores hídricos na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão pelo método de incubação em meio ágar-azul de bromofenol (Neon)**. 2010. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A importância das culturas como feijão, soja e algodão é indiscutível devido à participação expressiva das mesmas no contexto sócio-econômico do Brasil. Dentre os agentes fitopatogênicos que causam danos severos a estas culturas encontra-se *Sclerotinia sclerotiorum*. A doença em questão, conhecida como mofo branco ou podridão-de-sclerotínia, pode ser disseminada por sementes e pelos escleródios presentes nos lotes, sendo esta uma das formas mais eficazes de disseminação a longas distâncias. Esses escleródios são estruturas de resistência do fungo que podem ficar viáveis no solo por mais de cinco anos. A diagnose precisa e preventiva do patógeno em sementes na fase pré-plantio e o uso de sementes sadias têm sido algumas das principais medidas de controle da referida doença, sendo, portanto de grande relevância a aplicação de testes de sanidade visando à detecção segura do patógeno em amostras de sementes. Em relação aos atuais métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de espécies hospedeiras, percebe-se que há ainda alguns questionamentos, principalmente no que concerne ao uso de inibidores de germinação de sementes, no caso o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, bem como o regime de luz durante a incubação das sementes pelo método de Neon. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de aperfeiçoar a metodologia de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão por meio da utilização de restritores hídricos, em substituição ao uso de 2,4-D, em meio agarizado contendo azul de bromofenol e antibióticos (Neon) e definir o regime de luz ideal por esse método. Na primeira etapa foram avaliados os efeitos dos restritores hídricos manitol, cloreto de sódio e polietilenoglicol (PEG), em diferentes potenciais osmóticos, no crescimento micelial dos isolados do fungo e na protrusão das radículas das sementes das espécies em estudo. Observou-se que o emprego de restritores hídricos com potenciais osmóticos acima de -0,5MPa para PEG e acima de -1,0MPa para manitol e cloreto de sódio não interferiu negativamente no crescimento micelial dos isolados testados e, ao mesmo tempo, proporcionou inibição satisfatória da protrusão radicular das sementes de feijão, soja e algodão. Com base nos resultados obtidos, foi conduzida a segunda etapa do trabalho, na qual foram testados os substratos de papel de filtro e meio sólido agarizado e os regimes de alternância de luz e escuro contínuo pelo método Neon modificado, na detecção do referido fungo nas sementes das espécies em estudo. A metodologia de detecção semisseletiva de *S. sclerotiorum* com substrato composto de BDA, azul de bromofenol (100ppm), cloranfenicol (50ppm) e o restritor hídrico manitol (-1,0MPa), sob temperatura de 20°C e incubação na ausência de luz, revelou-se eficaz para a detecção do referido patógeno em análises de rotina de laboratório.

* Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador), Maria das Graças Guimarães Carvalho – UFLA e Mário Sobral de Abreu - UFLA.

ABSTRACT

KAWASAKI, Vivian Hikari. **Use of water restriction in the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean, soybeans and cotton seeds by the method of incubation in agar-bromophenol blue (Neon)**. 2010. 57p. Dissertation (Master in Phytopathology)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The importance of crops such as beans, soybeans and cotton is unquestionable due to the significant participation of those in the socio-economic development of Brazil. Among the pathogenic agents causing severe damage in those host species, *Sclerotinia sclerotiorum* is one the most aggressive. The disease, caused by that fungus, known as “white mold” or “Sclerotinia rot”, can be spread by seeds, and by sclerotia which come mixed in commercial lots. These structures are the most effective ways of dissemination of the disease to long distances. Sclerotia are structures of resistance of the fungus that can be viable for over 5 years in soil. The accurate and preventive diagnosis of the pathogen in seeds in the pre-planting and use of healthy seeds before sowing and use of healthy seeds have been some of the main measures to control the disease and are therefore of great importance to control of such disease. In relation to current methods for detection of *S. sclerotiorum* in seeds of host species, there are some questions, mainly concerning the use of seed germination inhibitors, like 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and the schemes of light during the incubation of seeds by the method of agar-bromophenol (Neon). Therefore, the objective of this study was to improve the methodology for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean, soybean and cotton seeds through the use of water restrictors, in the place of 2,4-D, in agar medium containing bromophenol blue and antibiotics (Neon). In the first step, the effects of water restrictors mannitol, sodium chloride and polyethylene glycol (PEG) at different osmotic potentials were evaluated on the mycelial growth of four *Sclerotinia* isolates and on the radicle protrusion of seeds of the species under investigation. It was observed that the use of water restrictors at osmotic potentials up to -0.5MPa for PEG and -1.0MPa for mannitol and sodium chloride caused no negative effect on mycelial growth of the isolates tested, and the proved to be satisfactory to inhibit radicle protrusion of beans, soybeans and cotton seeds. Based on the preliminary results, the work focused on comparisons between light regimes and substrates in the detection of *S.sclerotiorum* in seeds of the three crops. The methodology of semi-selective substrate: solid PDA, bromophenol blue (100 ppm), chloramphenicol (50 ppm) and water restrictor mannitol (-1.0MPa) at a temperature of 20°C with incubation in continuous dark was proved to be effective in the detection of that pathogen in routine seeds analysis.

* Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Major professor), Maria das Graças Guimarães Carvalho – UFLA and Mário Sobral de Abreu - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A importância das culturas do feijão, soja e algodão para a agricultura brasileira é indiscutível, devido à participação expressiva das mesmas no contexto sócio-econômico do país. Além disso, os índices de produção dessas culturas fazem do Brasil um dos países mais destacados no cenário agrícola internacional.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro, sendo rico em fonte proteica e em outros elementos essenciais a saúde humana. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), considerada uma das mais importantes culturas oleaginosas, importante fonte de proteína na alimentação humana e animal, representa uma parcela das mais significativas na pauta de exportação do Brasil. Por sua vez, o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é de grande utilidade não somente pela fibra que produz, mas também como ingrediente na alimentação animal como fonte de óleo, cuja aplicação é de crescente interesse na indústria de alimentos e matéria-prima potencial para a síntese de biodiesel (Ferreira et al., 2002; Beltrão, 2007; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, 2010).

Atualmente, a produção das três espécies atinge um total de aproximadamente 70 milhões de toneladas por ano, correspondente a quase 46% da produção de grãos no Brasil.

Apesar da grande importância dessas culturas, dentre os principais fatores que limitam o aumento e melhoria da produtividade das mesmas no país, está a ação de algumas doenças, que encontram condições favoráveis em áreas onde essas espécies são cultivadas.

Dentre os agentes fitopatogênicos de grande destaque que vêm causando danos severos às referidas culturas encontra-se *Sclerotinia sclerotiorum*. É um patógeno que causa doenças, comumente denominadas de “mofó branco” ou

“podridão-de-sclerotínia”, que são favorecidas por ambientes com elevada umidade e temperatura na faixa de 15°C a 25°C (Purdy, 1979).

O agente causal em foco é capaz de infectar um grande número de espécies vegetais, sendo relatadas na literatura cerca de 408 espécies hospedeiras. Além disso, produz estruturas de resistência, escleródios, que podem ficar viáveis no solo por mais de cinco anos. Como consequência, essa doença tem sido responsável por perdas quase sempre irreversíveis, a curto e a médio prazo, podendo haver abandonos de áreas por longos períodos. A produção de escleródios em quantidades elevadas tem sido uma das formas mais eficazes de disseminação pelo uso de sementes contaminadas com estas estruturas (Machado, 1988; Napoleão, 2001).

Na região centro-oeste brasileira, o mofo branco tem causado perdas de até 70% na produção de feijão (Peres, 1996). Em cultivos extensivos de soja e algodão, em regiões com temperaturas amenas e altas umidades atmosféricas, as perdas atuais já atingem níveis intoleráveis em grande área de cultivo agrícola em todo o país. Devido ao fato de as sementes exercerem importante papel na disseminação das doenças causadas por *S. sclerotiorum*, o uso de sementes certificadas e de procedência conhecida torna-se, portanto, fundamental, do ponto de vista de prevenção da doença por esta via. Para tal, a diagnose precisa desse patógeno em lotes de sementes comercializados no país é um procedimento que deve fazer parte dos Programas de Controle e Certificação de qualidade de sementes das espécies que são hospedeiras de tal patógeno no Brasil.

Em relação aos atuais métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de espécies hospedeiras, percebe-se que há ainda alguns questionamentos, principalmente no que concerne ao uso de inibidores de germinação de sementes, no caso 2,4-diclorofenoxiacético, durante a incubação

das sementes pelo método de Neon, além de algumas dúvidas sobre o efeito do regime de luz no período de incubação.

Portanto, um dos objetivos, com a realização deste trabalho, foi investigar uma alternativa ao uso de 2,4-D pelo método semisseletivo agarizado contendo azul de bromofenol e antibióticos, conforme tem sido proposto recentemente na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*. Nesse sentido, o recurso do uso de restritores hídricos como inibidor de germinação das sementes de feijão, soja e algodão foi um dos alvos desta investigação. Como objetivos específicos foram estabelecidos: 1 - avaliar os efeitos dos restritores hídricos: manitol, cloreto de sódio e polietilenoglicol, em diferentes potenciais osmóticos, no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em substrato de ágar-bromofenol (Neon padrão); 2 - determinar os potenciais hídricos dos restritores manitol, cloreto de sódio e polietilenoglicol adequados para inibição de germinação de sementes de feijão, soja e algodão, nas condições do método semisseletivo ágar-bromofenol (Neon) e 3 - aprimorar a metodologia de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão pelo método do Neon modificado com restritores hídricos, aferindo o regime de luz e o tipo de substrato utilizados, para uso em análises de rotina em laboratório.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica das culturas do feijão, soja e algodão no Brasil

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa no Brasil uma posição de destaque, tendo em vista o uso sistemático e tradicional como alimento diário da maioria da população do país. Trata-se de uma cultura que é explorada durante todo o ano, subdividida em três épocas distintas de plantio. Na safra de 2009/10, a produção brasileira desta espécie foi estimada em 3.645,3 mil toneladas, ocupando uma área de 4.084,4 mil hectares (Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB, 2010). É um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, devido, principalmente, à mão-de-obra empregada durante o seu cultivo. Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations, ou FAO (2010), o Brasil foi o maior produtor mundial em 2004, seguido pela Índia e pelos Estados Unidos.

Entre as oleaginosas, o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) merece destaque, dada a sua importância sócio-econômica e em razão de sua riqueza como fonte de óleo e proteínas, co-produtos extraídos de suas sementes, com larga aplicação na indústria de alimentos e matéria-prima potencial para síntese de biodiesel. É a segunda oleaginosa no Brasil, perdendo apenas para a soja. A área cultivada atualmente com esta cultura é de, aproximadamente, 792,4 mil hectares e a produção de caroço de algodão estimada em 1.868,6 mil toneladas na safra de 2009/10 (CONAB, 2010).

Por sua vez, a crescente demanda por proteínas para a alimentação animal e o aumento da procura de óleos vegetais para a alimentação humana são fatores que têm feito da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) um dos produtos nacionais mais exportados. Atualmente, o Brasil situa-se entre os maiores produtores mundiais de soja, ao lado de Estados Unidos e Argentina, que respondem por mais de 80% da produção mundial. Sendo considerada a mais

importante cultura oleaginosa, possui componentes alimentícios dos mais valiosos à humanidade. Foi a soja, ao lado do trigo, a grande responsável pelo surgimento da agricultura comercial no Brasil. Segundo dados do CONAB (2010), a produção de soja na safra de 2009/10 foi estimada em 65.159,0 mil toneladas, ocupando 23.062,6 mil hectares.

2.2 Importância do mofo branco nas culturas do feijão, algodão e soja

Sclerotinia sclerotiorum é um dos mais inespecíficos e agressivos dos fitopatógenos, tendo sido relatado em todos os continentes, sendo provável que ocorra em quase todos os países do mundo (Purdy, 1979). Segundo Boland & Hall (1994), *S. sclerotiorum* já foi relatada em associação com 408 espécies de plantas suscetíveis, pertencente a 278 gêneros e 75 famílias botânicas. Entre essas hospedeiras, encontram-se batata, ervilha, tomate, alface, repolho, hortelã, algodão, feijão, soja, girassol, alfafa, fumo e canola.

De acordo com relatos na literatura, perdas de colheita atribuídas a *S. sclerotiorum* podem atingir 100% (Purdy, 1979). Beversdof & Hume (1981) citaram que, no Canadá, as perdas no feijoeiro variaram de 15% a 60%.

No Brasil, o fungo foi relatado, pela primeira vez, em 1920, na cultura da batata, no estado de São Paulo (Saccá, 1920). Purdy (1979) considerou a doença como sendo uma das mais severas no cultivo de feijão vagem no inverno, chegando a afetar 100% da cultura. Segundo Nasser & Sutton (1993), os mais significantes declínios nos campos de feijão, desde a década de 1980, têm sido causados por este patógeno, especialmente no cerrado em áreas de cultivo irrigado. Cardoso (1994) relatou que as perdas, em 1994, foram, em média, de 50% no rendimento, em São Paulo, Minas Gerais e Goiás, sem considerar a diminuição da qualidade do produto colhido.

Na cultura da soja há relatos de até 18,7% de perdas (Yorinori, 1987). No sudoeste goiano, nas safras de 2004/05 e 2005/06, houve perdas de

rendimento de grãos de até 20%, por causa da ocorrência de condições favoráveis para a doença naquela safra.

Em junho de 1996, em uma área com algodoeiro irrigado sob pivô central, no município de Paracatu, MG, foi observado que 95% das plantas inspecionadas apresentavam sintomas da doença e escleródios escuros irregulares do patógeno no interior de seus capulhos (Charchar et al., 1999).

Percebe-se, portanto, que os danos e os prejuízos causados por *Sclerotinia sclerotiorum* são dos mais agravantes e crescentes e isto se torna uma das maiores preocupações no momento, tendo em vista a natureza dessa doença e a inexistência de material genético com resistência de campo à mesma.

2.3 Sintomas e aspectos epidemiológicos do mofo branco

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao Filo Ascomycetes, do grupo dos Discomycetos, Ordem Helotiales, e Família Sclerotiniaceae (Krugner & Bacchi, 1995; Agrios, 2005). É um fungo polífago, de distribuição mundial, sendo o agente causal da “podridão-de- esclerotinia”, “murcha de esclerotinia” ou “mofo branco” em muitas espécies de plantas cultivadas, conforme já mencionado anteriormente.

A doença inicia-se em reboleiras nas lavouras, especialmente nos locais onde há maior crescimento vegetativo e acamamento das plantas. Os sintomas são visíveis nos ramos e hastes, começando com a formação de manchas encharcadas, de coloração parda e consistência mole, seguida por crescimento micelial branco e cotonoso, característico do mofo branco. Normalmente, as lesões ocorrem a uns 10 a 20 cm acima da superfície do solo, onde as flores ficam aderidas e progridem para cima e para baixo no caule (Tu, 1985). A maioria das infecções ocorre no início da floração ou depois da polinização das flores, uma vez que o caule e os galhos são invadidos pelo fungo, ocorrendo murcha e morte da planta. Os tecidos doentes tornam-se secos, leves e

quebradiços. As sementes podem ser infectadas, apresentando-se, geralmente, descoloridas, enrugadas e menores que as normais. Algumas sementes, embora com aparência sadia, também podem estar infectadas (Steadman, 1983).

O conhecimento das características e as condições ambientais que podem favorecer o processo de infecção por este patógeno vêm se tornando um fator importante para o manejo da doença (Vale et al., 2004).

O ciclo básico de *S. sclerotiorum* inicia-se com a fase de sobrevivência que decorre da produção de escleródios, massas compactas de tecido do fungo, que, além de serem fontes de inóculo, asseguram a presença do patógeno por períodos prolongados no solo sob condições adversas (Cook et al., 1975; Adams & Aiers, 1979). Aproximadamente 90% do ciclo de vida de *Sclerotinia* spp. ocorre no solo como escleródio (Adams & Aiers, 1979). Segundo Davis (1925), os escleródios de *S. sclerotiorum* próximos à superfície do solo não permanecem viáveis por mais de um ano. Young & Morris (1927), no entanto, relataram que pelo menos quatro anos foram necessários para que a cultura do girassol pudesse desenvolver-se em um campo com histórico de mofo branco.

Na cultura do feijoeiro, Starr et al. (1953) estimaram um período de pelo menos, três a cinco anos de sobrevivência deste fungo no solo. Brown & Butler (1936) relataram que, sob condições secas favoráveis, os escleródios podem permanecer viáveis por, pelo menos, dez anos. Fatores como temperatura do solo, pH e umidade parecem ter pequeno efeito direto na sobrevivência desses escleródios, no entanto, um fator determinante parece ser as atividades de outros microorganismos junto a essas estruturas (Adams & Aiers, 1979).

Em determinadas épocas do ano, dependendo da natureza inerente do fungo e dos fatores ambientais, os escleródios podem germinar na forma miceliogênica ou carpogênica (Adams & Aiers, 1979).

Na germinação carpogênica, os escleródios atingem o solo e, sob determinadas condições, podem germinar, dando origem a um ou mais

apotécios. A partir dessas frutificações são formados milhares de ascósporos, que são facilmente disseminados. Esses esporos são considerados a fonte primária de inóculo e podem sobreviver por mais de sete meses sob baixa umidade e germinam sob potenciais osmóticos baixos (Grogan & Abawi, 1974). Os apotécios, geralmente, formam-se no período de quatro a doze semanas, embora alguns isolados raramente ou nunca chegam a produzi-los (Pratt & Rowe, 1991). A temperatura ótima para a germinação carpogênica dos escleródios foi em torno de 8°C a 16°C, sendo o aumento da germinação diretamente proporcional ao aumento no tamanho dos escleródios (Dillard et al., 1995).

Outras condições além da temperatura, como, por exemplo, o mínimo de 8 horas de luz durante o dia ou o pH do solo entre 6,0-9,7, são também fatores importantes na germinação dos esporos deste fungo (Cook et al., 1975).

De acordo com Ferraz et al. (1996), solos ricos em matéria orgânica e com maior umidade podem proporcionar condições mais apropriadas para formação de apotécios, enquanto solos com menor frequência de irrigação e presença de palhada de gramíneas podem reduzir a sua formação.

Ascósporos que desenvolvem no apotécio são disseminados por correntes aéreas e iniciam a infecção quando entram em contato com o tecido suscetível. Depois de invadir o tecido do hospedeiro por micélio, escleródios são formados. Esses, eventualmente, retornam ao ambiente do solo, sobrevivendo por períodos adversos e à espera de uma próxima cultura suscetível (Purdy, 1979).

Na germinação miceliogênica ocorre a produção de hifas diretamente dos escleródios. Esses, encontrados no solo ou em restos de culturas contaminados, germinam e, inicialmente, suas hifas colonizam matéria orgânica morta e continuam crescendo, formando um micélio vigoroso. Ao encontrar uma planta hospedeira, o micélio coloniza tecidos senescentes ou mortos e depois

invade rapidamente partes sadias, principalmente os tecidos suculentos, fazendo com que as células entrem em colapso (Purdy, 1979; Agrios, 1997).

Na superfície ou dentro dos tecidos infectados são formados os escleródios, inicialmente brancos, passando a negros quando maduros. Estes retornam ao solo completando o ciclo (Steadman, 1983).

Vários trabalhos relatam as condições ideais para que os processos de germinação e infecção por *S. sclerotiorum* ocorram com sucesso. Alguns relatam que a germinação dos ascósporos ocorre na presença de alta umidade relativa e temperatura ótima entre 5°C-10°C, enquanto a temperatura ótima para crescimento micelial está na faixa de 15°C-25°C (Abawi & Grogan, 1975).

2.4 Métodos de controle da doença

Devido à sua importância e às dificuldades do seu controle no campo, várias práticas de manejo da cultura e um programa integrado de medidas são requeridos para a obtenção de sucesso no controle do mofo branco.

Uma das dificuldades decorre da permanência de escleródios viáveis por um longo período de tempo no solo, aliado ao fato de que os ascósporos produzem infecção aérea na disseminação campo-a-campo, devido, inclusive, à falta de controle químico eficaz e à alta suscetibilidade dos hospedeiros cultivados.

Uma estratégia importante no manejo da referida doença é a redução do número de plantas por área de plantio. Essa medida visa uma adequada aeração das plantas e reduzir as chances de contato de plantas doentes com plantas sadias adjacentes (Blad et al., 1978; Scott et al., 2010).

Adubações excessivas de nitrogênio devem ser evitadas, já que isso predispõe os tecidos ao ataque do patógeno. É recomendada também a utilização de araões profundas para que os escleródios e resíduos de micélio de áreas contaminadas não entrem em contato com o hospedeiro e, assim, então, não

encontrando condições favoráveis a sua germinação (Scott et al., 2010). Como não existem cultivares resistentes ao mofo branco até o momento, torna-se necessário evitar genótipos altamente suscetíveis.

A rotação de culturas, a exemplo do que ocorre para um grande número de outras doenças, é fundamental para o manejo do mofo branco. Em áreas nas quais ocorreram epidemias recentes, deve-se evitar o cultivo em sucessão com hospedeiros altamente suscetíveis por, pelo menos, quatro anos. A intercalação com culturas não hospedeiras deste fungo, como gramíneas (milho, aveia branca ou trigo), presta-se para propiciar a degradação natural dos escleródios por meio de seus inimigos naturais (Steadman, 1979; Scott et al., 2010).

Pelo menos trinta espécies de fungos e bactérias, tanto quanto insetos e outros organismos, têm sido relatadas como parasitas ou antagonistas de *Sclerotinia* spp. (Steadman, 1979).

Mais recentemente, tem aumentado o interesse no uso de microrganismos antagonistas de solos como ferramenta no controle biológico do mofo branco. Relatos de literatura dão conta de que diversas espécies de fungos já têm sido utilizadas no combate às doenças causadas por *S. sclerotiorum*. Entre tais espécies, *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma* sp. e outros têm comprovado eficácia no controle da doença em foco (Trutmann et al., 1980; Mcquilken et al., 1997; Hjeljord & Tronsmo, 1998; Gerlagh et al., 1999; Huang et al., 2000).

A eficácia do controle químico de *S. sclerotiorum* pode ser influenciada pela densidade de inóculo no solo entre outros fatores. Costa & Costa (1998) testaram o fungicida procimidone em campos de feijoeiro com diferentes densidades de escleródios e verificaram que o controle adequado da doença foi obtido somente em áreas com menos de 19 escleródios por m². Em solos com mais de 27 escleródios por m², o fungicida foi ineficaz.

Vieira et al. (2001), ao testarem a eficiência de quatro fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro, por meio de irrigação por aspersão, observaram maior eficácia no controle dessa doença por meio dos fungicidas fluazinam, benomyl e procimidone.

A existência de resultados conflitantes entre trabalhos sobre a eficácia do controle químico do mofo branco, conforme encontrado na literatura, pode ser atribuída a fatores como fungitoxicidade, dose, época e modo de aplicação dos produtos (Vale et al., 1997).

Uma das recomendações de controle mais importantes é evitar a utilização de sementes acompanhadas de escleródios, devido ao papel desse tipo de inoculo na disseminação da doença a longas distâncias, além de seu papel como fonte de inóculo em cultivos posteriores e introdução do patógeno em áreas livres de doenças (Goulart et al., 1995).

O tratamento químico de sementes constitui uma das medidas eficientes devido à simplicidade de execução, ao baixo custo e à eficácia sob vários aspectos. Segundo Machado (2000), por meio desse método, pode-se eliminar o inóculo infectivo associado às sementes, proteger as sementes por ocasião da germinação e na fase inicial de desenvolvimento das plantas, garantindo o estabelecimento pleno da cultura no campo.

Rashid & Swanson (2008) verificaram que o tratamento de sementes com fungicidas promoveu significativa redução da incidência da infecção inicial causada por *S. sclerotiorum*, evitando entre 60% e 84% de perdas no rendimento na cultura do girassol.

Em trabalhos recentes desenvolvidos em condições controladas, câmaras de crescimento vegetal, favoráveis ao desenvolvimento do mofo branco em soja, feijão, algodão e girassol, foi demonstrado que o tratamento químico de sementes infectadas pelo fungo foi eficaz em reduzir o inóculo inicial, havendo,

em alguns casos, redução completa do inóculo pelos produtos testados, em geral formulados em misturas (Machado et al., 2008).

Em pesquisas realizadas por Mueller et al. (1999), foi demonstrada a importância da utilização de sementes saudáveis, ou seja, sementes não infectadas por *S. sclerotiorum*, uma vez que estimou-se a quantidade de escleródios e apotécios formados provenientes de sementes infectadas por este patógeno. Constataram também que, por meio do tratamento de sementes com os fungicidas thiran, fludioxonil e captan + pentacloronitrobenzene + tiabendazole, houve redução de 98% da formação de escleródios de sementes de soja infectadas, durante dois anos de estudo.

O uso de sementes certificadas, de procedência conhecida e certificado fitossanitário de origem, torna-se, portanto, fundamental, do ponto de vista de prevenção da doença pela sua introdução via sementes. Em virtude disso, encontra-se em fase de adoção, pelos sistemas de certificação de sementes no Brasil, o padrão zero para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, soja, algodão e girassol (Brasil, 2009a). Neste caso, é intolerável a ocorrência de escleródios em amostras de sementes submetidas, em laboratório, a análises de rotina.

2.5 Testes de sanidade para detecção do patógeno em sementes

Por intermédio das sementes, um grande número de patógenos considerados de risco pode ser disseminado entre regiões produtoras dentro de um mesmo país e entre países, determinando danos de dimensões incalculáveis, quase sempre irreversíveis (Machado, 1994). Portanto, a análise da qualidade sanitária das sementes antes da implantação de uma cultura é de extrema importância como medida de manejo desses tipos de doenças.

Para a detecção de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes de feijão e soja, o método descrito nas Regras para Análise de Sementes (RAS), publicado em 1992, consistia na incubação das sementes pelo método do papel de filtro e em

rolo de papel, com até 30 dias de incubação, sob temperatura de 5°C a 7°C, em escuro contínuo (Brasil, 1992).

Segundo Menezes (1987), a incubação das sementes pelo método do papel de filtro, por um período de 10 a 15 dias, era considerada satisfatória para a formação dos escleródios a partir de sementes de feijão infectadas pelo referido patógeno. Além desse método, era recomendada também a análise da fração impura das amostras de sementes para observação da presença de escleródios do fungo. Koch & Menten (2000) verificaram, posteriormente, que o método do papel de filtro com incubação por 14 dias, a 15°C, sob escuro contínuo, também era adequado para a detecção do patógeno.

Outra alternativa de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão foi relatada por Parisi et al. (2006), que observaram o desenvolvimento desse fungo pela metodologia originalmente desenvolvida por Anselme & Champion (1982) para a detecção de *Colletotrichum lindemuthianum*, conhecido como método de rolo de papel toalha. As sementes são incubadas, por 7 dias, a 20°C, em rolos de papel toalha úmidos e em ambiente com 100% de umidade relativa. Essa metodologia, além de permitir a detecção do agente de antracnose do feijão, possibilita também a detecção de *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*.

Tendo em vista a necessidade de uma metodologia mais rápida e segura para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e soja em análise de rotina, Peres (1996) e Peres et al. (2002) estabeleceram uma metodologia semisseletiva, com base em estudos anteriores conduzidos em Israel e Canadá, que tinham como alvo a detecção de *S. sclerotiorum*, na forma de ascóporos (Steadman et al., 1994) e na forma de escleródios (Nasser et al., 1995). Com pequenas diferenças, o substrato do meio semisseletivo daqueles estudos era composto por meio BDA acidificado, contendo azul de bromofenol e dois antibióticos, penicilina G e sulfato de estreptomicina, com incubação em escuro

contínuo. A formação de ácido oxálico por *S. sclerotiorum* provoca a mudança de coloração azul do substrato para a coloração amarela, indicando a presença do fungo naquele meio ou revelando a viabilidade de seus escleródios, alvo de interesse específico no trabalho de Nasser et al. (1995).

Os estudos de Peres (1996) e Peres et al. (2002) foram realizados aproveitando-se do substrato semisseletivo, até então desenvolvido, para o uso em Patologia de Sementes, mais especificamente para a detecção de *S. sclerotiorum*, em associação com sementes de feijão e soja. Por esta metodologia, o referido fungo, na forma de micélio, é identificado pela mudança de cor ao redor das sementes.

Com a finalidade de simplificar a metodologia estabelecida por Peres (1996) e Nasser et al. (1999) propuseram a redução dos ingredientes do meio agarizado até então desenvolvido. Verificaram que a redução da concentração de azul de bromofenol de 150 mg para 75 mg e com o uso de cloranfenicol na concentração de 50 ppm em substituição aos dois antibióticos antes recomendados, e a adição de 2,4-D (formulação ácida) para inibir a germinação das sementes possibilitaram a detecção do patógeno com maior rapidez e simplicidade operacional.

Uma modificação posterior proposta por Napoleão et al. (2006) do método Neon até então desenvolvido constou da redução das concentrações dos ingredientes do substrato, passando este a ser composto de: 1L BDA, 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol, 50 mg de ácido livre de 2,4-D, autoclavagem, sem ajuste de pH, o que ficou conhecido como método de Neon-S.

Segundo as novas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009b), o meio semisseletivo Neon ágar-bromofenol foi incluído para detecção de *S. sclerotiorum* nas culturas da soja e do feijão, utilizando a mesma composição de Nasser et al. (1995), exceto pela não inclusão do 2,4-D, tendo a alternativa de

substituição dos antibióticos sulfato de estreptomicina e penicilina G por cloranfenicol. As sementes são incubadas a 20°C, com 12 horas de fotoperíodo, por 5-8 dias.

A exclusão do uso de 2,4-D neste método tem como base estudos preliminares realizados em laboratório por Machado (1980), em que foi demonstrado que *S. sclerotiorum* foi um dos fungos mais sensíveis à ação de 2,4-D, apresentando redução acentuada de crescimento micelial em substrato contendo tal produto.

2.6 O uso da restrição hídrica na detecção do patógeno em sementes

O uso de restritores hídricos em testes de sanidade de sementes para diversas espécies vegetais tem sido relativamente bem investigado nos últimos anos, havendo possibilidade de adoção desses compostos para alguns casos. A utilização desses restritores tem como vantagem a substituição do uso de 2,4-D, que é um inibidor ou repressor da germinação de sementes, em espécies de dicotiledôneas, inicialmente recomendado para testes com sementes de feijão e brássicas, bem como em substituição ao uso do método de congelamento nas monocotiledôneas (Limonard, 1968; Neergard, 1979; Coutinho, 2000).

A técnica de restrição pelo uso de solutos, tais como o manitol, NaCl e PEG, tem sido alvo de estudos, visando inibir a germinação das sementes de feijão, arroz, soja, milho, trigo, algodão, cenoura, etc. (Coutinho et al., 2001; Machado et al., 2003; Magalhães, 2005).

Essa técnica consiste, basicamente, em embeber o papel de filtro ou equivalente nas soluções com potenciais hídricos adequados ao controle da germinação das sementes, de maneira a não afetar o desenvolvimento de fungos associados a sementes (Magalhães, 2005).

A inibição do processo de germinação das sementes provocadas por estes solutos ocorre devido ao efeito osmótico e/ou iônico que dificulta a

absorção de água ou facilita a penetração de íons nas células (Moezel & Bell, 1987). Tal efeito pode ser também atribuído à menor mobilização das reservas, menor síntese e atividade enzimática e mudanças na turgescência celular (Bruni & Leopold, 1992; Dell'Aquila, 1992; Bewley & Black, 1994).

Coutinho et al. (2001) verificaram que a restrição hídrica, induzida por NaCl, KCl e manitol, em diferentes potenciais osmóticos, não interferiu na detecção dos fungos associados às sementes ou às plântulas de feijão e arroz, em comparação com os métodos padrões utilizados para estes casos. A utilização dos mesmos solutos em potenciais de -0,6 a -1,0 MPa, segundo Machado et al. (2003), revela-se como um procedimento promissor para impedir ou reduzir a germinação de sementes de soja no teste de incubação em substrato de papel. Da mesma forma, o emprego de manitol e NaCl, nos potenciais osmóticos -0,6, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa, reduziu o processo de germinação de sementes e o comprimento de plântulas de algodoeiro (Machado et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2010. Foram conduzidos seis ensaios, de acordo com os objetivos inicialmente propostos.

3.1 Ensaio 1 - Avaliação do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em substrato ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos

3.1.1 Origem e obtenção dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Quatro isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* foram utilizados neste trabalho. As informações sobre as espécies hospedeiras e locais de origem desses isolados encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1 Origem e hospedeiros de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* obtidos nas culturas de soja, feijão e algodão.

Isolados	Cultura	Origem geográfica
ISF	Feijão	Lavras, MG
ISS ₁	Soja	Cristalina, GO
ISA	Algodão	Luziânia, GO
ISS ₂	Soja	Lavras, MG

As culturas puras de *S. sclerotiorum* foram obtidas pelo procedimento convencional de isolamento em laboratório em que fragmentos de caules e hastes de plantas com lesões típicas da doença foram desinfestados, inicialmente, com solução de hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos, depois lavados, por três vezes, em água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (extrato de 200 g de batata, 20 g de ágar purificado e 20 g de dextrose). As placas foram mantidas em câmara de crescimento, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ em fotoperíodo de 12 horas, por 7

dias. Discos de 5 mm de diâmetro, retirados das margens dessas colônias, foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA e mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas, por um período de 5 dias, obtendo-se, dessa forma, as culturas puras. Em seguida, discos de micélio foram armazenados pelo método de Castellani, para uso posterior (Smith & Onions, 1983).

3.1.2 Preparo dos meios de cultura

Um dos meios de cultura utilizados neste estudo foi referente ao método de Neon-S desenvolvido por Napoleão et al. (2006), do qual o ácido de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) faz parte (composição Tabela 2). Todos os componentes foram adicionados ao meio antes da autoclavagem, não sendo necessária a correção do pH como no meio Neon padrão (Nasser et al., 1995; Peres, 1996).

A modificação do meio Neon-S para o meio Neon modificado neste trabalho consistiu na substituição de 2,4-D por restritores hídricos [manitol, cloreto de sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG)], que provocaram nos meios de cultura diferentes potenciais osmóticos, conforme determinado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995) (composição Tabela 2). Da mesma forma como descrito para o meio Neon-S, todos os componentes, neste caso, foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. Após o preparo, os meios de cultura foram autoclavados, a 121°C, por 20 minutos.

TABELA 2 Composição dos substratos comparados neste estudo pelo método Neon.

Meios de cultura NEON	Composição				Potenciais osmóticos (MPa)
	BDA	Cloranfenicol	Azul de bromofenol	Restritores hídricos	
Neon-S	1L	50 mg	50 mg	50 mg de 2,4-D (ácido livre)	-
Neon manitol	1L	50 mg	100 mg	Manitol	-0,6
					-0,8
					-1,0
					-1,2
					-1,4
Neon NaCl	1L	50 mg	100 mg	NaCl	-0,6
					-0,8
					-1,0
					-1,2
					-1,4
Neon PEG	1L	50 mg	100 mg	PEG	-0,1
					-0,3
					-0,5
					-0,7
					-0,9
NEON padrão	1L	50 mg	100 mg	-	-

Para o caso de polietilenoglicol (PEG) foi necessário utilizar soluções deste soluto diluído em água destilada, dependendo das concentrações requeridas e vertendo-se 10 ml dessas soluções sobre o meio NEON padrão (BDA, azul de bromofenol e cloranfenicol), previamente solidificado nas placas.

Os efeitos da restrição hídrica no crescimento micelial dos isolados foram avaliados quanto à composição do meio Neon osmoticamente modificado. Os tratamentos consistiram na adição dos restritores hídricos manitol, NaCl e PEG, e seus respectivos níveis de potenciais osmóticos. A composição, o

preparo e os potenciais osmóticos dos meios de cultura foram descritos no item 3.1.2.

Os substratos com restritores hídricos foram comparados com os substratos de meio BDA puro, o meio Neon-S (Napoleão et al., 2005) e o meio NEON modificado sem adição de nenhum inibidor de germinação.

Depois de autoclavados, os meios de cultura foram vertidos (15 ml) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados da periferia das colônias de *S. sclerotiorum*, com 5 dias de idade, de cada um dos isolados e transferidos para o centro de cada placa, sendo utilizadas cinco placas como repetições. As placas foram distribuídas ao acaso, em câmara de incubação (BOD), com fotoperíodo de 12 horas, sob temperatura de 20°C.

As avaliações foram realizadas diariamente, medindo-se no verso de cada placa os dois diâmetros ortogonais dos isolados até a ocupação completa da placa.

O índice de crescimento micelial (ICM) foi determinado pela fórmula proposta por Oliveira (1991):

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}, \text{ sendo:}$$

ICM = índice de crescimento micelial

C_1, C_2, C_n = crescimento micelial das colônias na primeira, na segunda e na última avaliação

N_1, N_2, N_n = número de dias

A análise estatística de regressão foi realizada com auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2000). O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o inteiramente casualizado (DIC).

3.2 Ensaio 2 - Avaliação dos efeitos da restrição hídrica na protrusão radicular de sementes de feijão, soja e algodão

Os efeitos da restrição hídrica na protrusão radicular das sementes foram avaliados quanto aos solutos em diferentes potenciais hídricos. Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, foram colocados três discos de papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos em meio Neon diluído, contendo os restritores nos seguintes potenciais osmóticos: -0,6; -0,8; -1,0; -1,2 e -1,4 MPa para manitol e NaCl e -0,1; -0,3; -0,5; -0,7 e -0,9 MPa para PEG.

O substrato de papel diluído com o meio Neon-S foi também testado em comparação com os demais tratamentos. Em seguida, foram distribuídas quarenta sementes em cada placa.

As placas com as sementes foram mantidas em câmara de incubação, sob temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12 horas, por 7 dias.

A avaliação consistiu no cálculo da porcentagem de sementes protruídas. Foram consideradas protruídas aquelas com sinais visíveis de emissão de raiz (comprimento maior do que 0,1 cm).

O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o inteiramente casualizado (DIC).

3.3 Ensaio 3 - Avaliação da eficácia do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja

A partir dos resultados das avaliações do comportamento do fungo em relação aos meios e dos potenciais hídricos e das sementes em relação à protrusão radicular (itens anteriores), foram feitas comparações das metodologias de detecção de *S. sclerotiorum* dos substratos dos meios Neon-S e o meio Neon modificado com restritores hídricos para as sementes de feijão e soja.

Para a adequação da metodologia de detecção de *S. sclerotiorum* nas sementes feijão e soja, foram utilizados dois tipos de substratos: meio ágar sólido e substrato de papel agarizado contendo, ambos, os demais ingredientes do método Neon padrão. Os potenciais hídricos dos solutos utilizados nas soluções osmóticas e nos substratos do meio de Neon padrão foram os seguintes: manitol (-1,0 MPa), NaCl (-1,0 MPa), PEG (-0,5 MPa).

Foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro, tendo os substratos, com a adição dos restritores hídricos, apresentado valores de pH entre 5,3 a 5,5.

No teste de incubação em substrato de papel agarizado do meio Neon foram utilizados três discos de papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com meio agarizado contendo os solutos manitol, NaCl e PEG nos potenciais acima descritos.

No plaqueamento em meio ágar sólido foram vertidos nas placas 30ml de meio Neon modificado com os restritores hídricos. O substrato de Neon-S foi também testado em comparação com os demais tratamentos.

Obtenção de sementes infectadas por *S. sclerotiorum*

Para a obtenção de sementes de feijão, soja e algodão artificialmente infectadas por *S. sclerotiorum* foram utilizadas placas de Petri de vidro de 15 cm de diâmetro, nas quais foram vertidos meio BDA modificado osmoticamente por manitol a -1,0 MPa, conforme metodologia já conhecida de literatura (Carvalho, 1999; Costa, 2000). Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados da periferia das colônias de quatro dias de crescimento de cada um dos isolados (de feijão, de soja e de algodão) e transferidos para o centro de cada placa.

Após 3 dias de crescimento, em cada placa, foram distribuídas 200 sementes em camadas simples, tomando-se cuidado de manter a superfície da semente em contato com a superfície da colônia fúngica, sendo cada cultura

inoculada com seu respectivo isolado. As placas foram mantidas em BOD, sob temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por 96 horas. Depois de retiradas das placas, as sementes foram secas em temperatura ambiente por 48 horas e, posteriormente, armazenadas em câmara fria e seca.

Para a obtenção de sementes de feijão naturalmente infectadas por *S. sclerotiorum* foram utilizados vinte vasos (5 L) com substrato composto de areia:composto, na proporção de 2:1, nos quais foram obtidas 5 plantas. Esse cultivo foi conduzido em casa de vegetação telada. Entre o período do florescimento e o início da formação das vagens, as plantas foram inoculadas com discos de meio de cultura (5 mm) com micélio fúngico de *S. sclerotiorum* baseando-se na metodologia descrita por Silva (1989). Por esta técnica, fazem-se ferimentos com agulha esterilizada, nas hastes das plantas. Os discos, com a face micelial voltada para o ferimento, foram aderidos às hastes. Para manter a umidade, no período noturno, as plantas foram cobertas por lonas plásticas, durante dois dias, após a inoculação.

As sementes de soja naturalmente infectadas foram obtidas de um campo infectado com mofo branco em Jataí, GO.

Foram distribuídas quarenta sementes por placa, aleatoriamente, sendo dez sementes artificialmente inoculadas (descrito no item 4.5) e trinta não inoculadas. Foram utilizadas cinco placas, cada uma constituindo uma repetição.

As placas com as sementes foram mantidas em câmara de incubação, sob temperatura de 20°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias.

A avaliação consistiu do cálculo da porcentagem de sementes infectadas por *S. sclerotiorum*, que apresentaram ao seu redor mudança de coloração do meio. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o inteiramente casualizado (DIC).

3.4 Ensaio 4 - Avaliação dos efeitos do regime de luz na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão, por meio do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos

Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, pelo método de incubação em substrato de papel, foram dispostos três discos de papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com meio agarizado Neon contendo os solutos manitol (-1,0 MPa), NaCl (-1,0 MPa) e PEG(-0,5 MPa). O substrato de Neon-S foi também testado em comparação com os demais tratamentos.

Foram utilizadas quarenta sementes por placa, com o mesmo percentual de sementes inoculadas, conforme descrito no item anterior.

As placas com as sementes foram mantidas em câmara de incubação, sob temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12 horas de claro/12 horas de escuro (alternado) e escuro contínuo, por 7 dias.

A avaliação consistiu da análise da porcentagem de sementes infectadas por *S. sclerotiorum* que apresentaram, ao seu redor, mudança de coloração do meio. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o inteiramente casualizado (DIC).

3.5 Ensaio 5 - Avaliação da metodologia de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão naturalmente infectadas, pelo método ágar-bromofenol com modificações

As sementes naturalmente infectadas de feijão e soja (descritas no item 4.5) foram testadas quanto à incidência de *S. sclerotiorum* pelo método do papel de filtro impregnado com o meio Neon contendo, em separado, os restritores hídricos manitol, NaCl e PEG, em contraste com o método de detecção em substrato de papel descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

No método do papel de filtro impregnado com o meio Neon modificado com restritores hídricos, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, três discos de

papel de filtro foram previamente esterilizados e umedecidos com meio agarizado Neon contendo os solutos manitol (-1,0 MPa), NaCl (-1,0 MPa) e PEG(-0,5 MPa). O substrato de Neon-S foi também testado em comparação com os demais tratamentos. Foram utilizadas quarenta sementes por placa, utilizando cinco placas, cada uma constituindo uma repetição. As placas com as sementes foram mantidas em câmara de incubação, sob temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro contínuo, por 7 dias.

A título de comparação com o que se tem feito em análise de rotina, foi incluído neste ensaio o método *blotter test*, no qual se utiliza 2,4-D (formulação salina) na concentração de 5 ppm. As placas com as sementes foram mantidas em câmara de incubação, sob temperatura de 5°C a 7°C no escuro contínuo, por 30 dias.

A avaliação consistiu na análise da porcentagem de sementes infectadas por *S. sclerotiorum* que apresentaram, ao seu redor, mudança de coloração do meio. O delineamento experimental utilizado no ensaio foi o inteiramente casualizado (DIC).

3.6 Ensaio 6 - Avaliação do comportamento de fungos comumente associados às sementes de feijão, soja e algodão em meio ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos

Para este trabalho foram utilizados isolados de diferentes espécies fúngicas que comumente são encontrados em associação com sementes de soja, feijão e algodão. Com essa finalidade, foram incluídas, no trabalho, as espécies *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *C. lindemuthianum*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium* sp., *Isariopsis griseola*, *Phomopsis sojae*, *Phoma* sp., *Dreschlera* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium cladosporioides*, quatro

isolados de *Penicillium* spp., três isolados de *Aspergillus niger*, dois isolados de *A. flavus* e um de *A. ochraceus*. A maior parte foi obtida diretamente de sementes portadoras dos mesmos durante testes de sanidade conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA e uma menor parte foi obtida da micoteca desse mesmo laboratório. Todos os isolados foram inicialmente incubados em BDA, por 7 dias, em câmara de crescimento, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Discos de 5 mm de diâmetro das margens dessas colônias foram transferidos para o centro de placas de 9 cm de diâmetro contendo 15 ml de meio Neon com manitol (-1,0 MPa), cloreto de sódio (-1,0 MPa), polietilenoglicol (-0,5 MPa). Essas placas foram incubadas, por 5 dias, em câmara de crescimento, a 20°C , e fotoperíodo de 12 horas.

As placas foram avaliadas quanto à mudança de coloração do meio Neon, de azul para amarelo, sob o crescimento do micélio fúngico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio 1 - Comportamento de *Sclerotinia sclerotiorum* em substrato ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos

Pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), houve diferenças significativas, estatisticamente, entre os quatro isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* no que se refere ao índice de crescimento micelial, independente da composição do meio (manitol, NaCl, PEG ou, mesmo, no BDA puro). Esse resultado mostra a variabilidade genética nesta espécie, proveniente de diferentes áreas e hospedeiros (Tabela 3 e Figura 1).

TABELA 3 Índices de crescimento micelial (valores em cm) de quatro isolados de *S. sclerotiorum* em meios de cultura Neon modificado com diferentes restritores hídricos, em comparação com demais substratos das demais modificações do método Neon.

Tratamentos	Isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
	ISF	ISS ₁	ISA	ISS ₂
Neon (Manitol)	5,311 A a	3,869 B b	4,342 A c	1,563 B d
Neon (NaCl)	5,400 A a	4,487 A b	3,145 B c	1,548 B d
Neon (PEG)	4,634 B a	4,234 A b	2,896 B c	2,249 A d
BDA	5,270 A a	4,460 A b	2,980 B c	2,110 A d
NEON	5,420 A a	4,190 A b	2,870 B c	1,120 C d
Neon-S	0,380 C a	0,560 C a	0,670 C a	0,970 C a

As médias com mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e com mesma letra minúscula não diferem entre si, nas linhas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). (ISF= Feijão-Lavras; ISS₁=Soja-Cristalina; ISA=Algodão-Luziânia; ISS₂=Soja-Lavras).

Estudos sobre a estrutura populacional e a diversidade em *S. sclerotiorum* têm demonstrado diversidade nos genótipos das populações dos

Estados Unidos e da Austrália (Kohn et al., 1991; Cubeta et al., 1997; Atallah et al., 2004; Sexton et al., 2006).

Noonan et al. (1996), utilizando análises de RAPD e rDNA, detectaram diferenças entre quatro isolados de *S. sclerotiorum* da Nova Zelândia e quatro dos Estados Unidos, embora tenham sido consistentemente separados por uma única banda segundo o país de origem.

Em estudo baseado nas técnicas de DNA *fingerprinting* não foram detectados genótipos semelhantes de *S. sclerotiorum* entre amostras de populações de canola do Canadá e de repolho da Carolina do Norte e Louisiana, nos EUA. Esses dados foram consistentes com as populações de *S. sclerotiorum*, sendo subdivididas por separação geográfica, especialização por hospedeiro e adaptação ecológica (Cubeta et al., 1997).

Essa variabilidade genética de *S. sclerotiorum* provavelmente ocorre pela anastomose de hifas, permitindo a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes e, portanto, podendo ser responsáveis pelas recombinações genéticas do fungo (Alexopoulos et al., 1996; Glass et al., 2000).

No presente estudo, para o isolado ISA (algodão), a restrição hídrica promovida por manitol provocou efeito estimulante ao seu crescimento micelial. É possível que, neste caso, o referido restritor tenha sido utilizado como fonte de carbono, conforme salientaram Carvalho et al. (2001). Segundo Coutinho (2000), o efeito estimulante de manitol para outros fungos pode estar relacionado à sua utilização como fonte adicional de energia ou a um melhor ajuste osmótico da célula fúngica pela absorção dos solutos e consequente extensão celular. Assim como em estudos de Machado et al. (2001a), em que a restrição hídrica promovida pelo manitol não inibiu o crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *S. sclerotiorum*, em meio BDA, tendo apresentado, ao contrário, efeito estimulante ao crescimento micelial desses organismos, quando comparado com meio sem restrição hídrica

(0,0 MPa). Por outro lado, para os isolados ISS₁ e ISS₂ de soja (Cristalina e Lavras), o efeito de manitol foi oposto, reduzindo o seu crescimento micelial na presença deste restritor.

Em relação a NaCl, o crescimento do isolado ISS₂ (Lavras) foi estatisticamente inferior ao crescimento em meio BDA puro. Essa mesma tendência ocorreu com o restritor PEG em relação ao isolado ISF. Essa redução do valor de ICM pode ser explicada pelos efeitos diretos da restrição hídrica do substrato no crescimento do fungo, conforme relatado também por Carvalho et al. (2001). Mexal & Reid (1973) observaram que o PEG é um soluto que pode induzir estresse hídrico para determinados fungos. Embora possa ser absorvido em menor extensão, não é metabolizado, como os açúcares e nem é tóxico em altas concentrações, como podem ser alguns sais. Segundo Machado et al. (2007), o crescimento micelial dos fungos *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *S. sclerotiorum* foi reduzido em substrato contendo NaCl em comparação ao manitol, indicando um possível efeito tóxico desse sal no crescimento destes fungos.

Pela literatura, percebe-se que, de modo geral, o crescimento micelial de fungos em meios de cultura osmoticamente modificados com a adição de solutos iônicos e não-iônicos é variável, havendo habilidade diferencial de absorver água do ambiente, e que existe uma faixa de potencial hídrico adequada ao crescimento de cada espécie (Alam et al., 1996; Carvalho, 1999; Costa, 2000; Coutinho, 2000).

Para os isolados de *S. sclerotiorum* utilizados neste estudo, não houve diferença estatística entre os valores de potenciais hídricos utilizados no meio Neon modificado com o restritor manitol quanto ao índice de crescimento micelial. Os valores intermediários no gradiente de potenciais osmóticos utilizados, tanto para PEG (-0,5 MPa) quanto para NaCl (-1,0 MPa) favoreceram de maneira positiva o crescimento do referido fungo (Figura 1).

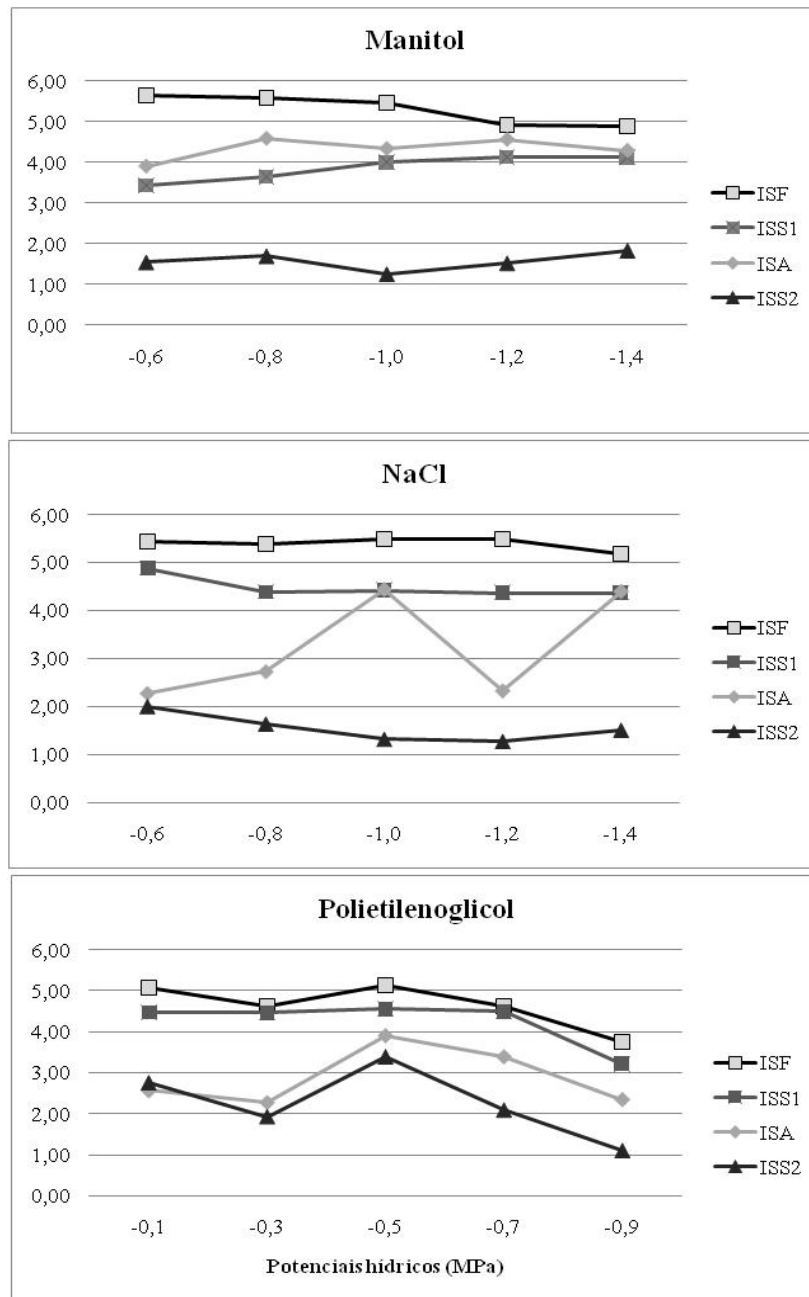


FIGURA 1 Índice de crescimento micelial de quatro isolados de *S. sclerotiorum* em meio Neon osmoticamente modificado com manitol, NaCl e PEG.

Os resultados deste trabalho apresentam tendências semelhantes às observadas para outros fungos, conforme publicações de Coutinho (2000), envolvendo *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* com restrição hídrica induzida pelos solutos manitol, NaCl e KCl; por Machado et al. (2004), no uso do restritor hídrico manitol para os fungos *Botryodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gossypii* e por Machado et al. (2001b), no uso de manitol em *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* e *Diplodia maydis*, em que o crescimento desses fungos não sofreu interferência pelo condicionamento osmótico.

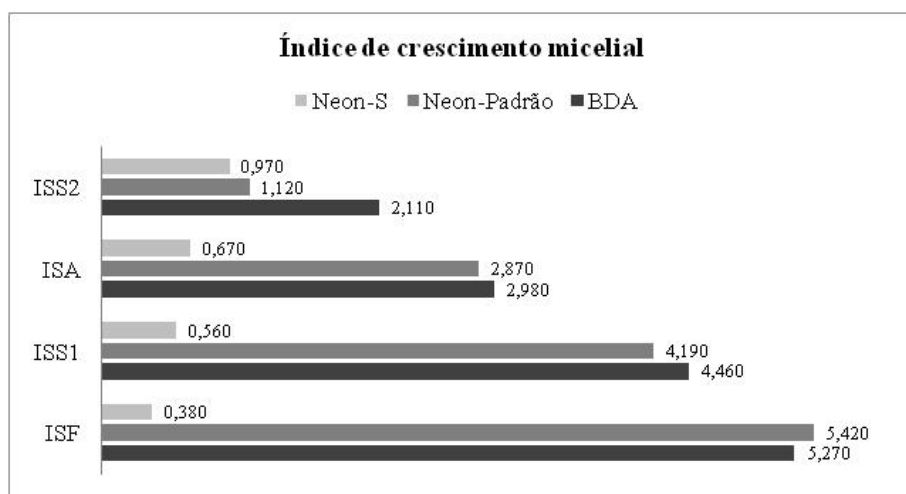


FIGURA 2 Índice de crescimento micelial de quatro isolados de *S. sclerotiorum* em meio de cultura Neon-S, Neon-Padrão e BDA.

No presente trabalho, no meio Neon-S, no qual o 2,4-D (ácido de 2,4-diclorofenoxiacético) foi utilizado como restritor hídrico, os isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram índices de crescimento micelial inferiores, estatisticamente, à maioria dos demais tratamentos, indicando o efeito fungitóxico deste ácido sobre este fungo (Figura 2 e 3). Esse mesmo efeito de 2,4-D foi também observado por Machado (1980), em estudos realizados *in*

vitro. Segundo este autor, os efeitos de 2,4-D sobre os fungos podem ser observados na forma de deformações de conídios, redução de esporulação e do diâmetro de colônias. Por estes trabalhos, existem informações de que a formulação salina de 2,4-D é a menos prejudicial aos fungos.

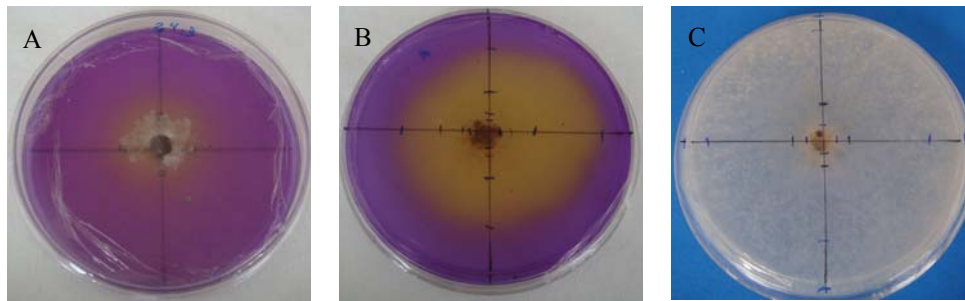


FIGURA 3 Crescimento micelial do isolado ISA de *Sclerotinia sclerotiorum* com 4 dias de idade em A- Neon-S (2,4-D); B- Neon padrão e C- BDA puro.

4.2 Ensaio 2 - Efeitos da restrição hídrica na protrusão radicular de sementes de feijão, soja e algodão

A inibição do processo de germinação de sementes durante o período de incubação pelo teste de sanidade, conhecido como *blotter test*, é importante para garantir a precisão desse método, além de torná-lo mais rápido. Nesse sentido, o efeito de qualquer inibidor de germinação deve ser previamente avaliado, nas condições em que o teste é conduzido.

Neste trabalho, independente do restritor hídrico utilizado, nos testes de sanidade de sementes, mesmo sob a influência de componentes do meio Neon observou-se que, à medida que os níveis de potenciais osmóticos dos restritores comparados foram mais negativos, houve maior inibição da germinação das sementes de feijão, soja e algodão (Tabela 4).

A dimensão da inibição de germinação, quando comparados os potenciais osmóticos utilizados, foi mais evidente a partir de -1,0 MPa para manitol, -1,0 MPa para NaCl e -0,5 MPa para PEG.

É importante frisar que os níveis de inibição mencionados podem ser considerados satisfatórios para uso em testes de sanidade, conforme relatos de pesquisadores nesta área (Carvalho, 1999; Machado et al., 2001b; Costa, 2003). Um valor referencial de tamanho de alongamento da radícula, pelo teste de sanidade, não deve ultrapassar a maior dimensão das sementes.

Os resultados observados neste trabalho corroboram os de diversos outros pesquisadores que já realizaram estudos nesta linha de pesquisa. Exemplos nesse sentido são os trabalhos de McDonald Junior et al. (1988) e Rosseto et al. (1997), com sementes de soja e PEG 6000.

Moraes et al. (2005), utilizando sementes de feijão induzidas pelos solutos PEG e NaCl, verificaram que há redução da germinação das sementes a partir de -0,2 MPa.

De modo geral, o emprego de manitol e NaCl, nos potenciais osmóticos -0,6, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa, reduz o processo de germinação de sementes e o comprimento de plântulas de algodoeiro em níveis satisfatórios para uso em teste de sanidade para a detecção de fungos presentes em sementes desta espécie (Machado et al., 2007).

TABELA 4 Porcentagem de sementes protrundidas de feijão, soja e algodão sob efeito de diferentes restritores hídricos e potenciais osmóticos no substrato do método Neon modificado.

Tratamentos	Potenciais osmóticos (MPa)	Espécies de hospedeiros		
		Feijão	Soja	Algodão
Neon (manitol)	-0,6	0,50 a	1,75 a	11,25 b
	-0,8	0,25 a	5,00 b	6,00 a
	-1,0	0,00 a	2,75 a	0,00 a
	-1,2	0,00 a	0,00 a	0,50 a
	-1,4	0,00 a	0,00 a	1,25 a
Neon (NaCl)	-0,6	0,25 a	12,5 c	34,0 d
	-0,8	0,50 a	2,25 a	8,75 b
	-1,0	1,00 a	0,00 a	5,50 a
	-1,2	0,00 a	0,50 a	2,25 a
	-1,4	0,00 a	0,00 a	0,25 a
Neon (PEG)	-0,1	20,5 b	6,00 b	22,75 c
	-0,3	4,75 a	3,00 a	13,75 b
	-0,5	2,25 a	0,25 a	2,25 a
	-0,7	0,50 a	0,00 a	2,25 a
	-0,9	1,50 a	0,50 a	1,50 a
Neon-S	Concentração 50 ppm	45,5 c	42,0 d	56,5 e

As médias com mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Quanto ao meio Neon-S, cujo componente utilizado como restritor hídrico foi a formulação ácida de 2,4-D, a porcentagem de sementes protrundidas foi bastante elevada nas três culturas em estudo. No entanto, pode-se observar que a protrusão de radículas não foi prejudicial à análise de sanidade das sementes pelo fato de que o 2,4-D inibiu o desenvolvimento posterior dessas radículas em níveis considerados satisfatórios para este teste.

4.3 Ensaio 3 - Efeitos dos substratos do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja

Independente do tipo de substrato utilizado, observa-se que não houve diferenças estatísticas na porcentagem de detecção de *S. sclerotiorum* nas sementes de feijão entre os diferentes tratamentos considerados neste estudo (Tabela 5).

TABELA 5 Porcentagem de sementes de feijão com *S. sclerotiorum* em diferentes restritores em substrato de papel agarizado ou meio ágar sólido.

Tratamentos Neon com modificações	Substrato de Incubação	
	Ágar sólido	Papel agarizado
Neon-S	11,5 A a	8,5 A a
Neon (manitol)	10,0 A a	10,5 A a
Neon (NaCl)	10,5 A a	8,5 A a
Neon (PEG)	11,5 A a	10,5 A a

As médias com mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e com mesma letra minúscula não diferem entre si, nas linhas, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Erro padrão = 2,36 (Neon Manitol= 1.0MPa; Neon NaCl= -1.0MPa; Neon PEG= -0.5MPa).

O desempenho e a sensibilidade dos testes de detecção de *S. sclerotiorum*, utilizando o meio Neon modificado podem ser inferiores quando ocorrer a presença de contaminantes de crescimento rápido, como *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Esses fungos podem, em pouco tempo, ocupar toda a placa de Petri, dificultando a identificação e a detecção do fungo-alvo, principalmente se as sementes não forem desinfestadas previamente. Esses inconvenientes podem ser ainda mais acentuados quando são empregados substratos mais nutritivos, como o método de plaqueamento em meio ágar sólido. Dessa forma, a utilização da metodologia de incubação em substrato de papel pode ser uma alternativa recomendável,

principalmente se foi considerado também o fator econômico (Salustiano et al., 2006).

No intuito de eliminar uma etapa no preparo do meio de cultura, o procedimento de ajuste de pH do substrato foi descartado para tornar o método mais rápido para o uso em análises de rotina. Napoleão et al. (2006) relataram que a velocidade de formação do halo amarelo em torno dos discos de BDA contendo micélio do fungo pelo método Neon-S não foi influenciada pelo ajuste de pH do meio. Segundo Steadman et al. (1994), o indicador de pH, azul de bromofenol, provoca a mudança de coloração do meio de azul para amarelo na faixa de pH 4,7-6,0, o que fez com que, nos demais restritores hídricos deste estudo, não tenha sido observada a necessidade do ajuste de pH do substrato.

Nos testes conduzidos com sementes de soja portadoras de *S. sclerotiorum*, as metodologias de incubação em substrato de papel agarizado e plaqueamento em meio ágar sólido não diferiram estatisticamente entre si na porcentagem de detecção de *S. sclerotiorum* para os restritores hídricos Manitol e NaCl e o método Neon-S (2,4-D) (Tabela6).

No entanto, para o restritor PEG, o procedimento de incubação em substrato de papel agarizado apresentou menores índices de porcentagem de detecção nas sementes, quando comparados ao plaqueamento em meio ágar sólido. A alta porcentagem de sementes detectadas no plaqueamento em meio sólido decorre, possivelmente, da contaminação secundária entre as sementes e ao favorecimento do rápido crescimento de *S. sclerotiorum* nessa composição.

TABELA 6 Porcentagem de sementes de soja infectadas por *S. sclerotiorum* sob efeito dos diferentes restritores em substrato de papel agarizado ou meio ágar sólido.

Tratamentos Neon com modificações	Substrato	
	Ágar sólido	Papel agarizado
Neon-S	16,5 B a	13,5 A a
Neon (manitol)	13,0 B a	11,5 A a
Neon (NaCl)	13,0 B a	9,0 A a
Neon (PEG)	41,0 A a	11,0 A b

As médias com mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e com mesma letra minúscula não diferem entre si, nas linhas, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Erro padrão = 3,00. (Neon Manitol= 1.0MPa; Neon NaCl= -1.0MPa; Neon PEG= -0.5MPa).

4.4 Ensaio 4 - Efeitos do regime de luz na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*, em sementes de feijão, soja e algodão, por meio do método ágar-bromofenol modificado com restritores hídricos

De modo geral, o ambiente de incubação sob escuro contínuo proporcionou valores percentuais de incidência de *S. sclerotiorum* superiores, estatisticamente, ao regime de alternância de luz e escuro. Essa tendência foi geral para o método envolvendo todos os restritores, manitol, NaCl e PEG, para as três espécies de sementes usadas (Tabela 7 e Figura 4).

É importante salientar que, embora haja comportamentos distintos entre os fungos em relação ao regime luminoso e alternância de luz/escuro, é um recurso que se aplica em testes de sanidade para os fungos que produzem conídios (Cochrane, 1958; Minussi et al., 1977; Deacon, 1996). Nestes casos, há um estímulo dessa alternância ao aumento da produção de esporos, que é quase sempre necessário para identificação de certas espécies (Neergaard, 1977; Ansari et al., 1989; Rotem et al., 1989; Assis et al., 1997).

TABELA 7 Porcentagem de incidência *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, soja e algodão observada pelo método Neon com modificações, sob diferentes regimes de fotoperíodo.

Fotoperíodo	Tratamentos			
	Método	Neon com modificações		
	Neon-S	Manitol -1,0MPa	NaCl -1,0MPa	PEG -0,5MPa
Feijão				
Escuro contínuo	25,5 A b	21,0 A b	22,0 A b	31,0 A a
12 h claro/12h escuro	8,5 B a	10,5 B a	8,5 B a	10,5 B a
Soja				
Escuro contínuo	19,4 A b	35,5 A a	27,0 A b	21,5 A b
12h claro/12h escuro	13,5 A a	11,5 B a	9,0 B a	11,0 B a
Algodão				
Escuro contínuo	25,5 A b	42,0 A a	21,5 A b	19,5 A b
12h claro/12h escuro	11,0 B a	7,0 B a	5,5 B a	6,0 B a

As médias com mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e com mesma letra minúscula não diferem entre si, nas linhas, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), em cada cultura.

O uso de alternância de luz e escuro, durante a incubação de sementes, tem como finalidade estimular a esporulação de alguns fungos (Neergaard, 1977). No caso de *S. sclerotiorum*, o estímulo à esporulação é desnecessário, uma vez que esse fungo não forma conídios durante o período de incubação pelo teste de sanidade. Exemplos de espécies cuja esporulação é estimulada na presença de alternância de luz são: *Alternaria zinniae*, *A. dauci*, *A. brassica*, *A. macrospora*, *Fusarium solani*, *Derschlera oryzae* e *Bipolaris sorokiniana* (Rotem et al., 1989; Fancelli & Kimati, 1990; Assis et al., 1997; Teixeira et al., 2001).

Alternaria alternata na presença de luz contínua apresentou menores taxas de crescimento e, por outro lado, esporulação mais intensa no escuro contínuo, a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Ungaro & Azevedo, 1986). Esse comportamento foi também observado para *Colletotrichum gloeosporioides* (Francisco Neto et al., 1994), *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. & Rg. (Bolkan et al.,

1982), *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. e *Fusarium graminearum* Schw. (Devi & Singh, 1994).

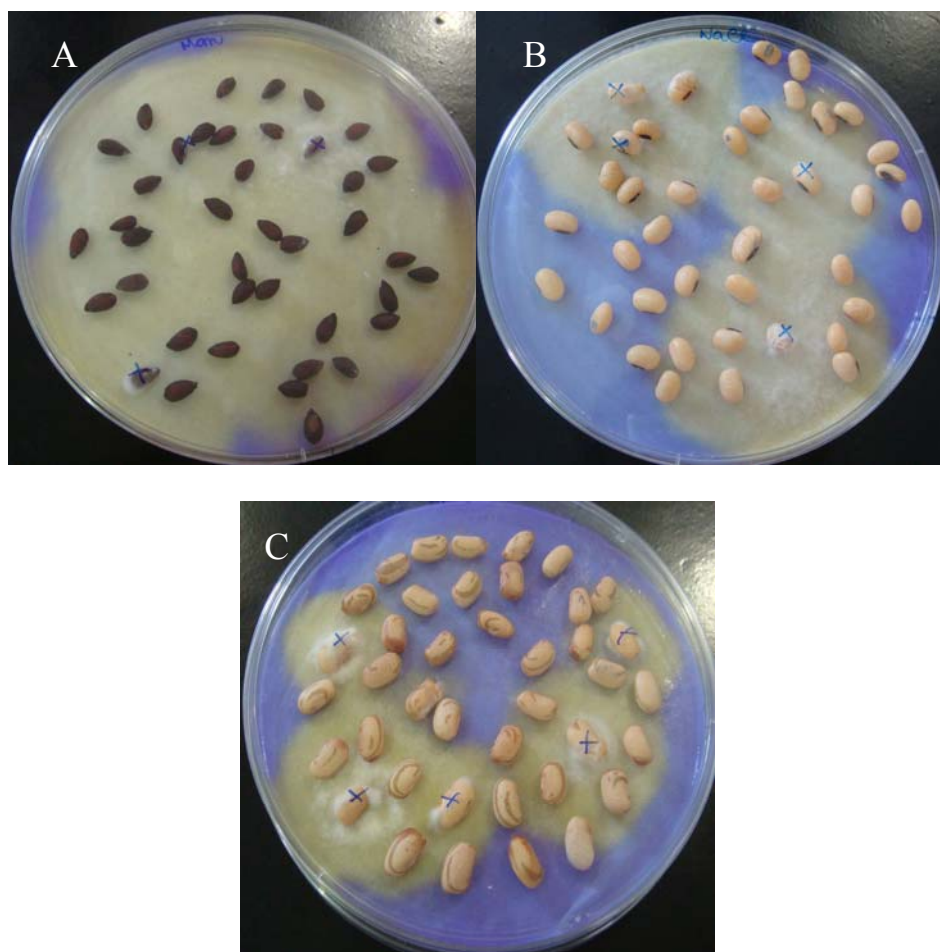


FIGURA 4 Fotos do *blotter test* pelo método ágar-bromofenol sob temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo escuro contínuo, com descoloração do substrato de azul para amarelo nas sementes com incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*. A- sementes de algodão em substrato com manitol a $-1,0\text{ MPa}$; B- sementes de soja em substrato com NaCl a $-1,0\text{ MPa}$ e C- sementes de feijão em substrato com PEG a $-0,5\text{ MPa}$.

Os maiores índices de ocorrência de *S. sclerotiorum* sob regime de escuro contínuo devem-se, provavelmente, ao efeito desfavorável dessa condição a determinadas espécies, em geral contaminantes, que poderiam dificultar o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, reduzindo, assim, a alteração de cor do substrato de incubação.

4.5 Ensaio 5 - Comparação da metodologia de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão naturalmente infectadas, pelo método ágar-bromofenol com modificações

De acordo com os dados da Tabela 8, não houve diferenças estatísticas entre os percentuais de incidência de *S. sclerotiorum*, pelos métodos de detecção comparados, tanto para as sementes de feijão quanto para as sementes de soja.

Segundo Napoleão et al. (2006), o método Neon-S foi comparado com os métodos de detecção de patógenos em sementes recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e em relação ao método do papel de filtro e rolo de papel. Segundo aqueles autores, o método de Neon-S foi mais rápido e eficiente, reduzindo o tempo de detecção de 37 dias para 12 dias.

TABELA 8 Percentual de incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja submetidas a diferentes métodos de detecção.

Tratamentos (métodos de detecção)	Hospedeiros	
	Feijão	Soja
Método padrão (papel de filtro – 30d)	1,5 a	1,0 a
Neon-S	1,5 a	0,0 a
Neon (manitol)	2,0 a	1,0 a
Neon (NaCl)	1,5 a	0,5 a
Neon (PEG)	0,0 a	0,0 a

As médias com mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) (Neon Manitol= -1.0MPa; Neon NaCl= -1.0MPa; Neon PEG= -0.5MPa).

Em relação ao período de incubação, fica evidente que os métodos nos quais são utilizados restritores hídricos são mais eficazes por reduzirem o tempo de incubação de 30 para 7 dias.

Embora o desempenho do método Neon-S (substrato com 2,4-D) tenha sido comparável com o método Neon modificado com restritores hídricos na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes das espécies estudadas, ele apresenta como uma das desvantagens o uso de 2,4-D, que constitui um risco não só à saúde dos operadores em laboratório, como pode ser contaminante para outros tipos de trabalhos envolvendo sementes.

4.6 Ensaio 6 - Comportamento de fungos comumente associados às sementes de feijão, soja e algodão em meio ágar-bromofenol (Neon), com restritores hídricos

A alteração da cor de azul para amarelo, do substrato agarizado do método de Neon, é fruto da redução do pH, devido à produção de ácidos por estes organismos, detectado por meio do indicador azul de bromofenol (Domsch et al., 1980; Steadman et al., 1994). Pelos resultados da Tabela 9, o comportamento de mudança de coloração foi semelhante entre os três restritores comparados neste estudo.

Entre os fungos testados, somente as espécies *Aspergillus niger* e uma de *Penicillium* sp. proporcionaram condições de mudança da coloração de azul para amarelo. Pela literatura, há variações entre os fungos, no que tange à produção de ácido (Domsch et al., 1980). Segundo Peres (1996), *Rhizopus stolonifer* e *Sclerotium rolfsii* são também capazes de mudar a coloração do substrato do método Neon.

Em termos práticos, a mudança de coloração do substrato do método Neon, por espécies dos gêneros *Aspergillus*, no caso *A. niger*, *Penicillium* e *Rhizopus*, não deve ser considerado um fator que compromete a eficácia desse

método para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de plantas hospedeiras, posto que as características morfológicas desses fungos são facilmente distinguidas das características apresentadas por *S. sclerotiorum*.

TABELA 9 Formação de halos amarelos (+ ou -) no substrato do meio Neon modificado com manitol, NaCl, PEG.

Espécies e isolados de fungos	Alteração (+ ou -) de coloração do substrato		
	Manitol	NaCl	PEG
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	-
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	-	-	-
<i>Colletotrichum gossypii</i>	-	-	-
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	-	-	-
<i>C. lindemuthianum</i>	-	-	-
<i>C. truncatum</i>	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
<i>Isariopsis griseola</i>	-	-	-
<i>Phomopsis sojae</i>	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	-
<i>Dreschlera</i> sp.	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. (1)	+	+	+
<i>Penicillium</i> spp. (2)	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. (3)	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. (4)	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (1)	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> (2)	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> (3)	+	+	+
<i>A. flavus</i> (1)	-	-	-
<i>A. flavus</i> (2)	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	-	-	-

5 CONCLUSÕES

- O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* não foi afetado na presença restritores hídricos, manitol, NaCl e PEG, em diferentes potenciais osmóticos, incorporados ao substrato do método ágar- bromofenol (Neon).
- A inibição de germinação de sementes de soja, feijão e algodão pode ser conseguido em níveis satisfatórios para uso em teste de sanidade de sementes, pelos restritores manitol e NaCl, em potenciais osmóticos de -1,0 MPa e PEG no potencial de -0,5 MPa.
- A metodologia de detecção semisseletiva de *S. sclerotiorum* pelo método de ágar-bromofenol (Neon padrão) com adição de restritor hídrico, manitol no potencial osmótico de -1,0 MPa, sob temperatura de 20°C e incubação na ausência de luz, por sete dias, revelou-se eficaz para a detecção do referido patógeno, em análises de sementes de rotina de laboratório.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os agentes fitopatogênicos às culturas do feijão, soja e algodão, *Sclerotinia sclerotiorum* pode ser considerado, atualmente, como o patógeno mais ameaçador aos cultivos dessas espécies, pela extensão e intensidade em que se encontra estabelecido nas áreas de plantio, com condições favoráveis ao seu desenvolvimento. O fato de produzir esporos na fase sexuada e estruturas de resistência, escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por longos períodos de tempo, torna o controle da doença em foco extremamente dificultado, principalmente por não se dispor de fontes de resistência genética para a mesma.

Os lotes de sementes, por conterem sementes portadoras do inóculo no seu interior e escleródios em mistura, exercem papel primordial na disseminação da doença, sendo, portanto, o uso de sementes certificadas e de procedência conhecida um fator fundamental no manejo neste caso. Em virtude disso, está sendo proposto, pelo Ministério da Agricultura, nível de tolerância zero para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, soja, algodão e girassol, não sendo tolerado nenhum escleródio na amostra de sementes submetidas para análise em laboratório.

Diante dessa realidade, questiona-se, do ponto de vista operacional, a disponibilidade de métodos de detecção desse fungo em sementes que sejam seguros e viáveis para a adoção pelos laboratórios de análises sanitárias existentes no país. No momento, os métodos disponíveis ainda apresentam dificuldades com relação ao tempo de realização do teste e a utilização de alguns ingredientes indesejáveis, havendo necessidade de aprimoramento.

A metodologia de detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão, em meados da década de 1990, baseada no uso de substrato

semisseletivo, pode ser considerada um avanço dos mais importantes em Patologia de Sementes.

A modificação desse método proposto posteriormente, no intuito de aplicá-lo em testes de sanidade, de que 2,4-D (forma ácida) faz parte, levanta sérios questionamentos em relação ao uso desse produto, por razões já conhecidas sobre as propriedades e os riscos de sua utilização em laboratório.

A alternativa do uso de restritores hídricos, em substituição ao 2,4-D, além de outros aspectos de simplificação da execução, conforme foi conseguido neste trabalho, pode ser considerada das mais importantes para a sua adoção em Programas de Certificação de Sementes de soja, algodão e feijão e, provavelmente, de outras espécies hospedeiras.

Sobre o uso de substrato de papel impregnado com os mesmos ingredientes do método Neon modificado com a incorporação de restritores hídricos, o que já havia sido investigado em trabalho anterior (Peres, 1996), percebe-se que, do ponto de vista econômico, ele é vantajoso e pode oferecer eficácia comparável à do substrato em que se utiliza ágar sólido no meio BDA. Neste caso, ressalta-se apenas a dificuldade de confirmação das colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* ao redor de sementes infectadas, pelo exame da placa com recurso da trans-iluminação.

Vale destacar também que a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de espécies hospedeiras por métodos moleculares, já em vias de estabelecimento, por meio de PCR, faz com que os resultados deste estudo tenham um significado maior, posto que o método biológico pode complementar os métodos moleculares, em casos em que estes proporcionam resultados positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, n.3, p.300-309, Mar. 1975.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of Sclerotinia species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.8, p.896-899, Aug. 1979.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic, 1997. 635p.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952p.
- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on *in vitro* growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.36, n.3, p.383-388, Apr. 1996.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J.Wiley, 1996. v.1, 488p.
- ANSARI, N.A.; KHAN, M.W.; MUHEET, A. Effect of some factors on growth and sporulation of *Alternaria brassicae* causing *Alternaria* blight of rapeseed and mustard. **Acta Botanica Indica**, Meerut, v.17, n.1, p.49-53, Jan. 1989.
- ANSELME, C.; CHAMPION, R. Bean anthracnose: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 45., 1981, Zurich. **Proceedings...** Zurich: ISTA, 1982. p.45.
- ASSIS, S.M.P. de; REIS, A.; SILVA, R.L.X.; MENEZES, M. Effect of carbon and nitrogen sources on mycelial growth, dry weight, sporulation and conidia size of *Fusarium solani*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.40, n.4, p.893-901, abr. 1997.
- ATALLAH, Z.K.; LARGET, B.; CHEN, X.; JOHNSON, D.A. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of out-crossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, n.3, p.737-742, July 2004.
- BELTRÃO, N.E.M. Algodão e agroenergia. **Cotton Business**, Pirassununga, v.3, n.1, p.26-28, abr. 2007.

BEVERSDORF, W.D.; HUME, D.J. Ex Rico23 white bean. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.61, n.4, p.1017-1018, Apr. 1981.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

BLAD, B.L.; STEADMAN, J.R.; WEISS, A. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v.68, n.10, p.1431-1437, Oct. 1978.

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

BOLKAN, H.A.; DIANESE, J.C.; SILVA, C.B. da; ARAÚJO, J.C.A. de. Influence of carbon source, light, water potencial and temperatura on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Revista de Microbiologia**, Brasília, v.13, n.3, p.264-271, mar. 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.40, p.10-11, mar. 2009a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009b. 399p.

BROWN, J.G.; BUTLER, K.D. Sclerotiniosis of lettuce in Arizona. **Arizona Agricultural Experiment Station Technology Bulletin**, College Station, v.63, p.475-506, 1936.

BRUNI, F.B.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmic glass formation in maize embryos. **Seed Science Research**, New York, v.2, n.4, p.251-253, 1992.

CARDOSO, J.E. Mofa branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.111-122. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 50).

- CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARVALHO, J.C.B.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.4, p.999-1005, jul./ago. 2001.
- CHARCHAR, M.J.A.; ANJOS, J.R.N. dos; OSSIPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1101-1106, jun. 1999.
- COCHRANE, V. **Physiology of fungi**. New York: J.Wiley, 1958. 524p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Série histórica de produtividade**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 21 jan. 2010.
- COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, n.3, p.250-255, 1975.
- COSTA, G.R.; COSTA, J.L.S. Efeito dos fungicidas procimidone e benomyl na formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: UNESP, 1998. p.51.
- COSTA, M.L.N. **Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica**. 2000. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.5, p.1023-1030, set./out. 2003.
- COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oriza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J. da C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; FERREIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-agua. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.127-135, mar./abr. 2001.

CUBETA, M.A.; CODY, B.R.; KOHLI, Y.; KOHN, L.M. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n.4, p.1000-1004, Apr. 1997.

DAVIS, W.H. Drop of Chinese cabbage and our common cabbage caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Masee (*Sclerotinia libertiana* Fckl). **Phytopathology**, Saint Paul, v.15, n.3, p.249-259, Mar. 1925.

DEACON, J.W. **Modern mycology**. 3.ed. Edinburgh: Blackwell Science, 1996. 293p.

DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, Camberra, v.69, n.2, p.167-171, 1992.

DEVI, R.K.T.; SINGH, N.I. Effect of temperature and light on growth and sporulation of *Fusarium* rice sheath rot. **International Rice Research Notes**, Manila, v.19, n.3, p.28-32, Mar. 1994.

DILLARD, H.R.; LUDWIG, J.W.; HUNTER, J.E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant disease**, Quebec, v.79, n.4, p.411-415, 1995.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic, 1980. v.1, 859p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Publicações técnico-científicas**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 21 jan. 2010.

FANCELLI, M.I.; KIMATI, H. Influence of culture media and fluorescent light on the sporulation of *Alternaria dauci*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.16, n.3/4, p.248-252, mar./abr. 1990.

FERRAZ, L.C.L.; CAFÉ FILHO, A.C.; NASSER, L.C.B.; AZEVEDO, J.A. Matéria orgânica, cobertura morta, e outros fatores que influenciam a formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos de cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 4., 1996, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA/CPAC, 1996. p.296-301.

FERREIRA, C.M.; PELOSO, M.J.D.; FARIA, L.C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio do Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002. 47p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO statistics**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 21 jan. 2010.

FRANCISCO NETO, E.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J.C. Influence of some factors on the mycelial growth, sporulation, and conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of passion fruit anthracnose. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.20, n.2, p.96-100, fev. 1994.

GERLAGH, M.; GEIJN, H.M.G. van de; FOKKEMA, N.J.; VEREIJKEN, P.F.G. Long-term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-infected crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, n.2, p.141-147, Feb. 1999.

GLASS, N.L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.34, p.165-186, 2000.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F. de A.; ANDRADE, P.J.M. Controle de fungos em sementes de soja (*Glycine max*) pelo tratamento com fungicidas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.21, n.3/4, p.239-244, 1995.

GROGAN, R.G.; ABAWI, G.S. The influence of water potential on the biology of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, n.2, p.122-128, Feb. 1974.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.).

Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis, 1998. v.2, p.131-151.

HUANG, H.C.; BREMER, E.; HYNES, R.K.; ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Amsterdam, v.18, n.3, p.270-276, July 2000.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.276-279, 2000.

KOHN, L.M.; STASOVSKI, E.; CARBONE, I.; ROYER, J.; ANDERSON, J.B. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, n.2, p.480-485, Feb. 1991.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.4, p.46-96.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. **Proceedings of International Seed Testing Association**, Wagenigen, v.33, n.3, p.343-513, 1968.

MACHADO, A.Q.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; CASSETARI NETO, D.; SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.408-414, set./out. 2007.

MACHADO, J.C. **Studies on some seed-borne diseases of zinnia, African marigold and soybean**. 1980. 187p. Thesis (Ph.D. in Plant Sciences)-University of Manchester, Manchester.

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

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, n.2, p.229-263, 1994.

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

MACHADO, J.C.; MATOS, C.S.M.; RIBEIRO, S.G.S.P.; ALVES, F.C.; BONARETTO, I.L.V. **Avaliação de tratamento de sementes de feijão com *Sclerotinia sclerotiorum***. Lavras: UFLA, 2008. 20p. Relatório técnico.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.23, n.2, p.95-101, 2001a.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M. das G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.26, n.1, p.62-67, 2004.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.23, n.2, p.88-94, 2001b.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.2, p.77-81, 2003.

MAGALHÃES, F.H.L. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

McDONALD JUNIOR, M.B.; VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts. **Crop Science**, Madison, v.28, n.6, p.993-997, Dec. 1988.

MCQUILKEN, M.P.; BUDGE, S.P.; WHIPPS, J.M. Production, survival and evaluation of liquid culture-produced inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.7, n.1, p.23-36, Jan. 1997.

MENEZES, J.R. Testes de sanidade de sementes de feijão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap.18, p.395-405.

MEXAL, J.; REID, C.P.P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.51, n.9, p.1579-1588, Sept. 1973.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, n.1, p.126-130, Jan./Feb. 1995.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C.; MENTEM, J.O.M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.2, n.2, p.167-171, jul. 1977.

MOEZEL, P.G. van der; BELL, D.T. The effect of salinity on the germination of some Western Australian Eucalyptus and Melaleuca species. **Seed Science & Technology**, Zürich, v.15, n.1, p.239-246, Jan. 1987.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L.; PASQUALLI, L.L. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.776-780, jul./ago. 2005.

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

NAPOLEÃO, R. Mofó-branco do feijoeiro irrigado no Cerrado. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa, MG: UFV, 2001. p.119-136.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ FILHO, A.C.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; SILVA, H.R. Intensidade do mofó-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, p.374-379, jul./ago. 2005.

NAPOLEÃO, R.; NASSER, B.L.C.; LOPES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.2, p.180-183, 2006.

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, p.309, 1999. Suplemento. Resumo.

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., 1995, Ilhéus. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. p.376.

NASSER, L.C.B.; SUTTON, J.C. Palhada de arroz pode controlar doença do feijoeiro irrigado. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cerrado: pesquisa e tecnologia**. Brasília, 1993. p.24-44.

NEERGARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1977. 839p.

NEERGARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. 839p.

NOONAN, M.P.; GLARE, T.R.; HARVEY, I.C.; SANDS, D.C. Genetic comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from New Zealand and USA. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 49., 1996, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: NZPP, 1996. p.126-131.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. 1991. 111f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, S.H.F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**, São Paulo, ano 2, n.4, maio/jun. 2005. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/ArtigosDetalhe.aspx?id=113>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

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 (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, 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**. 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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, Brasília, v.27, n.2, p.123-127, mar./abr. 2002.

PRATT, R.G.; ROWE, D.E. Differential responses of alfalfa genotypes to stem inoculations with *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. **Plant Disease**, Quebec, v.75, n.2, p.188-191, Feb. 1991.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.8, p.875-880, Aug. 1979.

RACHID, K.T.; SWANSON, J. **Seed treatment for the control of sclerotinia basal-stalk rot/wilt in sunflower**. Ottawa: Agriculture and Agri-Food Canada, 2008. 2p.

ROSSETTO, C.A.V.; NOVENBRE, A.D.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R.; NAKAGAWA, J. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.1/2, p.97-105, 1997.

ROTEM, J.; BLICKLE, W.; KRANZ, J. Effect of environment and host on sporulation of *Alternaria macrospora* in cotton. **Phytopathology**, Saint Paul, v.79, n.3, p.263-266, Mar. 1989.

SACCÁ, A.R. Algumas moléstias novas e outras pouco conhecidas da batatinha (*Solanum tuberosum*). **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo**, São Paulo, v.21, p.741-742, 1920.

SALUSTIANO, M.E.; MACHADO, J.C.; PITTIS, J.E. Comparação de dois métodos de sanidade na detecção de *Alternaria helianthi* em sementes de girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.322-323, jan./fev. 2006.

SCOTT, D.H.; SHANER, G.E.; ABNEY, T.S. **Sclerotinia stem rot (White Mold) of soybeans**. Disponível em:
<<http://www.agcom.purdue.edu/AgCom/Pubs/menu.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2010.

SEXTON, A.C.; WHITTEN, A.R.; HOWLETT, B.J. Populations structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in a Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. **Genome**, Ottawa, v.49, n.1, p.1408-1415, Mar. 2006.

- SILVA, S.M. **Metodologia de inoculação e comportamento de alguns cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary**. 1989. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1983. 51p.
- STARR, G.C.; WALTERS, H.J.; BRIDGMON, G.H. **White mold (*Sclerotinia*) of beans**. Laramie: Wyoming Agricultural Experiment Station, 1953. 11p. (Bulletin, 322).
- STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.8, p.904-907, Aug. 1979.
- STEADMAN, J.R. White mold: a serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, n.3, p.346-350, Mar. 1983.
- STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.16, n.2, p.68-70, June 1994.
- TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1314-1320, nov./dez. 2001.
- TRUTMANN, P.; KEANE, P.J.; MERRIMAN, P.R. Reduction of sclerotial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Coniothyrium minutans*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.12, n.5, p.461-465, Nov. 1980.
- TU, J.C. Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. **Physiological Plant Pathology**, London, v.26, n.1, p.111-117, Jan. 1985.
- UNGARO, M.R.G.; AZEVEDO, J.L. Growth and sporulation of *Alternaria alternata* under different cultural conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.1, p.75-82, jan. 1986.

VALE, F.X.R. do; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.): controle de doenças- doenças da parte aérea causadas por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas:** grandes culturas. Viçosa, MG: UFV, 1997. v.1, p.375-402.

VALE, F.X.R. do; JUNQUEIRA JUNIOR, W.C. de; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas.** Belo Horizonte: Perfil, 2004. 531p.

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

YORINORI, J.T. Avaliação de perdas. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Resultados de pesquisa de soja 1985/86.** Londrina, 1987. p.197-222. (EMBRAPA-CNPSO. Documento, 20).

YOUNG, P.A.; MORRIS, H.E. **Sclerotinia wilt of sunflowers.** Bozeman: Montana Agricultural Experiment Station, 1927. 32p. (Bulletin, 208).