



WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN

**MOFO-BRANCO EM ALGODÃO, GIRASSOL E
FEIJÃO: POTENCIAL DE TRANSMISSÃO E
EFEITOS NA QUALIDADE DE SEMENTES E
VARIABILIDADE DO PATÓGENO**

LAVRAS – MG

2014

WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN

**MOFO-BRANCO EM ALGODÃO, GIRASSOL E FEIJÃO: POTENCIAL
DE TRANSMISSÃO E EFEITOS NA QUALIDADE DE SEMENTES E
VARIABILIDADE DO PATÓGENO**

Tese 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 Doutor.

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Zancan, Willian Luis Antonio.

Mofo-branco em algodão, girassol e feijão : potencial de transmissão e efeitos na qualidade de sementes e variabilidade do patógeno / Willian Luis Antonio Zancan. – Lavras: UFLA, 2013.
125 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Sementes. 3. PCR convencional.
4. Microssatélite. 5. Algodão – Mofo-branco. 6. Girassol – Mofo-branco. 7. Feijão – Mofo-branco. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 632.43

WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN

**MOFO-BRANCO EM ALGODÃO, GIRASSOL E FEIJÃO: POTENCIAL
DE TRANSMISSÃO E EFEITOS NA QUALIDADE DE SEMENTES E
VARIABILIDADE DO PATÓGENO**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 22 de novembro de 2013.

Dr. Mario Lúcio Vilela Resende UFLA

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior EPAMIG

Dr. José da Cruz Machado

Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais, Luiz Antonio Zancan e Neuza Peretto Zancan, pela educação, paciência, confiança e ajuda nesta caminhada de fundamental importância em minha vida, incentivando-me a buscar vida nova durante estes anos e sempre proporcionando momentos agradáveis em sua companhia.

A minha irmã, Maria Cristina Zancan, pelo carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade e o privilégio de compartilhar tamanha experiência e que comigo esteve a cada dia, concedendo-me saúde, força e determinação.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade e suporte para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À minha namorada, Nayara Lima Baute, pelo carinho, amor e amizade durante minha presença e ausência no período de doutorado sanduíche. Agradeço também pelo auxílio e disposição na condução dos trabalhos.

Ao meu orientador, professor Dr. José da Cruz Machado, do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelo incentivo, ensinamentos, amizade, presteza e auxílio nas atividades e discussões, em todas as fases deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Chitarra e à Dra. Gilma Silva Chitarra, que sempre me encorajaram, motivaram e apoiaram, além da profunda amizade e incentivo em buscar novas oportunidades.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) da Universidade Federal de Lavras, em especial a Mirian Salgado, pelo auxílio na condução destes trabalhos.

Aos amigos Álvaro, Helon, Raul, Rodolpho e Vitor, pela amizade, ajuda e companheirismo.

Ao Dr. Nelson Dias Suassuna (Embrapa Algodão) e ao Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, pelos isolados cedidos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao professor Dr. Mario Sobral de Abreu, pela amizade, dedicação e ensinamentos.

A todos os colegas do DFP/UFLA, pela convivência e amizade.

I wish to express my sincere thanks to Dr. James R. Steadman, Rebecca Higgins e Rachana Jhala at Department of Plant Pathology from University of Nebraska – Lincoln, USA, for their supervision, assistance, attention and criticism to my daily research activities during the time of my sandwich doctorate.

OBRIGADO

Have the courage to follow your heart and intuition.
They somehow already know what you truly want
to become. Everything else is secondary.

- Steve Jobs

RESUMO GERAL

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno causador de doenças em várias espécies vegetais economicamente importantes em todo o mundo. A infecção das plantas pode ocorrer através do micélio e/ou de ascósporos produzidos pela germinação dos escleródios, ou a partir de micélio associado às sementes. Estes tipos de inóculo são responsáveis pela disseminação da doença a curtas e a longas distâncias, em áreas isentas do referido fungo. Neste trabalho, os objetivos foram avaliar os efeitos, transmissão potencial e detecção molecular, via PCR, de *S. sclerotiorum* a partir de sua interação com sementes de algodoeiro e girassol, e a variabilidade entre isolados deste fungo coletados em campos de feijoeiro. Em relação aos efeitos e à transmissão do fungo, foram utilizados quatro potenciais de inóculo, duas cultivares (algodoeiro e girassol) e duas temperaturas (20 e 25 °C). As variáveis analisadas foram: germinação, sanidade de sementes, índice de velocidade de emergência, estande inicial e final. Quanto à variabilidade, 25 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em campos de feijoeiro foram caracterizados por meio de marcadores microssatélites, grupos de compatibilidade micelial (GCMs), agressividade e sensibilidade a fungicida. Pelos resultados, houve correlação entre o nível do potencial de inóculo e as variáveis analisadas, independente da cultivar, do isolado fúngico e da temperatura. A maior taxa potencial de transmissão de *S. sclerotiorum* em sementes para plantas foi observada no maior potencial de inóculo (96 horas de contato das sementes com o fungo), atingindo níveis médios de 72% em girassol e 80,2% em algodoeiro. A detecção do fungo em sementes destas duas espécies pela técnica de PCR mostrou-se viável para esta finalidade, devendo ser ainda aferida para uso oficial. Dados de microssatélites agruparam os 25 isolados em quatro clusters e sete GCMs. Quanto à agressividade dentro e entre GCMs, houve diferenças significativas entre os isolados. O isolado mais agressivo na seleção para resistência será útil na identificação de maiores níveis de resistência em linhagens de feijão. Iprodiona inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* na concentração utilizada em campo de cultivo, enquanto piraclostrobina e metconazol permitiram o crescimento do fungo *in vitro*. Estes resultados demonstram a importância do inóculo micelial de *S. sclerotiorum*, tanto na disseminação do patógeno quanto como agente causador de danos nas espécies hospedeiras em condições de cultivo.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Efeitos. Transmissão. Sementes. Variabilidade. Resistência.

GENERAL ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a pathogen causing disease in several economically important plant species worldwide. The infection of plants may occur through the mycelium or ascospores produced by the germination of sclerotia or mycelia associated with seed. These types of inoculum are responsible for the spread of the fungus to short and long distances. In this work, the objectives were to evaluate the effects and potential transmission and molecular detection through conventional PCR of *S. sclerotiorum* on cotton and sunflower seeds and variability among isolates collected in bean fields. Regarding the effects and transmission of the fungus four inoculum potentials, two cultivars of each, cotton and sunflower and two temperatures (20 and 25 °C) were used in this research. The variables analyzed were: germination, seed health, emergence rate index, initial and final stands. In relation to variability, 25 isolates of *S. sclerotiorum* collected in bean fields were characterized by microsatellite markers, mycelial compatibility groups (MCGs), aggressiveness and sensitivity to fungicides. From the results, there was a correlation between the level of inoculum potential and the variables analyzed, regardless of cultivar, fungal isolate and temperature. The highest potential for transmission of *S. Sclerotiorum* on seeds to plants was observed at the highest potential inoculum (96 hours of fungus covering seeds) reaching mean levels of 72% and 80.2% in sunflower and cotton, respectively. The detection of the fungus on seeds of both species by conventional PCR was shown to be viable and should be further evaluated for official use in certification programs. Microsatellite data grouped the 25 isolates into four clusters and seven GCMs. As for aggressiveness within and among GCMs were no significant differences among the isolates. The most aggressive isolates in resistance screening will be helpful in the identification of higher levels of resistance in bean germplasm/lines. Iprodione inhibited the mycelial growth of *S. Sclerotium* at the concentration used in the field, whereas pyraclostrobin and metconazole allowed the growth of the fungus *in vitro*. These results demonstrate the importance of the mycelial inoculum of *S. sclerotiorum* both the spread of the pathogen as the causal agent of damage to the host species in cultivation condition.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Effects. Transmission. Seeds. Variability. Resistance.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Agronegócio do algodoeiro, do feijoeiro e do girassol no Brasil	14
2.2	Aspectos gerais do mofo-branco em algodoeiro, girassol e feijoeiro	15
2.2.1	Importância econômica da doença no Brasil	15
2.2.2	Sintomatologia da doença	17
2.2.3	Aspectos epidemiológicos da doença	18
2.2.4	Métodos de controle e relações de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com sementes de espécies hospedeiras	20
2.3	Variabilidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	23
2.4	Metodologias de detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de espécies suscetíveis	25
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	39
	ARTIGO 1 Infective potential and transmission of mycelial inoculum of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in cotton seeds under controlled conditions	39
	ARTIGO 2 Relationship between mycelial inoculum of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> and performance of sunflower seeds under controlled conditions	60
	ARTIGO 3 Genetic, aggressiveness and fungicide sensitivity variation among <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> dry bean isolates from Brazil fields	83
	ARTIGO 4 Viabilidade da detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de algodão e girassol, por meio da técnica de PCR convencional	109

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como mofo-branco ou podridão-de-esclerotínia, está entre os patógenos necrotróficos de plantas mais devastadores. O fungo tem ampla distribuição geográfica e mais de 400 espécies hospedeiras de plantas, causando severas perdas na produtividade em muitas culturas de importância agrônômica em todo o mundo (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999).

No Brasil, a doença vem acarretando grandes perdas na produtividade e na qualidade de grãos e pluma em culturas de grande expressão para o agronegócio brasileiro, tais como algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.).

S. sclerotiorum é um dos patógenos de solo mais destrutivos em áreas de cultivo dessas culturas, tanto pela frequência de ocorrência como pela extensão das perdas, atingindo níveis acima de 70% na cultura do feijoeiro e girassol. As condições favoráveis de ocorrência do patógeno são temperaturas amenas, em média 20 °C, e alta umidade relativa do ar, acima de 70% (LEITE, 2005).

Um dos principais meios de disseminação de patógenos na natureza têm sido as sementes. O patógeno pode estar presente e ser carregado internamente e/ou transportado através de frações impuras do lote de sementes, que podem conter fragmentos de micélio, corpos de frutificação e esporos de fungos, cistos ou galhas de nematoides, células e partículas bacterianas (BALARDIN et al., 2005; MACHADO, 2000).

A disseminação de *S. sclerotiorum* associado a sementes ocorre de duas maneiras: através dos escleródios (contaminação concomitante) e/ou infectando as sementes tanto internamente como externamente na forma de micélio. De acordo com Tu (1988), cada semente infectada pode produzir de três a seis escleródios, dessa forma aumentando o inóculo do solo. Steadmam (1983) observou que uma semente foi capaz de formar mais de um escleródio e este formar até 20 apotécios, os quais têm a capacidade de liberar, individualmente, dois milhões de ascósporos no ambiente.

A presença do fungo nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como redução do poder germinativo, do vigor, da população de plantas e, conseqüentemente, do rendimento (BOTELHO et al., 2013; ITO; TANAKA, 1993).

Dessa forma, uma das medidas para o controle do fungo reside no uso de sementes de boa qualidade sanitária, livres da presença de escleródios e de micélio nos seus tecidos, ou tratadas com fungicidas recomendados, evitando, dessa forma, a introdução do patógeno em áreas livres ou a reintrodução de isolados mais agressivos em áreas tradicionais (MACHADO, 2000; MEYER; CAMPOS, 2009; NEERGAARD, 1979).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agronegócio do algodoeiro, do feijoeiro e do girassol no Brasil

O agronegócio brasileiro vem se destacando mundialmente pelos elevados índices na produção e na produtividade das lavouras, impulsionando ainda mais o mercado mundial de grãos. O cenário global aponta para uma crescente demanda por produtos agropecuários, diante das mudanças de hábitos alimentares e da expansão do mundo emergente. Com foco na agricultura, dentre as culturas que impulsionam o agronegócio brasileiro, encontram-se o algodoeiro, o feijoeiro e o girassol.

A cultura do algodoeiro contribui significativamente para a economia do Brasil, porém, na safra 2012/2013 houve um recuo na área plantada de 35,8%, em comparação à safra anterior, caindo de 1.393,4 para 895,0 mil hectares. Estima-se que o índice nacional de produtividade média de algodão em caroço deverá alcançar 3.644 kg ha¹ (safra 2012/2013). Atualmente, a produção do algodão no Brasil ocorre, predominantemente, em três estados, Mato Grosso, Bahia e Goiás, havendo alguma expansão em outros estados. A liderança pertence ao estado de Mato Grosso que, no ano de 2011, foi responsável pela produção de 46,9% do algodão em pluma no Brasil, seguido por Bahia, com 31,8% e por Goiás, com 8,2%. As projeções para o algodão em pluma indicam produção de 2,24 milhões de toneladas, em 2021/2022, sabendo-se que, atualmente, a produção é de 1,50 milhão de toneladas. O consumo desse produto no Brasil é estimado apresentar um crescimento a uma taxa anual de 1,4%, nos próximos dez anos, alcançando um total de 1,1 milhão de toneladas consumidas em 2021/2022 (BRASIL, 2012; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTATECIMENTO - CONAB, 2013).

Segundo dados da CONAB (2013), a estimativa de área plantada de feijoeiro, na safra 2012/2013, no Brasil, foi de 3.061,2 hectares e a produtividade esperada, de 2.828,4 kg ha⁻¹, incluindo as três safras (das águas, da seca e irrigada). O Brasil ocupa o lugar de maior produtor mundial de feijoeiro, sendo o consumo médio anual de, aproximadamente, 4,0 milhões de toneladas. Nos últimos 13 anos, o Brasil tem importado uma média anual de 117 mil toneladas desse produto (BRASIL, 2012).

A cultura do girassol destaca-se como a quinta oleaginosa em produção de matéria-prima, ficando atrás somente das culturas da soja, da colza, do algodão e do amendoim. No Brasil, a área plantada de girassol, na safra 2012/2013, foi de 69,1 mil hectares e a produtividade, de 1.599 kg ha⁻¹, sendo a região centro-oeste (Mato Grosso e Goiás) responsável por 79% da produção (CONAB, 2013). O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), criado pela Lei n. 11.097/2005, determina que, a partir de 2013, será obrigatória a adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel consumido no Brasil. Para isso, serão necessários cerca de 2,5 bilhões de litros de biodiesel ao ano.

2.2 Aspectos gerais do mofo-branco em algodoeiro, girassol e feijoeiro

2.2.1 Importância econômica da doença no Brasil

O agente causal do mofo branco foi descrito, pela primeira vez, por Bary, em 1884 (PURDY, 1979). Contudo, o primeiro registro de sua ocorrência no Brasil foi em 1921, no estado de São Paulo, atacando a cultura da batata, sendo detectada em seguida, no ano de 1954, no estado do Rio Grande do Sul, infectando o feijoeiro (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2004). Na cultura do algodoeiro, este patógeno foi relatado na região de Paracatu, MG, em área plantada com

algodoeiro cultivar DeltaPine irrigado sob pivô central na safra de 1996 (CHARCHAR; ANJOS; OSSUPI, 1999).

De acordo com a classificação taxonômica, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (RUGGIERO et al., 2012), a qual inclui espécies que produzem ascos de cor marron, apotécios que surgem a partir de um estroma e escleródios associados à planta hospedeira (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). De acordo com Paula Júnior et al. (2004), as estruturas de resistência são de coloração negra, duras, relativamente grandes (até cerca de 1 cm de diâmetro ou comprimento, ou mesmo maiores) e de formato irregular.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (Sin. *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf e Dumont), agente causal do mofo-branco, é um dos mais devastadores patógenos de plantas. Estima-se que mais de 408 espécies vegetais sejam suscetíveis a este patógeno, pertencentes a 75 famílias e a 278 gêneros, incluindo culturas de grande importância econômica no agronegócio, como algodão, feijão, girassol, soja, tomate e batata (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; LEITE, 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2008).

As perdas anuais causadas por *S. sclerotiorum* no Brasil chegam a 50% na cultura do feijoeiro (CARNEIRO, 2009), podendo atingir níveis superiores. Em períodos chuvosos com temperaturas amenas, o fungo pode ocasionar perdas da ordem de 30% a 100% na cultura do feijoeiro (OLIVEIRA, 2005).

Na cultura do girassol no Canadá, Dorrel e Huang (1978) observaram reduções de até 70% no rendimento dos aquênios, devido à murcha por *S. sclerotiorum*, dependendo da fase de desenvolvimento da planta em que a doença ocorreu, enquanto Alvarez e Guerra (2003) verificaram danos de 9,5% a 32,5% para diferentes híbridos de girassol na região de Córdoba, Argentina. No Brasil, a incidência da doença no capítulo e na haste foi de 17,6% a 100%, em

regiões de clima frio no estado do Paraná, nos anos de 1996 a 1998 (LEITE, 2005). De acordo com Backes et al. (2008), houve redução de 66,8% no rendimento de aquênios em 12 cultivares de girassol semeadas em duas épocas diferentes, com período de 13 dias de diferença no planalto norte-catarinense.

Na cultura do algodoeiro, os danos na produtividade e na qualidade da fibra ocasionados por esta doença no Brasil ainda não são relatados na literatura. Porém, de acordo com informações de produtores e pesquisadores na área relacionada, estes danos são considerados baixos, quando comparados com a cultura do feijoeiro ou a do girassol.

2.2.2 Sintomatologia da doença

Os sintomas característicos da doença na cultura do algodoeiro são murchas, seguidas de necrose e podridão úmida da haste, do pecíolo, da folha e da maçã. No interior do capulho é possível observar micélio branco de aspecto cotonoso e escleródios escuros irregulares do patógeno (CHARCHAR; ANJOS; OSSUPI, 1999). No girassol, a podridão-branca é considerada a doença mais grave, podendo afetar a raiz, o colo, a haste e o capítulo. O nível de perda na produção depende do órgão afetado e do estágio da cultura. Quando a infecção ocorre no receptáculo floral, pode ocorrer até a queda do capítulo antes da colheita e, quando a infecção ocorre no capítulo, além de prejuízos na produtividade, há também prejuízos na qualidade do óleo (LEITE, 2005).

Geralmente, a infecção por *S. sclerotiorum* se inicia na junção do pecíolo com a haste, cerca de 10 a 15 cm do solo, em que flores, folhas e demais tecidos senescentes ficam retidos sob a temperatura amena e a alta umidade, condições que favorecem o fungo (OLIVEIRA, 2005).

De modo geral, os sintomas caracterizam-se por crescimento do micélio branco, com lesões inicialmente encharcadas que se espalham rapidamente para

haste, ramos e folhas e que, com o passar do tempo, adquirem coloração escura. Em poucos dias, parte do micélio transforma-se em uma massa negra, rígida, denominada de escleródios, composta por camadas distintas, ou seja, uma parede grossa rica em melanina, responsável pela coloração negra dos escleródios, uma parede fina e a medula branca (MICHHEREFF, 2009).

A invasão dos tecidos pelas hifas se dá pela secreção de ácido oxálico e enzima degradadoras de parece, como a poligalacturonase. O ácido oxálico atua como supressor da explosão oxidativa em plantas hospedeiras, desativando um dos mecanismos mais importantes de defesa de plantas a patógenos (CESSNA et al., 2000).

O ácido oxálico secretado pelo patógeno tem pH ácido, próximo de 4, o que favorece a degradação da parede celular nos tecidos infectados, pois maximiza a atividade de enzimas degradantes. Além disso, remove íons de cálcio ligados a pectinas, expondo as células hospedeiras às enzimas catabólicas do fungo (BATEMAN; BEER, 1965).

De acordo com Guimarães e Stotz (2004), o ácido oxálico causa sintomas de ressecamento foliar por perturbação das funções das células-guarda dos estômatos, responsáveis pela regulação osmótica, além de interferir no hormônio ABA, induzindo à abertura estomática.

2.2.3 Aspectos epidemiológicos da doença

Cerca de 90% do ciclo de vida do fungo *S. sclerotiorum* ocorre na forma de escleródio dormente, podendo permanecer viável no solo por mais de três anos (ADAMS; AYERS, 1979; COOK; STEADMAN; BOOSALIS, 1975). Alguns fatores influenciam a viabilidade dos escleródios, reduzindo o período de sobrevivência do fungo, incluindo a flutuação na umidade do solo (MILA; YANG, 2008), solos úmidos ou inundados com temperaturas superiores a 32 °C

(MATHERON; PORCHAS, 2005), profundidade de enterrio maior que 5 cm (COOK; STEADMAN; BOOSALIS, 1975; WU; SUBBARAO, 2008) e degradação microbiológica (ADAMS; AYERS, 1979).

Os escleródios do fungo apresentam duas formas de germinação: a miceliogênica, formando somente hifas e a carpogênica, produzindo apotécios e, conseqüentemente, ascósporos. Para que ocorra a germinação carpogênica, os escleródios devem receber luz suficiente e um período de frio, seguido do aumento da temperatura (25 °C) e condição de umidade (CLARKSON et al., 2007; HUANG; KOZUB, 1991; PHILLIPS, 1987). Os ascósporos são considerados os mais importantes meios de propagação do fungo, podendo ocorrer a disseminação dos escleródios por meio de solo contaminado (em equipamentos agrícolas e calçados), adubação com esterco de animais alimentados com restos de grãos infestadas, irrigação e sementes contaminadas, entre outros (MEYER; CAMPOS, 2009). Uma vez superado o período de dormência, o patógeno entra na fase saprofítica, marcada pela germinação miceliogênica de potencial epidêmico reduzido (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Segundo Huang e Chang (2003), a germinação miceliogênica do fungo ocorre em condições de temperatura em torno de 20 ± 2 °C e umidade relativa do ar acima de 90%.

Em condições de campo, *S. sclerotiorum* infecta os tecidos das plantas, primeiramente folhas e pecíolos, através do micélio ou de ascósporos resultantes da germinação miceliogênica ou carpogênica, respectivamente, do escleródio. No caso da germinação carpogênica, o fungo requer uma fonte exógena de energia para que os ascósporos infectem folhas, vagens e hastes. Adicionalmente, a infecção ocorre diretamente via cutícula, com a formação de apressórios, exceto quando a penetração ocorre via estômatos, em alguns hospedeiros (DOMASCH; GANS; ANDERSON, 1980; STEADMAN, 1983).

O elevado índice de reprodução, por meio da formação de escleródios com capacidade de sobreviver por longo período de tempo, torna estas estruturas de resistência um dos componentes centrais na epidemiologia desse patógeno.

2.2.4 Métodos de controle e relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de espécies hospedeiras

O controle do mofo-branco é dificultado pela ausência de genótipos resistentes e pela ampla gama de hospedeiros do patógeno, além da elevada capacidade deste patógeno em formar estruturas de resistência, os escleródios, que podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo na ausência de espécies suscetíveis (GROGRAN, 1979; PHILLIPS, 1989).

A tática mais adequada para controlar o patógeno é por meio da integração de várias medidas de manejo, como uso de sementes saudáveis, plantio precoce, preparo adequado do solo, rotação de cultura, formação de palhada, controle biológico com antagonistas, controle químico por meio do uso de fungicidas, espaçamentos maiores entre linhas e menor densidade de plantas. Embora sejam medidas que atuam na redução da severidade da doença, nem sempre o controle satisfatório é alcançado (MUELLER; DORRANCE; DERKSEN, 2002; STEADMAN, 1979).

A associação de microrganismos com sementes é de fundamental importância, devido aos danos que eles podem provocar às plantas oriundas delas, além de afetar a quantidade e a qualidade do produto final. Estruturas do patógeno presente nas sementes constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias e este inóculo pode ficar viável por longos períodos, mesmo em condições de armazenamento (MACHADO, 1988).

As sementes são importantes veículos de disseminação de *S. sclerotiorum*, seja por meio de escleródios em mistura no lote ou na forma de

micélio estabelecido nos tecidos internos. A contaminação de lotes de sementes com escleródios é particularmente preocupante no girassol, pela semelhança destas estruturas com sementes desta espécie de hospedeiro. Em algumas cultivares, sementes e escleródios do fungo apresentam o mesmo tamanho, forma e peso específico, o que dificulta a remoção deste inóculo durante a operação de limpeza (LEITE, 2005).

Uma das recomendações de controle mais importantes para doenças causadas por *S. sclerotiorum* é evitar a utilização de sementes contaminadas com escleródios que, uma vez depositados no sulco de semeadura, poderão favorecer a infecção pelo fungo. A análise da qualidade sanitária das sementes deve ser feita antes da implantação da cultura. O uso de sementes certificadas, de procedência conhecida e certificado fitossanitário de origem, é fundamental para evitar a introdução do patógeno em áreas de produção.

Para a soja, a separação dos escleródios pode ser feita durante o beneficiamento da semente, pelo emprego do separador espiral seguido da mesa de gravidade. Entretanto, para o girassol, essa remoção torna-se difícil (LEITE, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, as sementes infectadas exercem um papel muito importante como agentes de disseminação e de introdução da doença no campo. Entre as propostas de padrões de tolerância para alguns patógenos associados às sementes no Brasil, o padrão zero tem sido recomendado para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, girassol e algodão, pelo Ministério da Agricultura, segundo a Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009 (BRASIL, 2009a). Neste caso, a tolerância diz respeito à presença ou à ausência de escleródios em mistura com sementes na amostra submetida à análise sanitária pelo método visual (OLIVEIRA, 2005; PARISI et al., 2013).

Segundo Paula Júnior et al. (2008), a principal via de entrada de *S. sclerotiorum* em uma área isenta do mesmo é por meio das sementes, portanto,

Machado (2000) salienta a importância do tratamento com fungicidas, oferecendo garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos.

Além de controlar patógenos importantes transmitidos pelas sementes, o tratamento de sementes é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições edafoclimáticas durante a semeadura são desfavoráveis à germinação e à rápida emergência, deixando-as expostas por mais tempo a fungos habitantes do solo, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. (*A. flavus*), *Pythium* spp. e *S. sclerotiorum* (JULIATTI; VILELA, 2009; REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

O uso de sementes com elevada qualidade fisiológica e sanitária, ou dentro dos padrões de tolerância estabelecidos para as principais doenças, está entre as estratégias mais eficazes para diminuir a disseminação de patógenos. A comercialização de sementes não certificadas e/ou não recomendadas de uma região ou de um estado para outro tem sido um dos fatores responsáveis pela disseminação de patógenos como *S. sclerotiorum*. (PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006). De acordo com Machado (1988) e Neergaard (1979), o inóculo de fungos pode ser transportado via sementes, na forma de micélio e/ou esporos, mas a taxa de transmissão de patógenos, entre outros fatores, depende, fundamentalmente, da quantidade e da localização do inóculo nas sementes.

A transmissão de patógenos através de sementes deve ser avaliada sob dois aspectos gerais, uma vez que os danos são variáveis. O primeiro aspecto está relacionado ao campo de produção, restringindo seus efeitos à redução de rendimento, sem afetar a viabilidade das sementes, e o segundo, além de os patógenos reduzirem o rendimento, apresentam efeitos danosos sobre a semente, quando colonizam o embrião. Dessa forma, ocorrem reduções na porcentagem de germinação e vigor (CARVALHO, 1999). De acordo com Neergaard (1977), a morte de sementes e o tombamento, em função de patógenos transportados

pelas sementes, ocorrem, principalmente, sob condições desfavoráveis à emergência das plântulas.

Tu (1988) observou que sementes de feijão infectadas com *S. sclerotiorum*, quando semeadas, tiveram a germinação reduzida em média de 88% a 100%, e as plântulas oriundas dessas sementes frequentemente morreram nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura. As sementes que não apresentaram germinação foram deterioradas pelo fungo e de 3 a 6 escleródios se formaram no lugar de cada semente, servindo de fonte de inóculo.

Em trabalho conduzido por Botelho et al. (2013), sementes de feijão infectadas por *S. sclerotiorum*, em diferentes tempos de exposição à colônia do fungo, apresentaram reduções dos índices de germinação, o estande inicial e o final, e o índice de velocidade de emergência proporcional ao aumento do período de contato das sementes com o fungo. Araújo et al. (2006) observaram também redução no estande final de plantas de algodoeiro com diferentes níveis de infecção por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

2.3 Variabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

Estudos populacionais de *S. sclerotiorum* têm revelado um modo predominantemente clonal de reprodução deste fungo (CUBETA et al., 1997; KOHLI et al., 1995; KOHLI; KOHN, 1998), com algumas evidências de cruzamentos (ATALLAH et al., 2004; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; KOHLI; KOHN, 1998; SEXTON; HOWLETT, 2004). Relatos de variação genética de *S. sclerotiorum*, genotípica e fenotípica, têm variado, dependendo da localização e da cultura hospedeira na qual os isolados são coletados.

Clones de *S. sclerotiorum* podem ser identificados por marcadores, tais como DNA *fingerprinting*, grupos de compatibilidade micelial (GCM) ou microsátélites (AUCLAIR et al., 2004; CARBONE; ANDERSON; KOHN,

1999; HAMBLETON; WALKER; KOHN, 2002; KOHN et al., 1991; SIRJUSINGH; KOHN, 2001).

A técnica de grupos de compatibilidade micelial (GCMs) tem sido utilizada para determinar variabilidade em isolados de *S. sclerotiorum* em canola, couve-flor, repolho, soja e feijoeiro, nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia (CARPENTER; FRAMPTON; STEWART, 1999; CUBETA et al., 1997; DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2003; FORD et al., 1995; KOHLI et al., 1992; KOHN et al., 1991). Assim, a incompatibilidade micelial é uma falha no crescimento de diferentes isolados em formar uma única colônia e é caracterizada pela formação de células mortas e a redução de crescimento entre duas colônias de isolados.

Kull et al. (2004), em Illinois (Estados Unidos), identificaram 42 GCMs, em 299 isolados provenientes de campos de soja na Argentina e dois isolados de Illinois, EUA. A maioria dos GCMs foi representada por um único isolado, observado em um mesmo local de coleta.

Em estudo conduzido por Durman, Menendez e Godeas (2003), 140 isolados argentinos foram caracterizados em 50 diferentes GCM; 27 destes GCM consistiram em vários isolados. Apenas dois destes grupos de compatibilidade micelial foram compartilhados por isolados coletados de mais de uma cultura estudada (soja, alface e girassol); a maioria dos GCM foi única para cultura hospedeira.

Em ambientes que mudam continuamente, a coexistência de vários GCM estaria favorecida em detrimento de uma população clonal, porque os diferentes genótipos são favorecidos em diferentes ambientes (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2003; KOHLI et al., 1992). Também tem sido sugerido (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2003) que a reprodução sexual e a migração de genótipos entre campos podem ser importantes na manutenção de um nível elevado de variabilidade MCG.

Gomes et al. (2011) utilizaram 10 loco microssatélites para avaliar a diversidade e estrutura genética de 79 isolados de *S. sclerotiorum* em feijoeiro, no cerrado brasileiro. Dentre estes locos, oito foram polimórficos dentro das populações. Estes dados sugerem que o nível de fluxo gênico intrapopulacional é alto, proporcionando, assim, a oportunidade de disseminação de alelos raros, possivelmente incluindo aqueles que controlam determinadas características, tais como patogenicidade. Além disso, foi observado que o mofo-branco, na cultura do feijoeiro nas condições do cerrado brasileiro, é causado por populações geneticamente diversas de *S. sclerotiorum*, sendo este patógeno altamente variável dentro de pequenas áreas geográficas.

2.4 Metodologias de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de espécies suscetíveis

Em razão da comprovada associação de *S. sclerotiorum* com sementes de espécies suscetíveis à detecção deste patógeno em amostras de sementes, ela se torna de extrema importância, como parte de manejo da doença (BOTELHO et al., 2013; TU, 1988).

O diagnóstico deste patógeno de forma precisa, em sementes de espécies de importância agrícola, é imprescindível como suporte na implementação de limites de tolerância nos programas de certificação e quarentena, além da análise de vigor, germinação, determinação do potencial das sementes para armazenagem e a necessidade da utilização do tratamento químico de sementes (MACHADO, 1988; MAUDE, 1996).

Atualmente, existem diferentes métodos de detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, na repetibilidade, na economicidade e na rapidez na obtenção de resultados (GOULART, 2005; MACHADO, 2002). Os métodos utilizados em análise de rotina para detecção de *S. sclerotiorum*

baseiam-se em diferentes aspectos que variam desde análise visual da fração impura do lote de sementes, incubação em substrato de papel de filtro ou *blotter test*, incubação em rolo de papel, incubação em meio ágar-bromofenol (Neon) e, mais recentemente, técnicas moleculares.

De acordo com as Regras para Análise de Sementes no Brasil – (BRASIL, 2009b), o método de incubação em substrato de papel é recomendado para sementes das espécies de *Brassica oleracea*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*, consistindo na incubação das sementes à temperatura de 10 °C a 15 °C, por um período de 14 dias. Uma das dificuldades do método está no longo período de incubação necessário para a formação dos escleródios (KOCH; MENTEN, 2000) e o aparecimento de fungos fitopatogênicos e saprófitos de crescimento rápido, dificultando a identificação de *S. sclerotiorum* (HENNING, 2005). Além dessas dificuldades, ocorre a germinação das sementes, o que implica na necessidade do uso de um herbicida, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), produto tóxico ao ser humano (MACHADO et al., 2003).

O método de incubação em rolo de papel tem princípio semelhante ao do teste de germinação de sementes, porém, com a finalidade na detecção do micélio cotonoso nas sementes analisadas, com a formação de escleródios após incubação a 20 ±2 °C, na ausência de luz por sete dias, podendo haver prolongamento deste período. Este método é utilizado para sementes de soja e de feijão (BRASIL, 2009b) e apresenta, como uma desvantagem, a dificuldade em separar as sementes infectadas das sadias, o que pode superestimar a incidência do patógeno em foco (PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006; PERES, 1996).

O método de incubação em meio ágar-bromofenol (Neon), desenvolvido inicialmente por Peres, Nasser e Machado (2002), consiste no uso de um substrato de ágar sólido (batata dextrose ágar, BDA), juntamente com o azul de bromofenol (indicador de pH) e um antibiótico (sulfato de estreptomicina),

obtendo-se um meio de coloração azul e que, devido à liberação de ácido oxálico pelo fungo, torna-se de coloração amarela (BRASIL, 2009b; PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGE, 1994). O tempo de incubação das sementes para detecção da presença do fungo *S. sclerotiorum* ocorre em um curto intervalo de tempo, cinco a oito dias, quando comparado com o dos demais métodos tradicionais, seja o *Blotter test* ou o rolo de papel.

Os métodos moleculares baseados na técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) têm sido investigados para a detecção de diferentes patógenos em sementes cujas propriedades morfológicas são muito próximas (MBOFUNG; PRYOR, 2010). A reação de PCR baseia-se no anelamento e na extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Freeman et al. (2002) desenvolveram *primers* específicos a partir da região ribossômica intergênica ITS (*internal transcribed spacer*), utilizando a técnica de PCR convencional para distinção de *S. sclerotiorum* de outros fungos. Os *primers* descritos pelos autores estão sendo utilizados com sucesso na detecção de *S. sclerotiorum* em algumas espécies de plantas.

Estas técnicas mostram-se promissoras para este fim, já que apresentam alta sensibilidade e especificidade (JACCOUD et al., 2002), além de apresentarem a vantagem de avaliação de um grande número de amostras em curto espaço de tempo, podendo ser utilizadas dentro de programas de certificação.

Apesar da grande sensibilidade da técnica de PCR convencional, trabalhos envolvendo a diagnose de patógenos associados a sementes encontram dificuldades na detecção de patógenos, quando estão com baixos níveis de infestação (KONSTANTINOVA et al., 2002). Para contornar o problema, é

recomendável o uso da BIO-PCR, cujo objetivo é enriquecer a biomassa do fungo na semente e, assim, proporcionar o aumento da sensibilidade da técnica (PRYOR; GILBERTSON, 2000).

REFERÊNCIAS

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 896-899, 1979.

ALVAREZ, D.; GUERRA, G. Evaluación de los recursos genéticos de girasol por podredumbre basal *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESO ASOCIACIÓN ARGENTINA DE GIRASOL, 1., 2003, Balcarce. **Anales...** Balcarce: ASAGIR, 2003. 1 CD-ROM.

ARAÚJO, D. V. et al. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 35-40, jan./fev. 2006.

ATALLAH, Z. K. et al. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 737-742, July 2004.

AUCLAIR, J. et al. Genetic interaction between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 8, p. 891-895, Aug. 2004.

BACKES, R. L. et al. Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no Planalto Norte Catarinense. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 9, n. 1, p. 41-48, 2008.

BALARDIN, C. R. et al. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.

BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, p. 204-211, 1965.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 93-108, Feb. 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-16, Feb. 2006.

BOTELHO, L. S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 153-160, Feb. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 47, de 26 de fevereiro de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 40, p. 10-11, 2 mar. 2009a. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19496>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Brasília, 2012. 50 p.

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

CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, Lancaster, v. 53, n. 1, p. 11-21, Feb. 1999.

CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e uso de retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 27, p. 13-21, Mar. 1999.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CESSNA, S. G. et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 11, p. 2191-2199, Nov. 2000.

CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, 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.

CLARKSON, J. P. et al. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: a predictive model for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 5, p. 621-631, May 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, 12º levantamento**. Brasília, 2013. 30 p.

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, p. 250-255, 1975.

CUBETA, M. A. et al. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 10, p. 1000-1004, Oct. 1997.

DOMASCH, K. H.; GANS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic, 1980. 859 p.

DORREL, D. G.; HUANG, H. C. Influence of sclerotinia wilt on seed yield and quality of sunflower wilted at different stages of development. **Crop Science Society of America**, Madison, v. 18, p. 974-976, 1978.

DURMAN, S. B.; MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. M. Mycelial compatibility groups in Buenos Aires field populations of *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, n. 4, p. 421-427, July 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja: Paraná 2005, sistema de produção**. Londrina, 2004. 224 p.

FORD, E. J. et al. Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 2, p. 241-247, Feb. 1995.

FREEMAN, J. et al. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p. 877-886, July 2002.

GOMES, E. V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 2, p. 94-99, 2011.

GOULART, A. C. P. Doenças iniciais do algodoeiro: identificação e controle. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 425-449.

GROGAN, R. G. *Sclerotinia* species: summary and comments on needed research. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 908-910, 1979.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 3703-3711, 2004.

HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L. M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, n. 3, p. 309-315, Apr. 2002.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. 128 p.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2. ed. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 52 p.

HUANG, H. C.; CHANG, C. Effect of relative humidity on myceliogenic germination of Sclerotia of *Sclerotinia minor*. **Plant Pathology Bulletin**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 65-68, Jan. 2003.

HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Temperature requirements for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 32, n. 4, p. 279-286, May 1991.

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

JACCOUD FILHO, D. S. et al. Demonstration of the use of molecular techniques for detection of *Phomopsis* species in soya bean seeds. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. (Ed.). **Seed-borne fungi: o contribution to routine seed health analysis**. Zurich: International Seed Testing Association, 2002. p. 92-110.

JULIATTI, F. C.; VILELA, F. K. J. Eficiência do (tiofanato metílico + fluazinam 350+52.5) (certeza) no tratamento de sementes de algodão visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2009. p. 1055-1060.

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.

KOHLI, Y. et al. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 69-77, 1995.

KOHLI, Y. et al. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 8, p. 875-880, 1992.

KOHLI, Y.; KOHN, L. M. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, n. 2, p. 139-149, 1998.

KOHN, L. M. et al. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic-variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 480-485, Dec. 1991.

KONSTANTINOVA, P. et al. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 23-33, Jan. 2002.

KULL, L. S. et al. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 4, p. 325-332, Apr. 2004.

LEITE, R. M. V. B. de C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: EMBRAPA/CNPSO, 2005. 3 p. (Circular Técnica, 76).

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

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

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

MACHADO, J. C. et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 77-81, fev. 2003.

MATHERON, M. E.; PORCHAS, M. Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. **Plant Disease**, Quebec, v. 89, n. 1, p. 50-54, Jan. 2005.

MAUDE, R. B. Detection of seedborne organisms. In: _____. **Seedborne disease and their control: principles e practice**. Wallingford: CAB International, 1996. p. 210-228.

MBOFUNG, G. C.; PRYOR, B. M. A PCR-Based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 7, p. 860-866, 2010.

MEYER, M.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Revista Cultivar**, Pelotas, n. 120, p. 16-18, 2009.

MICHEREFF, S. J. **Doenças causam sérios prejuízos na safra de feijão em Pernambuco**. Recife: UFRPE, 2009. Disponível em: <http://www.ufrpe.br/artigo_ver.php?idConteudo=1251>. Acesso em: 10 out. 2013.

MILA, A. L.; YANG, X. B. Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Quebec, v. 92, n. 1, p. 78-82, Jan. 2008.

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

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan, 1977. 2 v.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan, 1979. 1191 p.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, maio/jun. 2005.

PARISI, J. J. D. et al. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, pelo método do rolo de germinação modificado**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/sementes/index.htm>. Acesso em: 31 out. 2013.

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

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. **Cultura do feijão**. Belo Horizonte: EPAMIG/CTZM, 2004. 52 p.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. **Manejo do mofo branco do feijoeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 4 p. (Circular Técnica, 13).

PERES, A. P. **Deteção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill: desenvolvimento de metodologia**. 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

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.

PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 279-283, 1987.

PHILLIPS, A. J. L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 21, p. 135-139, 1989.

PRYOR, B. M.; GILBERTSON, R. L. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 1, p. 18-23, Jan. 2001.

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

REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas**: guia para o controle químico de doenças de plantas. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2007. 153 p.

RUGGIERO, M. et al. The catalogue of life taxonomic classification. In: SPECIES 2000 & it is catalogue of life. 3rd ed. Leiden: Reading, 2012. Disponível em: <<http://www.sp2000.org/>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, New York, v. 46, n. 6, p. 357-365, Dec. 2004.

SIRJUSINGH, C.; KOHN, L. M. Characterization of microsattelites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 267-269, 2001.

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

STEADMAN, J. R. White mold: a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, n. 2, p. 346-350, 1983.

STEADMAN, J. R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-seletive medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 68-70, Jan. 1994.

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

WU, B. M.; SUBBARAO, K. V. Effects of soil temperature, moisture, and burial depths on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 10, p. 1144-1152, Oct. 2008.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Infective potential and transmission of mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotton seeds under controlled conditions

**Prepared in accordance to Bioscience Journal
(Preliminary version)**

Willian Luis Antonio Zancan, José da Cruz Machado

Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras, P.O. Box 3037,
Lavras 37200-000, MG, Brazil

Running title: Performance of cotton seeds infected by *Sclerotinia*

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum has wide distribution and several host species, causing severe losses in economically important crops. One of the main vehicles for dissemination of that pathogen is through infested or infected seeds by means of sclerotia and dormant mycelium. The aim in this study was to evaluate the effects of the association of *S. sclerotiorum* on cotton seeds and the rate of potential transmission of the fungus from seeds to plants. Four inoculum potentials (P1, P2, P3 and P4), two cotton cultivars (Delta Penta and Delta Opal) and two environmental temperatures (20 and 25 °C) were used. The variables analyzed were: germination, seed heath, emergence rate index, initial and final stands. Increasing the inoculum potential on cotton seeds provided gradual reduction in germination, emergence rate index and plant population. The highest transmission rates of *S. sclerotiorum* of cotton seeds to seedlings/plants were observed in the inoculum potential (P4), 75.6 and 84.9% in the cultivar Delta Penta and Delta Opal, respectively, at temperature of 20 °C, which is the most favorable condition for the fungal development. These results indicate the high risk of using cotton seeds infected by *S. sclerotiorum* as they may spread the inoculum of this pathogen, which is also quite damaging to initial plant development.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, white mold, inoculum potential, seeds

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum tem uma ampla distribuição e diversas plantas hospedeiras, causando severas perdas em culturas economicamente importantes. Um dos principais veículos de disseminação do patógeno é por meio das sementes na forma de escleródio e micélio dormente. O objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos da associação de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e a taxa potencial de transmissão do fungo de sementes para plantas. Neste estudo foram utilizados quatro potenciais de inóculo (P1, P2, P3 e P4), duas cultivares de algodoeiro ('Delta Penta' e 'Delta Opal') e duas temperaturas de crescimento (20 e 25 °C). As variáveis analisadas foram: germinação, sanidade de sementes, índice de velocidade de emergência, estande inicial e final. O aumento do potencial de inóculo em sementes de algodoeiro proporcionou uma redução gradual na germinação, No índice de velocidade de emergência e na população de plantas. A maior taxa de transmissão de *S. sclerotiorum* em sementes para plântulas foi observada no potencial de inóculo P4, em média, 75,6% e 84,9%, nas cultivares Delta Penta e Delta Opal, respectivamente, na temperatura de 20 °C, mais favorável para o desenvolvimento do fungo. Estes resultados indicam o risco do uso de sementes de algodoeiro infectadas por *S. sclerotiorum* na forma de disseminação do inóculo deste patógeno e a doença no campo é um importante fator de redução na produtividade em ambiente favorável para o desenvolvimento.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, mofo branco, potencial de inóculo, sementes

INTRODUCTION

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, causal agent of white mold on cotton (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) is one of the most important pathogen in several plants. The fungus has a wide geographic distribution and is able to attack over 400 plants species, causing severe yield losses (Bolton et al., 2006; Hartman et al., 1999; Boland & Hall, 1994).

In Brazil, *S. sclerotiorum* was first reported on cotton in the northwest region of Minas Gerais State in central pivot area (Charchar et al., 1999). Currently, the disease has been found in the region where the cotton is being cultivated, in both irrigated and dryland areas (Chitarra, 2007). In regions where cotton is cultivated over 600 meters (altitude) and high precipitation and temperatures between 20 to 25 °C is therefore of high risk for producers of that crop.

Regarding the interaction of *S. sclerotiorum* with cotton seeds, the observation of sclerotia and dormant mycelium of the fungus within cotton bolls, as reported by Charchar et al., (1999) and farmers located in different areas in Brazil provides evidence about the close relationship between that pathogen and cotton seeds.

According to literature is well known that the association of *S. sclerotiorum* with seeds is a big concern in practice due to the damage that it may cause to the developing plant in the field and the role of infected seeds as primary source of inoculum in future plantation of susceptible species. Infected seeds and sclerotia stand as important primary inoculum for the development of epidemics (Machado, 1988).

Management of *Sclerotinia* diseases is complex in practice because the wide range of hosts of this pathogen and its high capacity to produce different kind of inoculum

The use of seeds with high physiological and health quality is an important strategy to manage that disease. For obtaining seeds with high health quality is necessary to understand about infection, dissemination and transmission of pathogen from seeds in addition to several other epidemiological aspects which interfere in the development of the disease.

Based on the current status of knowledge on the relation between *S. sclerotiorum* and cotton seeds this study was proposed, having therefore as objectives: to evaluate the potential effects of that pathogen from infected seeds on the early stage development of cotton and to determine its potential transmission rates from mycelial infected seeds to the emerging plants under controlled growing conditions.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining and multiplication of fungal isolate

The isolate of *S. sclerotiorum* used in this study was obtained from cotton seeds, collected in the municipality of Campo Verde, State of Mato Grosso, MT (CMLAPS 246) belonging to the mycological collection of the Seed Pathology Laboratory of the Federal University of Lavras. The isolate was grown initially on PDA media plates and incubated at 20 ± 2 °C, with a photoperiod of 12 hours for five days.

Seed inoculation procedures

Seeds of two cotton cultivars, Delta Opal and Delta Penta, were disinfested with sodium hypochlorite 1% for 30 seconds, rinsed in distilled water and then dried in a laminar flow hood, on germitest paper for 48 hours. The inoculation was performed by water restriction technique developed by Costa et al. (2003) and Machado et al. (2012). By that technique, PDA substrate amended with mannitol, at osmotic potential of -1.0 MPa adjusted by software MPPS (Michel and Radcliffe, 1995) was poured into Petri dishes of 15 cm diameter, 20 mL per dish. Mycelial plugs of *S. sclerotiorum* isolate were placed on the media and then kept in an incubation chamber at 20 °C and photoperiod of 12 hours for five days. On the top of the fungal colonies disinfested seeds were distributed in a single layer, making sure the contact between seeds and the fungal mycelium. The plates were then transferred to incubation chamber at 20 °C for the periods: 0 (P0), 24 (P1), 48 (P2), 72 (P3) and 96 (P4) hours; each period standing for different inoculum potentials. A control was prepared for each incubation period using the seed substrate with mannitol in water in the absence of *S. sclerotiorum*.

Assessing the quality of cotton seeds infected by *Sclerotinia sclerotiorum* in different levels of inoculum potential

The health condition and physiological quality of the infected and non infected seeds were evaluated according to protocols described in literature (Brazil, 2009a). The seed health test consisted in incubation of seeds on a semi selective-bromophenol agar substrate (NEON), as described by Nasser et al., 1999; Peres et al., 2002; Napoleão et al., 2006. The medium was composed by 39 g/L of Difco potato dextrose agar, 150 mg/L of bromofenol and 5 mL/L of 2,4D (2,4-dichlorophenoxy) and a total of 200 seeds were used for the control and for each inoculum potential. The seed plates were distributed in a plant growth chamber at 20 °C with photoperiods of 12 h a day. At the third and fifth days of incubation, the seeds were examined for the formation of yellow-red halos around them, which is an indicative of the presence of *S. sclerotiorum* in seeds. The plates were also analyzed in stereo microscope for growth of mycelium and presence of sclerotia of that fungus (Brazil, 2009a).

Standard germination test was run by the roll paper method (Brazil, 2009b) in which 200 seeds per treatment were used with incubation of seeds in a germination cabinet with temperature adjusted to 25 ± 2 °C. Evaluation were made on the fourth and twelfth days, according to the Rules for Seed Analysis (Brazil, 2009b).

To evaluate the emergence speed index, initial and final stands, seeds were sown in 300 mL plastic cups containing a 2:1 mixture of sand compost (Tropstrato HA Hortaliças) three times autoclaved. For each cultivar, one hundred inoculated seeds and one hundred of non inoculated seeds were sowed, each seed being planted in single plastic cups of 300 mL, which were placed together in polyethylene boxes in a total of four boxes per cultivar and inoculum potential. The experiment was conducted in a growth rooms at 20 and 25 ° C. The rate of seedling emergence was determined by daily counts of seedlings to

the stabilization of plant population. The ratio of emergence rate was calculated according to the formula described by Maguire (1962). The initial and final stands were evaluated 12 and 25 days after sowing (DAS).

Determination of potential transmission rate of *Sclerotinia sclerotiorum* from cotton seeds to plants

The total transmission rate was estimated by the sum of the number of seeds/seedlings killed in pre-emergence as the result of the pathogen action plus the number of emerged plants with symptomatic and asymptomatic infection (Baker and Smith, 1966; Bergstrom and Shah, 2000). Plants were considered symptomatic when presenting wilt followed by necrosis or damping-off. In V3 growth stage (20 DAS), one of the cotyledons of each plant was collected and, at 25 DAS, each plant was sectioned in three parts (cotyledon/stem insertion, apex and root crown). The evaluation was carried out by the destructive method, collecting the four fragments, 1.5 cm size, of each plant. All sections were disinfested in 70% alcohol, 1% sodium hypochlorite and then in sterile distilled water for 1 min. After drying on paper towels, fragments of the same plant were distributed on semi-selective agar bromophenol (Neon) medium in Petri dishes and kept in an incubation at 20 °C for seven days. After this period, the occurrence of mycelial growth from each plant was observed basing on the color change of the substrate and, whenever necessary, fungal structures were checked in microscopy at 80X magnification. The transmission of the pathogen to the emerged plant and dead non emerged seedlings/plants was considered positive when at least one fragment of the symptomatic or asymptomatic plant presented mycelial growth of *S. sclerotiorum*.

Experimental design

The experimental design for standard germination and seed health tests was completely randomized treatments with four replicates in a total of 200 seeds for each cultivar and inoculum potential. A control treatment was considered using mannitol to the variable standard germination.

In the specific case of the seed health test, transmission rate to plants with symptomatic infection and total transmission rate, there was no infection in the inoculum potential P0 (no contact with the fungus colony) and the treatment with mannitol (control), because there was absence of fungus on the seeds, there was no incidence and transmission of seeds to seedlings.

For emergence speed index, initial and final stands were used 25 seeds for each cultivar (Delta Opal and Delta Penta), control (mannitol) and each inoculum potential and temperature (20 and 25 °C) were used in a total of 100 seeds per treatment. The experimental design was complete randomized treatments with four replicates.

Data analysis

Analysis was conducted in factorial schedule considering: temperatures (20 and 25 °C), inoculum potentials (P0, P1, P2, P3 and P4), isolates (I1 – mannitol e I2 - CMLAPS 246 – *S. sclerotiorum*) within of each cultivar (Delta Opal and Delta Penta) using the R program. Data were analyzed using nonlinear regression test and P-value less than 0.05 was considered significant. The graphics were made using the Sigma Plot 12.1 program (Systat Software Inc.).

RESULTS

Both cultivars used in this study, Delta Opal and Delta Penta, presented initial germination of 99.5% and 98.5%, respectively and from the health test the seeds used were free from *Sclerotinia sclerotiorum*.

The seed germination was reduced after contact of seeds with the fungus colony and with the substrate containing only mannitol, which was used to inhibit seed germination during the inoculation period. Variance occurred only in the inoculum potential for each cultivar ($P \leq 0.0001$) (Fig. 1A). The reduction in germination rate for the cultivar Delta Opal was 6%, while in the cultivar Delta Penta that reduction was 11% both at the highest inoculum potential (P4 – 96 hours), compared with initial germination in the absence of *S. sclerotiorum*.

A variable and gradual increase was observed in the incidence of *Sclerotinia* infection proportional to the inoculum potential of the pathogen (Fig. 1B). In the cultivar Delta Opal that increase varied from 15.8 to 70.2%, while in the Delta Penta the variation was 14.9 to 88.6%, in both cases following the increase of the inoculum potential.

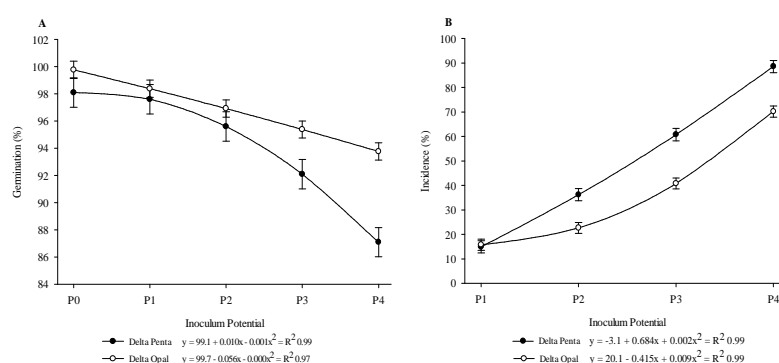


Figure 1 A) Percentage seed germination in cotton infected by *S. sclerotiorum* in different inoculum seed potentials (P0 – 0, P1 – 24, P2 – 48, P3 – 72 and P4 –

96 hours) of the fungus and **B**) incidence of *S. sclerotiorum* in cotton seeds infected at different inoculum potentials.

For the variables, emergence rate index (vigor), initial and final stands, variations were observed among temperatures, isolates and inoculum potentials for each cultivar (Fig. 2, 3 and 4). The highest values of emergence rate index (vigor) were observed on the potential P1, this value decreasing with the increase of the inoculum potential, following the same trend as observed with cultivars and temperatures (Fig. 2A and B).

For seeds submitted to different periods of contact with mannitol (water restrictor) in the absence of *S. sclerotiorum*, reductions were observed in the physiologic quality of seeds, but in smaller proportion in comparison with inoculated seeds. The highest reductions of vigor in the presence of fungus were observed in the cultivar Delta Opal at temperature 20 °C.

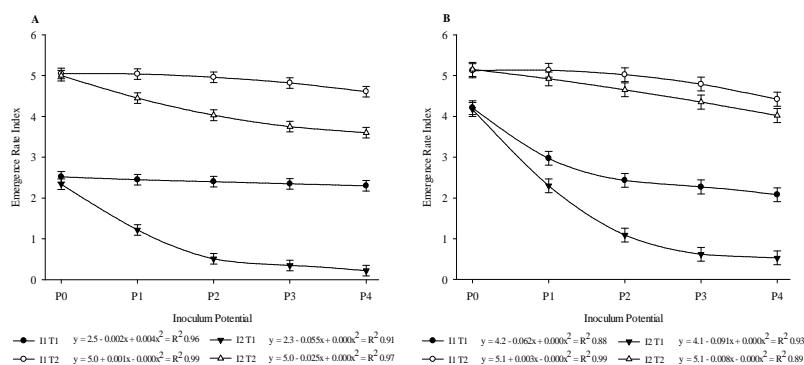


Figure 2 Emergence rate index of seeds of the cultivars: Delta Penta (A) and Delta Opal (B) inoculated with *S. sclerotiorum* and non inoculated but submitted to mannitol (water restrictor) in the absence of the fungus under temperatures of 20 °C and 25 °C in a growth room with different levels of inoculum potential (P0 – 0, P1 - 24, P2 - 48, P3 – 72 and P4 – 96 hours). II - Manitol, I2 - Isolate of *S. sclerotiorum*, T1 - temperature of 20 °C and T2 - temperature of 25 °C.

In relation to the initial stand, a drastic reduction was observed in the plant population for each cultivar ($P < 0.001$). At the highest inoculum potential,

the population reductions caused by *S. sclerotiorum* (I2) were 76.4 and 71.2% in the cultivar Delta Penta and Delta Opal, respectively, at temperature of 20 °C. At temperature of 25 °C the reduction was 24.4% and 6.1% in the cultivar Delta Penta and Delta Opal, respectively, which is less expressive when compared with the temperature of 20 °C (Fig. 3A and B).

Regarding the effect of the water restrictor, it was verified also a decline in the percentage of initial stand, proportional to the increase of the periods of time of contact between seeds and the water restrictor. In average the reductions were 10% and 6% in the cultivar Delta Penta and Delta Opal, respectively for both temperatures used. However, the declining slope in that case was not significant in comparison with the reduction verified when *S. sclerotiorum* was present in the agar substrate.

These results show that the presence of *S. sclerotiorum* in association with cotton seeds may cause severe reduction in pre and post-emergence of plants, reducing the plant population in the field.

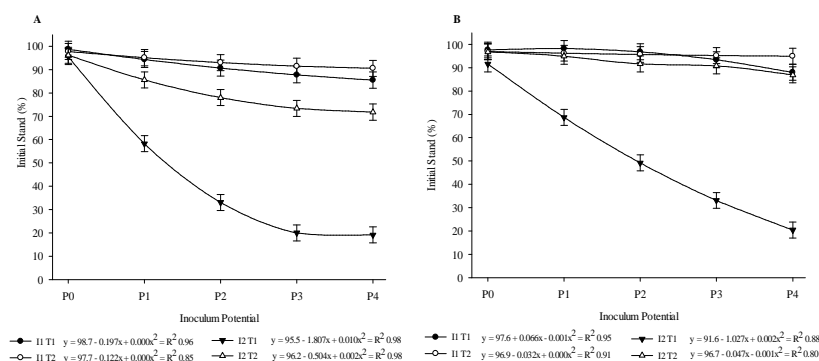


Figure 3 Initial Stand (%) of the cultivars: Delta Penta (A) and Delta Opal (B) inoculated with *S. sclerotiorum* and non inoculated but submitted to mannitol (water restrictor) in the absence of the fungus under temperatures of 20 °C and 25 °C in a growth room with different levels of inoculum potential (P0 – 0, P1 - 24, P2 - 48, P3 – 72 and P4 –

96 hours). I1 - Mannitol, I2 - Isolate of *S. sclerotiorum*, T1 - temperature of 20 °C and T2 - temperature of 25 °C.

The statistical analysis of the final stand data, evaluated 25 days after sowing (DAS), revealed an interaction among inoculum potentials, temperatures and isolates for each cultivar ($P \leq 0.001$) (Fig. 4A and B, 5 and 6). The highest reduction of plants population was observed at temperature of 20 °C, in average 88% and 74% of both cultivars Delta Penta and Delta Opal, respectively, at the highest inoculum potential. Less reduction in plant population was observed at temperature of 25 °C, in average 37.6 and 30.5% in both cultivars.

In the absence of *S.sclerotiorum* in the agar substrate amended with mannitol the highest values of reduction in population occurred at the higher osmotic potential. The highest reduction in the cultivar Delta Penta at temperature of 20 °C was 10.8%, while the smallest reduction was 4%, observed in the Delta Opal cultivar at 25 °C.

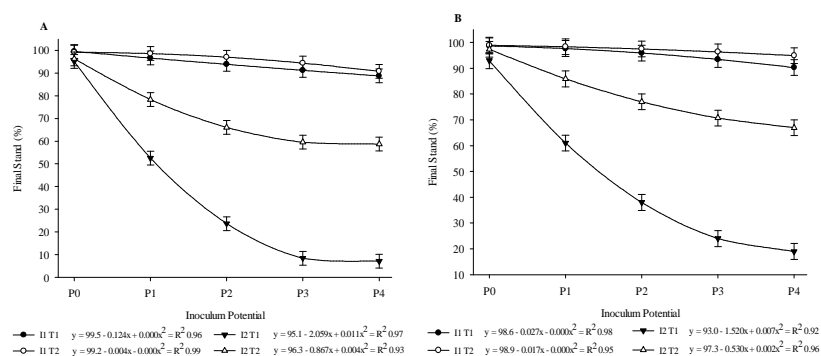


Figure 4 Final stand (%) of the cultivars: Delta Penta (A) and Delta Opal (B) inoculated with *S. sclerotiorum* and non inoculated but submitted to mannitol (water restrictor) in the absence of the fungus under temperatures of 20 °C and 25 °C in a growth room with different levels of inoculum potential (P0 – 0, P1 - 24, P2 - 48, P3 – 72 and P4 –

96 hours). I1 - Manitol, I2 - Isolate of *S. sclerotiorum*, T1 - temperature of 20 °C and T2 - temperature of 25 °C.

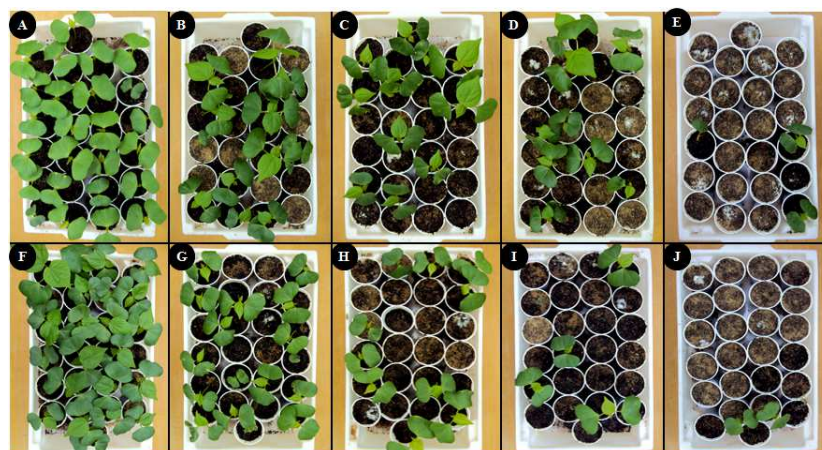


Figure 5 Final stands of cultivars Delta Opal in relation to inoculum potentials at temperature of 20°C. **Top trays:** referring to cultivar Delta Opal and inoculum potentials: P1 (B), P2 (C), P3 (D), P4 (E). **Bottom trays:** referring to Cultivar Delta Penta and inoculum potentials: P1 (G), P2 (H), P3 (I) and P4 (J). Trays A and F referring to the control.

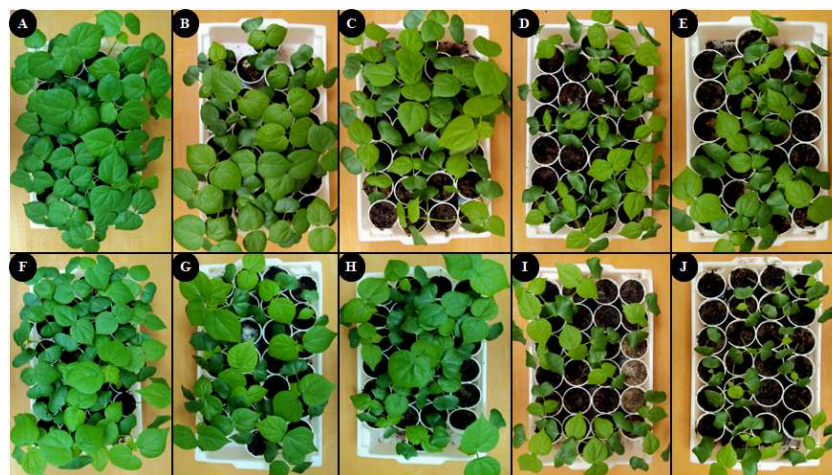


Figure 6 Final stands of cultivars of cotton Delta Opal in relation to inoculum potentials at growing temperature of 25°C. **Top trays:** referring to cultivar Delta Opal and inoculum potentials: P1 (B), P2 (C), P3 (D),

P4 (E). **Bottom trays:** referring to Cultivar Delta Penta and inoculum potentials: P1 (G), P2 (H), P3 (I) and P4 (J). Trays A and F referring to the control.

The transmission process of *S. sclerotiorum* based on assessment of symptomatic plants revealed a variation between temperature and inoculum potential of each cultivar ($P \leq 0.01$). For the cultivar Delta Opal the transmission rate varied from 25,8 (P1) to 51,3% (P4), while in the cultivar Delta Penta the variation was 11,4 (P1) to 36,6% (P4), both cases presenting a proportional increase of the inoculum potential at temperature of 20 °C (Fig. 7A).

At temperature of 25°C, the variation of the transmission rate of *S. sclerotiorum* was less pronounced in comparison with rates at 20 °C, the values being of 11.2% (P1) to 17.8% (P4) in the cultivar Delta Opal and 11,9 (P1) to 22,1% (P4) in the Delta Penta. For both cultivars and temperatures typical symptoms of the disease, wilting followed by necrosis and mycelial growth on plants, were observed.

The transmission of the pathogen from seeds to asymptomatic plants was not observed in this study as demonstrated by the normal isolation procedures and confirmed by semi-selective agar bromophenol (Neon).

The total transmission rates of *S. sclerotiorum* in this work according to inoculum potential and temperature for each cultivar ($P \leq 0.0046$). The lowest percentages of transmission rates were observed at temperature of 25 °C with values ranging from 15.9% (P1) to 29.1% (P4) in the cultivar Delta Opal and 26.8% (P1) to 34.3% (P4) in the cultivar Delta Penta.

At 20 °C the highest rates of total transmission were observed in the cultivar Delta Penta with an average of 54.1% (P1) to 84.9% (P4), with a proportional and sharp increase (Fig. 7B). In the cultivar Delta Opal that variation was smaller, although the highest transmission rates had been of 49.3 (P1) to 75.6% (P4).

It is interesting to note that the lowest rates of total transmission of *S. sclerotiorum* from seed to seedlings/plants were observed in the lowest inoculum potential of this pathogen.

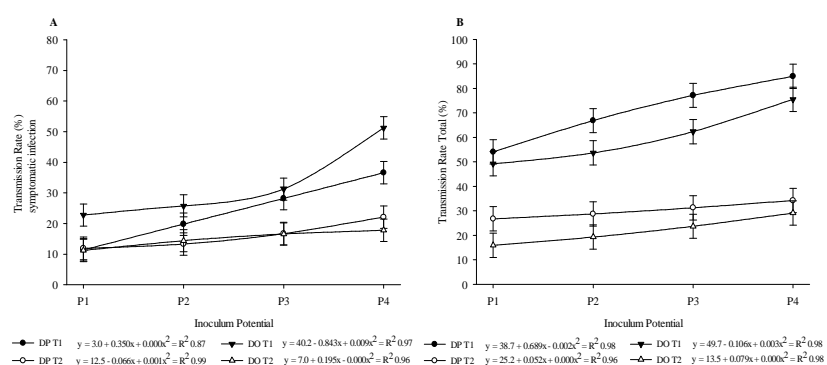


Figure 7 Values of transmission rate of symptomatic infection (A) and transmission rate total (B) of isolate of *S. sclerotiorum* by cotton seeds (cultivars Delta Penta and Delta Opal) cultivated in growth chamber with temperature controlled (20 °C and 25 °C) and inoculum potential (P1 - 24, P2 - 48, P3 - 72 and P4 - 96 hours). DP - Delta Penta, DO - Delta Opal, T1 - temperature of 20 °C and T2 - temperature of 25 °C.

DISCUSSION

The presence of mycelium inoculum of *S. sclerotiorum* in artificially inoculated seeds of cotton was found to be extremely damaging to the initial development of cotton plants under favorable conditions for the disease. Germination and vigor of infected seeds may be affected at variable intensities, being reduced to levels close to 100%. Considering that *S. sclerotiorum* is a soil-borne pathogen which is able to survive in fields for many years that kind of resting inoculum has an important role in the cycle of the disease in several susceptible crops.

Although a small number of temperatures and cotton genotypes had been used in this study, following a epidemiology model established for such kind of investigation in Seed Pathology (Machado and Pozza, 2005), it was clear that inoculum potential of the pathogen associated to seeds as dormant mycelium is able to reduce to a great extent the seed performance.

At the lowest level of inoculum potential of *S. sclerotiorum* the mean values of germination of seeds were of 97.5%. The more drastic reduction caused by the fungus was 11% at highest inoculum potential. Under the most favorable temperature for the disease, 20°C, the reductions in the emergence rate index provided by the pathogen varied from 3.2 (at inoculum potential P1) to 0.4 (at potential of P4), whereas at 25 °C, the reductions were 5 (P1) to 3.8 (P4) for both cultivars Delta Opal and Delta Penta. In literature, no quantification has been reported as to the effect of *S. sclerotiorum* inoculum from cotton seeds. Information on seed performance has been reported by Tu (1988) and Botelho et al. (2013) for common bean.

The drastic reduction of the initial and final stands of cotton evaluated at 12 and 25 days after sowing, as the result of the use of infected seeds shows that

mycelium inoculum of *S. sclerotiorum* is another potential factor reducing plant population in the field. Those effects were even more severe at 20 °C, in which reductions of 73.8% and 81% in both initial and final stands, respectively, for both cotton cultivars were registered. Machado et al. (2001) and Botelho et al. (2013) had also indicated that mycelium infection by *S. sclerotiorum* in soybean and bean seeds was able to cause high reduction levels in the emergence rate index and initial and final stands under controlled conditions.

The results on the potential seed transmissibility of *S. sclerotiorum* in cotton point clearly the high risk of using infected cotton seeds by farmers, once the presence of the pathogen in the seed is able to infect tissues of the emerged plants and to cause damages in the growing field. Transmission of the pathogen was demonstrated and quantified in the two cultivars and in all inoculum potentials under both temperatures, 20 °C and 25 °C used.

Regarding the transmission rate of the pathogen from infected seeds, it was observed that even in the lower inoculum potential of *S. sclerotiorum* transmission rate was high. In the lowest inoculum potential (P1) at temperature of 20 °C the transmission rate of *S. sclerotiorum* was 51.7%, while in the highest inoculum potential (P4) the transmission rate was 80.3%.

At temperature of 25 °C, transmission rate of *S. sclerotiorum* was 21.4% (P1) and 31.7% (P4) for both cultivars Delta Opal and Delta Penta. Investigation conducted by Tu (1988) on white mold in beans had shown that *S. sclerotiorum* was able to survive in infected seeds as dormant mycelium in testa and cotyledons.

An interesting point to consider in this study was the results of the examination of asymptomatic emerged plants from inoculated seeds. In that case *S. sclerotiorum* was not recovered from any of the examined plant fragments. In terms of diagnosis and management of this disease, that fact is quite relevant as asymptomatic plants in other pathosystems may be infected by their pathogens

and that may be the cause of serious and negative consequences for growers (Oren et al., 2003; Vallad et al., 2005).

Based on the results of this study, it turns out that the presence of *S. sclerotiorum* in the seed tissues as dormant mycelium represents a high risk for cotton growers as this pathogen may be transmitted to the emerged plants and may cause severe damages to seed performance and to plant population establishment in the field.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) for the support in the development of this work.

REFERENCES

- ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CARVALHO, E. M.; CELANO, F. A. O. Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 147-151, 2006.
- BAKER, K. F.; SMITH, S. H.; Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, v 4, p. 311-332, 1966.
- BERGSTROM, G. C.; SHAH, D. A. Temperature dependent seed transmission of *Stagonospora nodorum* in wheat. *European Journal Plant Pathol*, v. 106, p. 837-842, 2000.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 93-108, Feb. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 11, n. 1, p. 1-16, Feb. 2006.

BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. M. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Seed Science*, v 35, p. 153-160, 2013.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de análise sanitária de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, p. 200, 2009a.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras de análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS Brasília, DF, p. 399, 2009b.

CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n. 6, 1999.

CHITARRA, L. G. Mofo Branco em Algodoeiro. Campina Grande, PB, 2007 (Comunicado Técnico, 336).

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARAES, 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.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J.C. Compendium of Soybean Diseases, 4th edn. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, USA, 1999.

MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; COSTA, M. L. N.; GUIMARAES, R. M.; MACHADO, C. F. Uso da técnica de restrição hídrica ou “condicionamento osmótico” em patologia de sementes. In: Wilmar C. da Luz (Org.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, RS: RAPP, v. 20, pp. 37-63, 2012.

MACHADO, J.C.; POZZA, E.A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). *Sementes: qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV, 2005. pp. 375-398.

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

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

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr., 1962.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, Madison, v.87, n.1, p.131-136, Jan./Feb., 1995.

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

NASSER, L. C. B.; ARANCIBIA, R. C.; NAPOLEAO, 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.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a Green Fluorescent Protein-Expressing transgenic isolate. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, p. 1695-1701, 2003.

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, p. 123-127, 2002.

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

VALLAD, G. E.; BHAT, R. G.; KOIKE, S. T.; RYDER, E. J.; SUBBARAO, K. V. Weedborne reservoirs and seed transmission of *Verticillium dahliae* in lettuce. *Plant Disease*, v. 89, p. 317-324, 2005.

ARTIGO 2

**Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and
performance of sunflower seeds under controlled conditions**

**Prepared in accordance to Tropical Plant Pathology
(Submitted)**

Willian Luis Antonio Zancan, José da Cruz Machado, Bruno Figueiredo Moretti
de Souza

Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras, P.O. Box 3037,
Lavras 37200-000, MG, Brazil

Running title: Performance of sunflower seeds infected by *Sclerotinia*

ABSTRACT

The cultivated area of sunflower in Brazil is expanding considerably over the last years as the result of the great interest in the biodiesel production derived from that crop. One consequence of that expansion is the occurrence of several diseases some of devastating nature in part of the growing areas with sunflower. The objective in this study was to evaluate the effects of the association of *Sclerotinia sclerotiorum* with sunflower seeds and transmission of this pathogen from infected seeds, considering some factors which may interfere in that interaction. Four inoculum potentials of two isolates of the fungus, two sunflower cultivars, Helio 250 and Helio 253 and two environmental temperatures, 20 and 25 °C, were used for the purpose in this work. Seed germination and health, emergence speed index, and plant populations were variables analyzed. From the results, increased levels of inoculum potentials led to gradual reduction of the mean values of germination, emergence rate index and plant populations, regardless the genotype, fungal isolates and temperatures. Transmission rates were higher at the highest levels of inoculum potential, the maximum reaching 80 %. These results show the significance of *S. sclerotiorum* inoculum associated with sunflower seeds both in the establishment of plant in fields and also in spreading the pathogen inoculum between crop fields.

keywords: *Helianthus annuus*, physiologic conditioning, sunflower, transmission, white mold

RESUMO

A área cultivada de girassol no Brasil tem se expandido consideravelmente, nos últimos anos, como resultado do elevado interesse na produção de biodiesel. Em consequência do crescimento da cultura, é a ocorrência de várias doenças que vem devastando as áreas de girassol. O estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da associação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de girassol e a transmissão do patógeno a partir das sementes infectadas, considerando os fatores que podem interferir nesta interação. Foram utilizados, neste trabalho, quatro potenciais de inóculo de dois isolados de fungo, duas cultivares de girassol, 'Helio 250' e 'Helio 253', e duas temperaturas de crescimento, 20 °C e 25 °C. Sanidade e germinação das sementes, índice de velocidade de emergência e população de plantas foram as variáveis analisadas. A partir dos resultados, o aumento do nível do potencial de inóculo levou a uma redução gradual nos valores de germinação, índice de velocidade de emergência e população de plantas, independente da cultivar, do isolado fúngico e da temperatura. As maiores taxas de transmissão foram observadas nos mais elevados níveis de potencial de inóculo, atingindo níveis próximos de 80%. Estes resultados demonstram a importância do inóculo de *S. sclerotiorum* associado com sementes de girassol, ambos na disseminação do inóculo do patógeno e como causa de danos em condições de campo.

Palavras-chave: *Helianthus annuus*, condicionamento fisiológico, transmissão, mofo branco.

INTRODUCTION

Helianthus annuus L. is susceptible to several diseases and among them white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is one of the most devastating around the world. This disease is distributed worldwide and its causal agent may cause infection to several other crops. Over 408 species and 278 genera of plants have been reported host that pathogen (Boland and Hall, 1994), which may survive in soil for several years as resting structures, sclerotia. Those structures are able to infect plants through myceliogenic and carpogenic processes (Bolton et al., 2006).

Infected seeds play an important role in the cycle of white mold of sunflower as primary inoculum source in the field and for spreading the disease to long distances. Due to its parasitic and survival nature, *S. sclerotiorum* is considered a pest of high risk in Brazil, being considered as a non quarantine regulated pest in certification seed programs of soybean, dry bean, cotton and sunflower. In those cases the presence of *S. sclerotiorum* in association with seeds, either as sclerotia or internal mycelium is not acceptable.

From previous studies conducted by Tu (1988) *S. sclerotiorum* is known to be able to survive in infected bean seeds as dormant mycelia in testa and cotyledons for 3 years or longer and when infected seeds were sown, 88-100% failed to germinate. Seedlings from infected seeds subsequently died from white mold at an early stage and the seeds that failed to germinate were rotted by the pathogen and three to six sclerotia were formed in place from each seed.

Nevertheless, only a few reports are found in literature giving information on the importance of *S. sclerotiorum* mycelia in seeds of different hosts, including sunflower. Therefore, the interaction between that pathogen and

seeds of sunflower remains little understood and it should be demonstrated and quantified on scientific basis.

Quantification of losses caused by white mold in sunflower crop is little known from literature. However it is well known from sunflower growers that such disease is able to reduce yield to a large extent, being a serious threat in a large area in Brazil where this crop is explored.

The aims in this study were to quantify the effects of *S. sclerotiorum* from infected seeds on sunflower early stage development and to determine the potential transmission rates of *S. sclerotiorum* from mycelial infected seeds under controlled growing conditions.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining and multiplication of fungal isolates

The two isolates of *S. sclerotiorum* used in this study were obtained from sunflower seeds, collected in the municipalities of Lavras, State of Minas Gerais MG (CMLAPS 250) and Montividiu – State of Goiás (CMLAPS 423), both belonging to the mycological collection of the Seed Pathology Laboratory of the Federal University of Lavras. The isolates were grown initially on PDA media plates and incubated at 20 ± 2 °C, with a photoperiod of 12 hours for five days.

Seed inoculation procedures

Seeds of two sunflower cultivars, 'Helio 250' (C1) and 'Helio 253' (C2), were disinfested with sodium hypochlorite 1% for 30 seconds, rinsed in distilled water and then left to dry for 48 hours in a laminar flow hood, on germitest paper. The seed inoculation was done by the osmotic technique developed by Costa et al. (2003) and Machado et al. (2012). By that technique, PDA substrate modified osmotically by the solute mannitol, at water potential of -1.4 MPa adjusted by software MPPS (Michel and Radcliffe, 1995) was poured to Petri dishes of 15 cm diameter. Mycelial plugs of *S. sclerotiorum* isolates were placed on the media and then kept in an incubation chamber at 20 °C and photoperiod of 12 hours for five days. On the top of the fungal colonies disinfested seeds were distributed in a single layer, making sure all seeds were placed in contact with the fungal mycelium. The dishes were then transferred to incubation chamber at 20 °C for the periods: 24h (P1), 48h (P2), 72h (P3) and 96h (P4) hours, each period standing for one inoculum potential of the pathogen. A

control was prepared for each incubation period using the same seed substrate with mannitol in the absence of *S. sclerotiorum*.

Assessing the quality of sunflower seeds infected by *Sclerotinia sclerotiorum* in different levels of inoculum potential

The health condition and physiological performance of the infected and non infected seeds were evaluated according to protocols described in Brazil (2009b). The seed health test consisted in incubation of seeds on a semi selective-bromophenol agar substrate (NEON), as described in literature (Nasser et al., 1999; Peres et al., 2002; Napoleão et al., 2006), using a total of 200 seeds of control and inoculated seeds for each inoculum potential. The plates were distributed in incubation chamber at 20 °C. At the third and fifth days of incubation, the seeds were examined for the formation of yellow-red halos around seeds, which is an indication of the presence of *S. sclerotiorum* in seeds. The plates were also analyzed in stereo microscope for mycelium growth and presence of sclerotia of that fungus (Brazil, 2009b).

Standard germination test was run by the roll paper method (Brazil, 2009b) in which 200 seeds per treatment were used with incubation of seeds in germination cabinet with temperature adjusted to 25 ± 2 °C. Evaluation was made on the fifth and ninth day, according to the Rules for Seed Analysis (Brazil, 2009a).

To evaluate the emergence speed index, initial and final stands, seeds were sown in 300 mL plastic cups containing a 2:1 mixture of sand and substrate (Tropstrato HA Hortaliças). For each cultivar, 100 inoculated seeds and 100 of non inoculated seeds were sown, each seed being planted in single plastic cups, of 300 mL which were placed together in polyethylene boxes for a total of four boxes per cultivar and inoculum potential. The experiment was conducted in a growth rooms at 20 and 25 °C. The rate of seedling/plant emergence was determined by daily counts of seedlings to the stabilization of plant population.

The ratio of emergence rate was calculated according to formula described by Maguire (1962).

Determination of potential transmission rate of *Sclerotinia sclerotiorum* from sunflower seeds to plants

The total transmission rate was estimated by the sum of the number of seeds/seedlings killed in pre-emergence as the result of the pathogen action plus the number of emerged plants with symptomatic infection and asymptomatic disease (Baker and Smith, 1966; Bergstrom and Shah, 2000). Plants were considered symptomatic when presenting wilt followed by necrosis or damping-off. In V3 growth stage (15 days after sowing – DAS), one of the cotyledons of each plant was collected and, at 25 DAS, each plant was sectioned in three parts (cotyledon/stem insertion, apex and root crown). The evaluation was carried out by the destructive method, collecting the four fragments, 1.5 cm size, of each plant. All sections were disinfested in 70% alcohol sodium hypochlorite and 1% sterile distilled water for 1 min. After drying on paper towels, fragments of the same plant were distributed on semi-selective agar bromophenol (Neon) medium in Petri dishes and kept in an incubation at 20 ° C for seven days. After this period, the occurrence of mycelial growth from each plant was observed by the color change of the substrate and, when necessary, fungal structures were confirmed with the aid of light microscopy at 80X magnification. The transmission of the pathogen to the emerged plant and dead non emerged seedlings was considered positive when at least one fragment of the symptomatic or asymptomatic plant presented mycelial growth of *S. sclerotiorum*.

Data analysis

For germination and incidence were used 50 seeds for each cultivar, isolate and inoculum potential, in a total of 200 seeds per treatment. For

emergence speed index, initial and final stands 25 seeds for each cultivar, isolate, mannitol and inoculum potential in a total of 100 seeds per treatment were used. The experimental design was complete randomized with four replications. Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed by R statistical software v 2.15.1. Data were analyzed using Tukey test and P-value less than 0.05 was considered significant. Analysis was conducted in double factorial among cultivars and isolates (I 250, I 423 and mannitol) x inoculum potential (P1, P2, P3 and P4) in each temperature (20 and 25 °C). The graphics were prepared using the Sigma Plot 12.1 program (Systat Software Inc.).

RESULTS

Relationship between inoculum potential and quality of sunflower seeds infected by *S. sclerotiorum*

The initial germination percentages of sunflower seeds of the cultivars used in this study, Helio 250 and Helio 253 were 98% and 93%, respectively. From the seed health test presence natural incidence of *S. sclerotiorum* was not found in the seed lots used.

Infected seeds by the two isolates of *S. sclerotiorum* presented in this work reductions in the variable germination according to the inoculum potentials used (Figure 1A). For one cultivar, Helio 250, the reduction was of 25% and 76.5% in relation to both isolates, CMLAPS 423 and CMLAPS 250, respectively. The reduction of that variable was even higher (73%) for the cultivar Helio 253, for both isolates compared to the control.

Regarding the effect of the water restrictor used to inhibit seed germination during the inoculation of seeds in agar substrate in the absence of the pathogen, there was also a decline in the percentage of seed germination, proportional to the increase of the periods of time of contact between seeds and water restrictor in agar substrate. But the declining slope was not significant in comparison with the reduction observed when *S. sclerotiorum* was present in the agar substrate.

The incidence of *S. sclerotiorum* in sunflower seeds, as provided by the health testing, was correlated with inoculum potential of the fungus used for both cultivars and fungal isolates (Figure 1B). In relation to cultivars, it was observed a similar reaction to *S. sclerotiorum* isolates with a gradual increase in the incidence of infection, reaching 100% at the highest level of inoculum potential (P4).

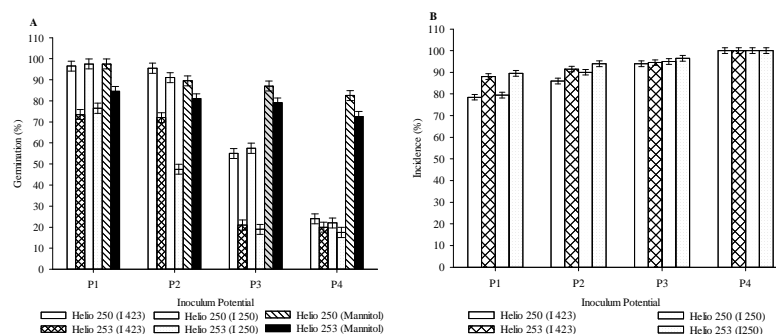


Figure 1 A) Percentage seed germination in sunflower infected by *S. sclerotiorum* in different inoculum potentials (P1, P2, P3, P4) of the fungus and B) incidence of *S. sclerotiorum* in sunflower seeds infected at different inoculum potentials. Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; overlapping bars indicate lack of significant difference.

For the variables: emergence rate index, initial and final stands, variations were observed in the factors analyzed at different levels of seed infection (Figures 2, 3 and 4). The highest values of vigor (emergence rate index) were observed on the potential P1, this value decreasing with increasing inoculum potential, with similar trends regarding cultivars, isolates and temperature (Figure 2 – A and B). For sunflower seeds submitted to different periods of contact with the water restrictor in the absence of the pathogen, reductions were observed in the seed performance, but in smaller proportions compared to the treatments evaluated in the presence of the fungus.

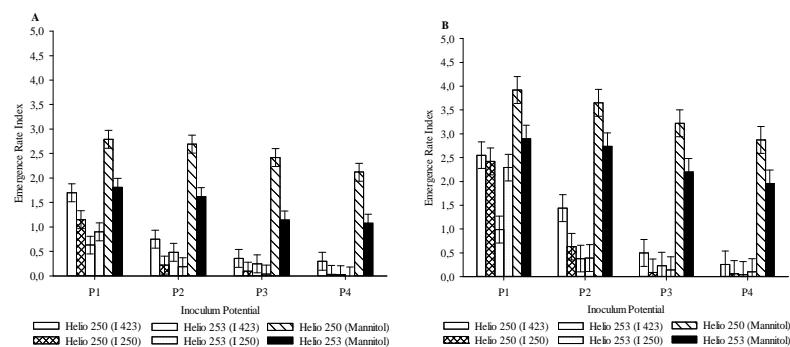


Figure 2 Emergence rate index of sunflower seeds, cultivars: Helio 250 and Helio 253 inoculated with two isolates of *S. sclerotiorum* (CMLAPS 250 and CMLAPS 423) in contact with the water restrictor (manitol) under temperatures of 20 °C (A) and 25 °C (B) in a growth room with different levels of inoculum potential. Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; *overlapping bars* indicate lack of significant difference between treatments.

For the initial stand, at both temperatures of 20 and 25 °C a drastic reduction was observed in the percentage of the plant population for both cultivars and isolates of *S. sclerotiorum*. The average values of initial reductions in the stands were approximately 95% on the higher inoculum potential compared to the lowest level. The cultivar Helio 250 infected with the isolate CMLAPS 423, for two temperatures 20 and 25 °C (Figure 3 - A and B) showed a decline less severe in initial stand and emergence rate index in potential inoculum tested when compared with the other results, with the exception of potential P4, in which there was no difference among cultivars. These results show that the presence of *S. sclerotiorum* in association with sunflower seeds may cause seedling collapse in pre and post-emergence, reducing the plant population in crop fields.

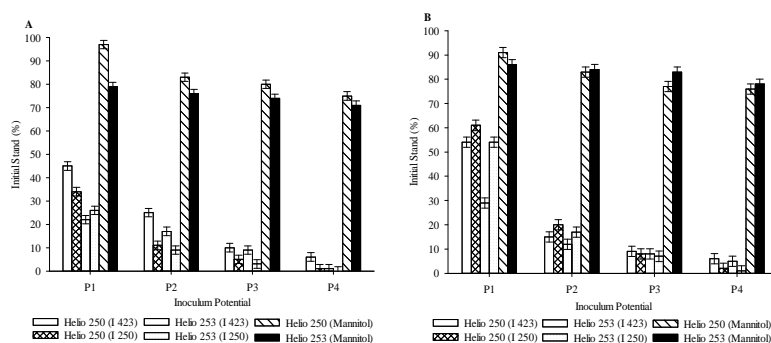


Figure 3 Initial Stand (%) of sunflower seeds, cultivars: Helio 250 and Helio 253 inoculated with two isolates of *S. sclerotiorum* (CMLAPS 250 and CMLAPS 423) in contact with the water restrictor (manitol) under temperatures of 20 °C (A) and 25 °C (B) in a growth room with different levels of inoculum potential. Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; overlapping bars indicate lack of significant difference.

In relation to final stand, evaluated at 25 days after sowing, there was little variation among cultivars for each isolate at both temperatures used (Figure 4 – A and B). Under those temperatures the plant establishment was reduced largely, reaching up to 95% in the higher inoculum potential for both cultivars and isolates of *S. sclerotiorum* used.

The reduction of the final stand was also observed in the treatment without the presence of *S. sclerotiorum*, but with the addition of mannitol to the agar medium. In this case there was an average reduction of 20% in the sunflower population under both temperatures (20 and 25 °C).

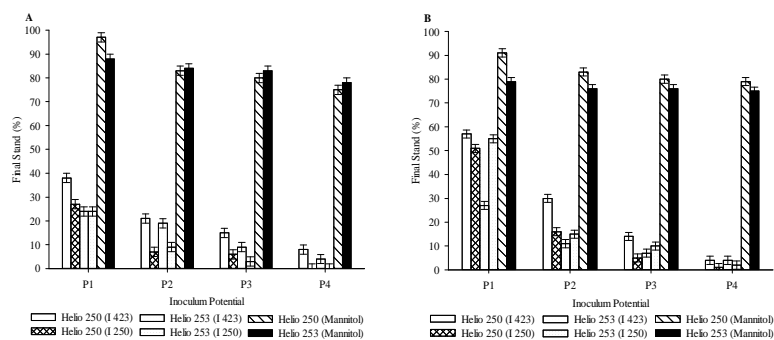


Figure 4 Final stand (%) of sunflower seeds, cultivars: Helio 250 and Helio 253 inoculated with two isolates of *S. sclerotiorum* (CMLAPS 250 and CMLAPS 423) in contact with the water restrictor (manitol) under temperatures of 20 °C (A) and 25 °C (B) in a growth room with different levels of inoculum potential. Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; overlapping bars indicate lack of significant difference.

From Figure 4 it is clear that the reduction in final stand was higher with an increase in inoculum potential of *S. sclerotiorum* in sunflower seeds, which can be better visualized in Figure 5, showing the effect of the fungus on cultivars and at distinct temperatures used in this work.



Figure 5 Final stands of the cultivar Helio 250 in relation to inoculum potentials of two isolates at 20°C. **Top trays:** referring to isolate CMLAPS 250 and inoculum potentials: P1 (B), P2 (C), P3 (D), P4 (E). **Bottom trays:** referring to isolate CMLAPS 423 and inoculum potentials: P1 (G), P2 (H), P3 (I) and P4 (J). Trays A and F referring to the control.

Potential transmissibility of *S. sclerotiorum* by sunflower infected seeds under controlled conditions

The transmission process based on assessment of white mold infections in symptomatic sunflower plants was demonstrated in this study, being the transmission rates directly proportional to inoculum potentials of the pathogen in infected seeds. However, the rates varied according to the cultivar and environment temperature in the early stage of plant development (Figure 6 – A and B). For the Cultivar Helio 250 the highest average transmission rate (% symptomatic plants) was observed when the seeds were infected by the isolate CMLAPS 423, with increments close to 6% to 31% and 12% to 37% at a temperature of 20 °C (A) and 25 °C (B), respectively, proportional to the increase of the inoculum potential. In seeds of this same cultivar infected by isolate CMLAPS 250, these rates varied in the range of nill to 31% and nill to

18% at temperatures of 20 °C (A) and 25 °C (B), respectively, depending on the inoculum potential. Similar results were observed for cultivar Helio 253, in which seeds were inoculated with isolate CMLAPS 423 and had the highest rates of transmission with symptomatic infection for both temperatures.

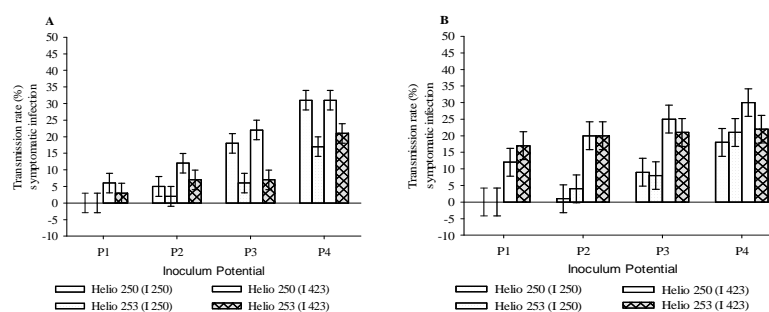


Figure 6 Values of transmission rate (%) of isolates of *S. sclerotiorum* (CMLAPS 250 and CMLAPS 423) from sunflower seeds (cultivars Helio 250 and Helio 253) to plants with symptomatic infection cultivated in growth chamber with controlled temperature (20 °C - (A) and 25 °C - (B)). Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; overlapping bars indicate lack of significant difference.

The transmission of the pathogen to asymptomatic plants was not observed in this study as demonstrated by the normal isolation procedures and confirmed by incubation of plant fragments on semi-selective agar bromophenol (Neon), demonstrating the absence of the fungus in tissues of sunflower plants without disease symptoms.

Regarding the total transmission rate of *S. sclerotiorum* (Figure 7 – A and B), the results varied according to temperature, fungal isolates and sunflower cultivars. In general, the highest rates were observed for the isolate CMLAPS 250, independent of cultivar and temperature, the mean values being 52.2% to 77.2%. For the isolate CMLAPS 423, the mean values of transmission

rates were 48.5% to 71.7% at both temperatures. The lower rates of total transmission of *S. sclerotiorum* were observed in the lowest inoculum potentials.

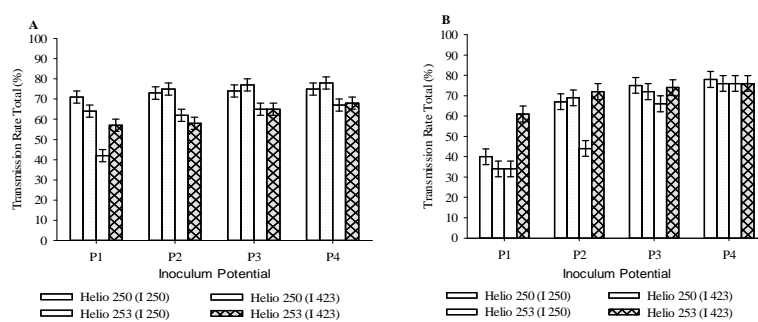


Figure 7 Values of total transmission rate (%) of *S. sclerotiorum* (isolated CMLAPS 250 and CMLAPS 423) in sunflower seeds cultivars (Helio 250 and Helio 253) in different condition of cultivation (20 °C - (A) and 25 °C - (B)). Bars represent Tukey 0.05 mean separation test; overlapping bars indicate lack of significant difference.

DISCUSSION

The association of *S. sclerotiorum* with sunflower seeds is known well from literature but the intensity of this interaction is little investigated and understood. From epidemiology view the occurrence of that pathogen in seeds of that species may lead do various consequences, starting with low plant establishment in the field and then causing reduction in yields and being an efficient mean of disease dissemination. The internal presence of *S. sclerotiorum* in sunflower seeds was able to cause serious damages to the early development of this crop. In general, the higher inoculum potentials caused the higher seed germination reductions as well as plant development after emergence. Although *S. sclerotiorum* may be considered a soil-borne organism it was clear that its association to sunflower seeds is also an important factor affecting seed quality for planting.

An interesting factor observed in this study was the effects of the mycelium infection of sunflower seeds in causing drastic damages to seed quality and then representing a serious risk for growers using infected seeds. From the results of different evaluation tests, it was clear that internal inoculum of *S. sclerotiorum* is able to cause serious reduction in the germination rates and in plant vigour in the early stage development of the infected plants. At the lowest level of inoculum potential of *S. sclerotiorum* the mean values of germination of sunflower seeds were 86% and the emergence speed index of 1.1, under the most favorable temperature, 20° C, for white mold development. The most severe effects of the pathogen on seed germination and plant vigour occurred at the highest inoculum potential, P4. The reduction of the mean value of seed germination was 44.3% in relation to the control (non inoculated seeds). In relation to vigour, the reduction in the mean value was of 52%,

reaching 94% at the highest inoculum potential of the pathogen. In literature, no quantification has been found as to the effect of *S. sclerotiorum* inoculum from sunflower seeds. That may be explained by the difficulty to find appropriate methodology to perform that evaluation. In that respect the use of the osmotic technique as described by Machado et al (2012) that measurement is made possible.

In relation to the influence of mycelium inoculum of *S. sclerotiorum* on the plant establishment in this study it was clear the strong action of the pathogen on that variable, which was evaluated at two stages of plant development. In general the impact on that variable followed the same pattern as observed for seed germination and plant vigour. At the highest inoculum potentials the effect of *S. sclerotiorum* was more severe. There was a correlation between inoculum potentials and reductions of mean values of stands evaluated on twelve and fifty-five days after sowing.

With regard the reaction of both sunflower cultivars to both *S. sclerotiorum* isolates, no marked difference was detected between them, meaning that those factors may not play a similar role as temperatures and inoculum potentials on that interaction although further investigation should be conducted in this research line, in which a higher number of sunflower cultivars and *Sclerotinia* isolates should be used.

Potential effects of other important pathogenic fungi in seeds of important crops in Brazil, such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in bean seeds, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds, *Stenocarpella maydis* and *S. macrospora* in maize seeds have been reported in literature and in general inoculum potential in those cases is also responsible for the determination of variable levels of damage to seed performance and establishment of plant

population in fields (Costa et al., 2003; Araújo et al., 2006; Sousa et al., 2008).

The study on seed transmissibility of *S. sclerotiorum* in sunflower provides a clear understanding about the close interaction of this pathogen and seeds of the two sunflower cultivars used in this research. The transmission rates of the pathogen varied according to inoculum potential and temperature, the higher rates being observed at the highest inoculum potentials and under lower environment temperature. The higher proportion of dead seedlings in pre-emergence stage show the great potentiality of mycelium infection by *S. sclerotiorum* in causing drastic damages to seed performance. Because its ability to survive in soil for many years, as dormant sclerotia, dead seedlings from seed infection represent an important source of inoculum of white mold in practice. From the epidemiological view such transmission pattern means an alternative way to guarantee the disease in the field with serious implications for growers. Investigation conducted by Tu (1988) on white mold in beans had shown that *S. sclerotiorum* was able to survive in infected seeds as dormant mycelium in testa and cotyledons, and the rate of survival varied from 85% to 89% and did not change appreciably over a 3-year period.

Interesting to note also in this investigation that even at low level inoculum potential, *S. sclerotiorum* was able to be transmitted to seedling and emerged plants at high proportion. At potential P1, which consisted in exposing seeds to the fungal colony for 24 hours, the total transmission rate was 50.4%; whereas at the highest potential (P4) transmission rate was 74.3%. Although similar transmission rates were observed for the two sunflower cultivars and the two isolates of the pathogen used in this work, caution should be taken in making any general conclusion on the effect of those variables. A more representative number of cultivars of sunflower and of isolates of *S. sclerotiorum* should be considered for a better understanding of that interaction.

From the examination of *S. sclerotiorum* infection in emerged plants, as part of the determination of transmission rates of this pathogen, no infection was detected in asymptomatic plants. In terms of diagnosis and management of this disease, that fact is quite relevant as asymptomatic plants in other pathosystems may be infected by their pathogens and that may be the cause of serious consequences for growers (Oren et al., 2003; Vallad et al., 2005). In that direction, further investigation should be conducted for confirmation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) for the support in the development of this work.

REFERENCES

Araújo DV, Pozza EA, Machado JC, Zambenedetti EB, Celano FAO, Carvalho EM, Camargos VN. (2006) Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Fitopatologia Brasileira 31:35-40.

Baker KF, Smith SH. (1966) Dynamics of seed transmission of plant pathogens. Annu Rev Phytopathology 4:311-332.

Bergstrom GC, Shah DA. (2000) Temperature dependent seed transmission of *Stagonospora nodorum* in wheat. European Journal Plant Pathology 106:837-842.

Boland GJ, Hall R. (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal Plant Pathology 16:93-108.

Bolton MD, Thomma BP, Nelson BD. (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology 7; 1-16.

Brasil. (2009a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de análise sanitária de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, pp. 200.

Brasil. (2009b) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras de análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS Brasília, DF: pp. 399.

Costa MLN, Machado JC, Guimarães RM, Pozza EA, Oride D. (2003) Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. Ciência e Agrotecnologia 27:1023-1030

Machado JC, Barrocas EN, Costa MLN, Guimarães RM, Machado CF. (2012) Uso da técnica de restrição hídrica ou “condicionamento osmótico” em patologia de sementes. In: Wilmar C. da Luz (Org.) Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, RS: RAPP, v. 20, pp. 37-63.

Maguire JD. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.

Michel BE, Radcliffe DA. (1995) Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal* 87:131-136.

Napoleão R, Nasser L, Lopes C, Café Filho A. (2006) Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. *Summa Phytopathologica* 32:180-182.

Nasser LCB, Arancibia RC, Napoleão R. (1999) Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. *Fitopatologia Brasileira* 24:309.

Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A. (2003) Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a Green Fluorescent Protein-Expressing transgenic isolate. *Applied Environmental Microbiology* 69:1695-1701.

Peres AP, Nasser LCB, Machado JC. (2002) Use of semi-seletive media for detection os *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. *Fitopatol Brasileira* 27:123-127.

Sousa MV, Machado JC, Pfenning LH, Kawasaki VH, Araújo DV, Silva AA, Martini Neto A. (2008) Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. *Tropical Plant Pathology* 33:41-48.

Tu JC. (1988) The role of White mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology* 121:40-50.

Vallad GE, Bhat RG, Koike ST, Ryder EJ, Subbarao KV. (2005) Weedborne reservoirs and seed transmission of *Verticillium dahliae* in lettuce. *Plant Disease* 89: 317-324

ARTIGO 3

**Genetic, aggressiveness and fungicide sensitivity variation among
Sclerotinia sclerotiorum dry bean isolates from Brazil fields**

**Prepared in accordance to Tropical Plant Pathology
(Submitted)**

Willian Luis Antonio Zancan^{1,2}, James R. Steadman², Rebecca Higgins²,
Rachana Jhala², José da Cruz Machado¹

¹Universidade Federal de Lavras, Plant Pathology Department, PO box 3037,
37200-000, Lavras, MG, Brazil.

²University of Nebraska-Lincoln, Plant Pathology Department, 68583-0722,
Lincoln, NE, USA

Running title: Characterized *Sclerotinia* bean isolates

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum, infection of bean fields, has increased in Brazil. Fungicides application is the control strategy used due to lack of cultivars with complete disease resistance. To guide the use of isolates in resistance screening 25 *S. sclerotiorum* isolates from Brazilian dry bean fields were characterized using microsatellite markers, mycelial compatibility groups (MCGs), aggressiveness and fungicide sensitivity. Microsatellite primer pairs were used to identify polymorphisms among the *S. sclerotiorum* isolates and MCGs were determined from interaction of all isolates grown side-by-side. Aggressiveness was derived from a straw test where fungal mycelium was placed over a cut bean stem and rated for disease progress. Fungicides iprodione, pyraclostrobin and metconazole were mixed in PDA agar plates and tested to identify sensitivity of the *S. sclerotiorum* isolates using radial mycelial growth. Data from microsatellite profiles grouped the 25 isolates into four clusters and seven MCGs were identified. No association among host cultivar and cluster or MCG of isolates was observed. For MCGs, 57% contained isolates sampled frequently over multiple locations and 43% contained isolates unique to locations. There were significant differences among isolates in aggressiveness within and between MCGs. The most aggressive isolates in resistance screening will be helpful in the identification of higher levels of resistance in bean germplasm/lines. For identification of the highest levels of resistance the Unai isolate should be used for screening. Iprodione inhibited mycelial growth at field concentration, whereas pyraclostrobin and metconazole allowed some growth.

Keywords: White mold, microsatellites, resistance, chemical control.

RESUMO

As infecções de campos de feijoeiro com *Sclerotinia sclerotiorum* vêm aumentando no Brasil. Devido à falta de cultivares resistentes, a aplicação de fungicidas é utilizada como estratégia de controle. Para orientar o uso na triagem de resistência, 25 isolados de *S. sclerotiorum* coletados em campos de feijoeiro brasileiro foram caracterizados por meio de marcadores microssatélites, grupos de compatibilidade micelial (GCMs), agressividade e sensibilidade a fungicida. Pares de *primers* de microssatélites foram utilizados para identificar polimorfismo entre isolados de *S. sclerotiorum* e GCMs foram determinados na interação dos isolados crescidos lado a lado em meio DS. A agressividade foi avaliada a partir do “straw test”, em que o micélio do fungo foi colocado sobre a haste de feijoeiro cortada e classificado quanto ao progresso da doença. Os fungicidas iprodiona, piraclostrobina e metconazol foram misturadas em placas contendo BDA e testados para identificar sensibilidade dos isolados de *S. sclerotiorum* por meio do crescimento micelial radial. Dados de microssatélites agruparam os 25 isolados em quatro grupos e sete GCMs foram identificados. Não foi observada associação entre a cultivar hospedeira e cluster ou GCM dos isolados. Para GCMs, 57% dos isolados foram amostrados em diferentes locais e 43% dos isolados em uma única localização. Houve diferença significativa entre os isolados quanto à agressividade dentro e entre GCMs. O isolado mais agressivo na seleção para resistência será útil na identificação de maiores níveis de resistência em linhagens de feijão. Para a identificação dos níveis mais elevados de resistência, o isolado de Unai deve ser utilizado na seleção. Iprodiona inibiu o crescimento micelial na concentração de campo, enquanto piraclostrobina e metconazol permitiram o crescimento.

Palavras-chave: Mofa-branco, microssatélite, resistência, controle químico.

INTRODUCTION

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, causal agent of white mold on dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.), is among the most devastating and promiscuous necrotrophic fungal plant pathogens in the world, presenting a wide range of hosts, over 408 species, including weed species and causes severe yield losses in many important agronomic crops (Boland and Hall, 1994).

To establish management strategies for such disease it is important to understand the variation nature of that pathogen in population and aspects of its epidemiology. *Sclerotinia sclerotiorum* has a haploid somatic phase in which clonality is the result of both asexual reproduction by means of sclerotia and sexual reproduction by self-fertilization (Kohn 1995) with the expectation that intracloonal variation is due to mutation (Carbone et al. 1999; Carbone and Kohn 2001; Hambleton et al., 2002).

Microsatellite alleles are often closely associated with mycelial compatibility, an independent marker used to genotype isolates and thought to be under multigenic regulation (Schafer and Kohn, 2006; Clarkson et al., 2013). Microsatellite markers have been very informative in studying genetic diversity and population biology of *S. sclerotiorum* due to the high mutation rates that are multiallelic in nature, which makes them useful in phylogenetic inference (Sirjusingh and Kohn, 2001).

In previous studies on *S. sclerotiorum* variation, mycelial compatibility groupings (MCGs) were used to measure population diversity among pathogen isolates. Mycelial compatibility /incompatibility grouping is a self and nonself recognition system controlled by multiple loci (Bolton et al., 2006). High genetic variability of isolates from bean, tomato, pepper, lentil, sunflower, carrot, radish,

canola and cabbage of wide geographical origin in Brazil was reported using RAPD markers and MCGs (Litholdo Júnior et al., 2011).

In addition to genetics, *S. sclerotiorum* isolates maybe characterized by measuring aggressiveness on a resistant host. Pathogenicity may be evaluated in many ways such as infection efficiency, latent period, sporulation rate, infectious period or lesion size (Pariud et al., 2009). By measuring lesion progress on stems over time, Otto-Hanson et al. (2011) found that *S. sclerotiorum* isolates collected from dry bean fields in Minnesota were more aggressive than isolates from Nebraska, Michigan and Washington, whereas California isolates were less aggressive than those collected from all other bean production locations.

Disease control through crop management practices has contributed to a decrease in the inoculum potential of fungi, especially soilborne, in different regions of the world, but the effectiveness of management strategies is directly related to the aggressiveness of the remaining inoculum (Hawthorne and Jarvis, 1973). Due to the lack of host resistance the most common method to control *S. sclerotiorum* in host crop fields is through the use of fungicides.

The objective in this study was to expand the knowledge on characterization of *S. sclerotiorum* isolates collected in dry bean fields in Brazil. Genetic variation, aggressiveness and sensitivity to fungicides used to manage white mold in Brazilian fields were the traits measured.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different locations

Twenty-five *Sclerotinia sclerotiorum* isolates were obtained from different dry bean cultivars grown in different states in Brazil: Minas Gerais (17), Goiás (5), Bahia (1), Mato Grosso (1) and Parana (1) between 2009 and 2012 (Table 1). For each isolate in each field, sclerotia were collected from infected plants in each state and collection year.

Table 1 Collection information for each bean isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil

Field	Isolate Number	Year	Location	Host cultivar
1	10	2011	São Desidério, BA	BRS Ametista
2	25	2011	Montividiu, GO	Pérola
3	17	2011	Silvânia, GO	Pérola
4	51C	2009	Rio Verde, GO	Pérola
5	54C	2010	Rio Verde, GO	Pérola
6	26	2010	Campo Verde, MT	Pérola
7	63F	2011	Lavras, MG	BRSMG Talismã
8	40	2009	Ijaci, MG	BRSMG Talismã
9	70B	2011	Patos de Minas, MG	BRSMG Majestoso
10	57A	2012	Ventania, PR	BRS Pontal
11	60A	2011	Iraí de Minas, MG	BRS Majestoso
12	61B	2010	Unaí, MG	IAPAR 81
13	56F	2010	Unaí, MG	Juriti
14	53B	2010	Paracatu, MG	Peróla
15	53C	2010	Paracatu, MG	Peróla
16	67A	2010	Coimbra, MG	Ouro Vermelho
17	69C	2011	Goiânia, GO	BRS Monarca
18	66E	2010	Oratórios, MG	Ouro Vermelho
19	65B	2010	Canaã, MG	Ouro Vermelho
20	64D	2010	Viçosa, MG	BRSMG Majestoso
21	71A	2010	Porto Firme, MG	Ouro Vermelho
22	71B	2010	Porto Firme, MG	Ouro Vermelho
23	52C	2010	Porto Firme, MG	Ouro Vermelho
24	43	2010	Lambari, MG	S 35 MA 2

25	58C	2010	Lambari, MG	Marcela81
----	-----	------	-------------	-----------

Preparation of isolates for characterization

Mycelial cultures of *S.sclerotiorum* used in characterization studies were reactivated from stored sclerotia by surface sterilization and growing on media in Petri dishes. Once collected, the isolates were stored in 1.5mL microcentrifuge tubes at 5°C. Sclerotia were triple rinsed with (i) 50% Clorox

bleach/50% double-distilled (dd) H₂O solution for 3 min, (ii) ddH₂O rinse for 3

min, and (iii) a final ddH₂O rinse for 3 min, then plated on water agar (16 g of

Bacto agar per liter of ddH₂O), with four to five sclerotia of each isolate

separated on each plate and incubated at 20-22 °C for 5 to 6 days. An 8-mm plug from a 5- or 6-day-old culture was transferred from the margin of the mycelial colony onto a Petri dish containing PDA (Difco potato dextrose agar at 39 g/L of

ddH₂O) and incubated at 20-22 °C for 2-3 days.

Molecular characterization

Isolates from all collections were characterized using microsatellite markers and then analyzed for DNA genotype by an ABI 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Isolate cultures derived from stock sclerotia were subcultured onto PDA and incubated at 20-22 °C. After 3 days four agar plugs from the colony margin were transferred to a flask containing 150 ml PDB

(potato dextrose broth at 24 g/liter of ddH₂O) and incubated for 3-4 days at 20-

22 °C. The resultant mycelial mat was removed and rinsed with ddH₂O using a

Buchner funnel before being blotted dry and lyophilized. Total genomic DNA was extracted from approximately 0.01g lyophilized mycelium using the phenol/chloroform extraction protocol (Sambrook and Russel, 2001).

Microsatellite analysis

Eight fluorescently-labelled microsatellite primer pairs were chosen from the 25 microsatellite primer pairs developed by Sirjusingh and Kohn (2001) to identify polymorphisms among the *S. sclerotiorum* isolates. These primer pairs were used in multiplex PCR amplifications for sets of two (7-2, 20-3; 6-2, 110-4; 36-4, 114-4; and 106-4, 92-4) microsatellite loci (Sirjusingh and Kohn, 2001). Polymerase chain reaction (PCR) amplification

mixtures of 25 μ l contained 5.0 μ M of each primer, 5mM dNTPs, 50mM $MgCl_2$, 10x buffer(TaKaRa Ex Taq™) , 0.65 U of TaKaRa Ex Taq™ DNA

polymerase, and 2.0 μ l of a 20ng/ μ l genomic DNA solution. Amplifications were performed in a Labnet MultiGene Thermal Cycler TC9600-G programmed for an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec; primer annealing at 56°C for 45 sec; and extension at 65°C for 90sec, with a 30-min extension at 65°C on the final cycle. PCR products were visualized by gel electrophoresis to confirm the amplification of the microsatellite loci in that isolate. PCR amplicons

giving visible bands on the gel were diluted 1:50 in ddH₂O to optimize

fluorescent signals and performed fragment analysis by an ABI 3700 Genetic analyzer. Data collected after DNA genotyping were analyzed using Peak Scanner software (Applied Biosystems).

Mycelial Compatibility Grouping (MCG)

S. sclerotiorum isolates were also used for mycelial compatibility trial. For that, an 8 mm water agar plug was taken from approximately 1 mm behind the colony edge and placed mycelia side down on a plate of Diana Sermons (DS) medium (Cubeta et al., 2001). The medium consisted of malt extract broth at 40 g/liter (Sigma-Aldrich, St. Louis), NaCl at 20 g/liter, Bacto peptone at 5

g/liter (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD), Bacto agar at 15 g/liter (BD Diagnostic Systems), McCormick's red food dye (80 µl/liter) and McCormick's yellow food dye (80 µl/liter). Isolates were grown on DS media plates for 48 h on the bench top at 20-22 °C before use in an MCG test. To determine the MCGs, each possible pair of isolates was grown in a side-by-side pairing by placing an 8 mm plug of an isolate from DS culture on a plate of DS medium, 2.5 cm apart. Each isolate pairing was duplicated and each pairing was incubated on the bench top at 20-22 °C for 7 days. The reaction between each isolate pair was evaluated at 7 and 14 days after transfer by three different observers. Pairings were scored as compatible when the two isolates merged to form one colony, with no distinct interaction zone. Pairings were scored as incompatible when the cultures formed a barrage line of dead cells and reduced growth between the two isolates (Kohn et al., 1990). The results were recorded in a matrix, as either an incompatible or a compatible reaction for each isolate pair. The experimental design was a randomized complete block with 2 replications.

Aggressiveness

The straw test, as described by Otto-Hanson et al. (2011) was conducted in the greenhouse at 20°C nighttime and 26°C daytime temperatures. For inoculation, clear drinking straws were cut to 1.5 cm in length and heat sealed at one end. The open end of the straw was pressed into the reverse side of a 2-3 day old PDA culture at the advancing edge of the mycelia of each *S. sclerotiorum* isolate. The stem of each bean plant was cut 2 cm above the fourth node (the internode between the fourth and fifth node). The straw containing agar and fungal mycelium was placed over the cut stem, and the plants were incubated for 8 days when they were rated using the "Modified Petzoldt and Dickson Scale" (Teran et al., 2006). This rating scale is used for screening bean lines for white mold reaction: a rating of 1 to 3 is considered resistant (1. plants without

symptoms; 2. invasion of the fungus beyond inoculation site <1inch; 3. invasion of the fungus near the first internode >1inch), 4 to 6 is considered intermediate (4. fungus expanded to the first internode; 5. invasion of the fungus beyond the first internode <1 inch; 6. invasion of the fungus near the second internode >1inch), and 7 to 9 is considered susceptible (7. fungus expanded to the second internode; 8. invasion of the third internode <1inch; 9. invasion of the third internode >1inch leading to plant death). Capillary trays were placed under pots for watering from the bottom to prevent washing off the inoculum.

For the aggressiveness test G122, a partial physiological resistance to white mold (Carneiro et al., 2011), was inoculated with the 25 *S. sclerotiorum* isolates from Brazil. A total of 250 pots each one with one seed were planted at the same time. Twenty-five pots were grouped together into a block where each pot received 1 of the 25 isolates. The experimental design was randomized complete blocks in each replication, with 10 replications where a replication was a complete set of 25 blocks.

Sensitivity of *S. sclerotiorum* isolates to fungicide *in vitro*

Technical grade iprodione (96.2%), was provided by the Nufarm (Morrisville, NC, USA) and pyraclostrobin (95%) and metconazole (97%) by BASF (Research Triangle Park, NC, USA). A preliminary triad using different concentrations of the three fungicides was conducted to determine the range of isolate sensitivity. Afterwards, the fungicides were dissolved in acetone, to obtain stock solutions. The stock solutions were added to PDA (autoclaved and cooled to 40 to 50 °C) to yield 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 µg a.i./ mL of PDA of each fungicide and PDA diluted in acetone was used as a control. Twenty milliliters of amended PDA was poured into each 9 cm diameter petri dish. Each plate was inoculated with an inverted mycelia plug (6-mm diameter) taken from edge of three-day-old cultures of each isolate grown on non amended PDA,

placed centrally onto the fungicide-amended and acetone media and incubated at 20-22 °C for 48 hr. Radial mycelial growth was measured to evaluate the fungicide sensitivity.

The experimental design for the fungicides sensitivity test *in vitro* was a randomized complete block with 3 replications for each of the isolates, concentrations and fungicides.

Data analysis

The size of base pairs of each *S. sclerotiorum* isolate in each primer of microsatellite marker were analyzed with a multi variate statistical package (MVSP) software version 3.1 (Kovach, 2005) to group all 25 isolates. The data was analyzed by means of un-weighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) algorithm based on squared Euclidean distances algorithm.

Statistical analysis of variance (ANOVA) of the straw test and fungicide sensitivity used the PROC GLIMMIX program in SAS 9.3 statistical software (SAS Institute, 2011). Data were analyzed using Scoot-Knott for aggressiveness and Tukey for fungicide sensitivity, and P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

The 25 *S. sclerotiorum* isolates from Brazil were grouped into clusters using a distance-based analysis of the data obtained from 8 microsatellite markers producing different base pair sizes. Four dendrograms, generated using Euclidean, Manhattan metric, Canberra metric and Squared Chord distance, produced the same structure and the same four different clusters with similarity indices of 24, 32, 30 and 28% (Fig. 1).

The first and smallest cluster (I) is made up of only two isolates, one from Oratórios (66E) and one from Viçosa (64D), both in Minas Gerais State. The second cluster (II) contains six isolates, two from Unaí, MG (56F, 61B) and one each from Porto Firme, MG (71B), Rio Verde, GO (54C), Lambari, MG (43) and Ijaci, MG (40). All of the isolates that belong to a third (III) cluster can be divided in two sub-clusters. In one sub-cluster there are isolates from Paracatu, MG (53C, 53B), Goiania, GO (69C), Canaã, MG (65B), Patos de Minas, MG (70B). The second sub-cluster includes isolates from Coimbra, MG (67A), Porto Firme, MG (52C), Lambari, MG (58C), Ventania, PR (57A), Iraí de Minas, MG (60A), São Desidério, BA (10) and Campo Verde, MT (26). The fourth cluster (IV) has five isolates, one each from Rio Verde, GO (51C), Montividiu, GO (25), Lavras, MG (63F), Porto Firme, MG (71A) and Silvânia, GO (17). There did not appear to be any association of bean cultivar with genetic relatedness. An example is the cv. Pérola with isolates in MCGs B, C, E, F and in clusters II, III and IV.

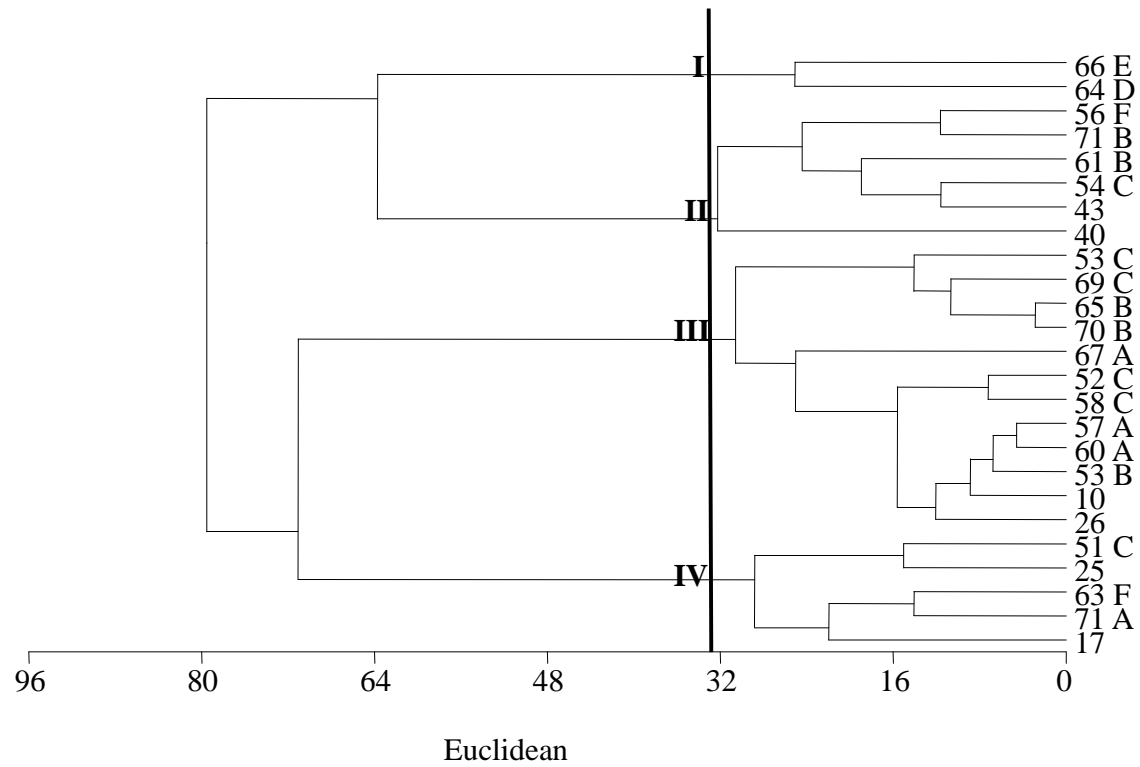


Figure 1 Unweighted pair group method using arithmetic means (UPGMA) cluster of the 25 *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different locations of Brazil (Table 1), constructed with a Euclidean distance algorithm based on data from eight fluorescently-labelled microsatellite primer pairs

For MCGs two data readings, 7 and 14 days post transfer, were consistent for all three observers and were summarized in a final data matrix. Among the 25 isolates, seven MCGs were identified (Table 2 and Fig. 2). The Viçosa, Patos de Minas and Campo Verde isolates each were incompatible with all other isolates, making unique MCGs A, D and E, respectively. MCG C was widely distributed across the distance cluster, and includes 52% of the total isolates, including those from Minas Gerais, Bahia, Paraná and Goiás States. The MCGs F and G together accounted for 24% of the total isolates, obtained from Goiás and Minas Gerais State, respectively. The MCG B included isolates from Goiás and Minas Gerais States.

Table 2 The straw test rating mean and t grouping for each *Sclerotinia sclerotiorum* isolate tested for aggressiveness on G122 bean cultivar in the greenhouse and compared to 7 mycelial compatibility groupings (MCGs)

MCGs	Location/Isolate	Mean Straw Test Rating	t Grouping
C	Unaí, MG (61B)	6.6	a
C	Ventania, PR (57A)	6.5	a
G	Porto Firme, MG (71A)	6.4	a
B	Rio Verde, GO (54C)	6.4	a
G	Porto Firme, MG (71B)	6.2	a
C	Coimbra, MG (67A)	6.2	a
C	Porto Firme, MG (52C)	6.0	a
F	Montividiu, GO (25)	5.9	a
B	Unaí, MG (56F)	5.9	a
F	Rio Verde, GO (51C)	5.9	a
C	Canaã, MG (65B)	5.8	a
C	Lavras, MG (63F)	5.8	a
D	Patos de Minas, MG (70B)	5.7	a
C	Paracatu, MG (53B)	5.6	a
C	Iraí de Minas, MG (60A)	5.6	a
C	Lambari, MG (58C)	5.5	a
F	Silvânia, GO (17)	5.3	b
B	Ijaci, MG (40)	5.3	b
C	Paracatu, MG (53C)	5.3	b
C	Lambari, MG (43)	5.3	b
G	Oratórios, MG (66E)	5.2	b
E	Campo Verde, MT (26)	4.9	b
C	Goiânia, GO (69C)	4.4	c
C	São Desidério, BA (10)	4.2	c
A	Viçosa, MG (64D)	4.1	c



Figure 2 Associated of mycelial compatibility groups (◆ MCG 1, ● MCG 2, △ MCG 3, ■ MCG 4, ● MCG 5, ☼ MCG 6 and □ MCG 7) with locations of *S. sclerotiorum* isolate collections from bean field in 5 states in Brazil.

The aggressiveness ratings of 25 isolates, contained isolates that were significantly different from each other ($P=0.0002$) (Table 2) and there were no significant differences due to blocking ($P=0.1186$). The coefficient of variation (CV) was 21.78%. The straw test rating means per isolate on cultivar G122 ranged from 6.6 to 4.1. The aggressive isolates formed three different groups: the first was composed of isolates from Unaí (61B and 56F), Ventania (57A), Porto Firme (71A, 71B and 52C), Rio Verde (54C and 51C), Coimbra (67A), Montividiu (25), Canãa (65B), Lavras (63F), Patos de Minas (70B), Paracatu (53B), Iraí de Minas (60A) and Lambari (58C); the second group was made up of isolates from Silvânia (17), Ijaci (40), Paracatu (53C), Lambari (43),

Oratórios (66E) and Campo Verde (26) isolates; and the third group contained only the Goiânia (69C), São Desidério (10) and Viçosa (64D) isolates. Most of the isolates were classified as having intermediate aggressiveness, however there were significant differences among them.

Isolates with the highest aggressiveness rating or mean straw test ratings up to 6.0, were found in MCGs G, C and B and included 66.6%, 30.7% and 33.3% of isolates, respectively. The many isolates with intermediate aggressiveness included 100% of isolates in MCGs A, D, and F, 66.6% of isolates in MCG B, 69.2% of isolates in MCG C and 33.3% of isolates in MCG D.

In the fungicide sensitivity study there were differences ($P= 0.001$) in rate of mycelial growth among 25 isolates in the iprodione, pyraclostrobin and metconazole amended PDA, and except for the iprodione at 1.6 and 0.8 μg a.i./mL of PDA, there was no difference among isolates ($P=0.1000$). Iprodione reduced the mycelial growth of *S. sclerotiorum* isolates in 99.4%, whereas pyraclostrobin and metconazole reduced growth by 81.1 and 80.2% at 1.6 μg a.i./mL of PDA, respectively. This rate is similar to application rates used to protect field crops. The *S. sclerotiorum* isolates showed different sensitivities to pyraclostrobin and metconazol in the highest concentration; the first fungicide was more efficient to reduce 85% of mycelial growth of isolates from Goiania-GO (69C) and Unaí-MG (61B), both belonging the MCG 3; second fungicide reduced in mean 96.3% of isolates of Rio Verde (51C), Montividiu (25) and Silvânia (17) from Goiás State (Fig. 3), which belong the MCG 6.

The mean inhibitions for all isolates at 0.8 to 0.05 μg a.i./mL of PDA concentrations were 91.4, 83.9, 47.3, 28.0 and 14.2% for iprodione, 72.5, 64.6, 57.1, 51.1 and 44.3% for pyraclostrobin, and 70.2, 61.5, 52.9, 43.9 and 36.1% for metconazole. All the isolates grown in the nonamended PDA control completely colonized the Petri dishes within 48 hours.

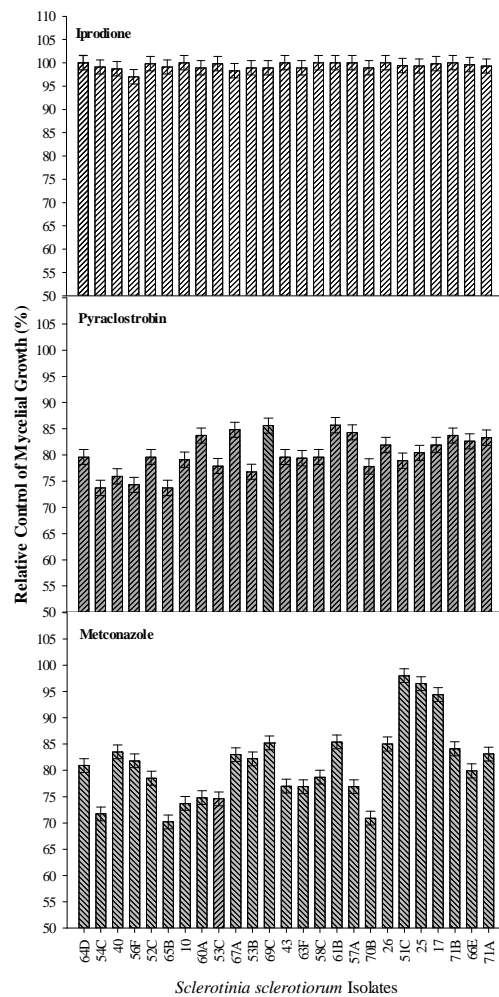


Figure 3 Control of mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from bean fields on potato dextrose agar (PDA) amended with three fungicides at 1.6 μg a.i./mL of PDA

DISCUSSION

Comparing genetic variation using microsatellite markers and MCGs, resulted in differing levels of variability observed among the isolates. This indicates that these isolates of *S. sclerotiorum* were not grouped by specific genetic characteristics. Previous reports of population studies reported a clonal mode of evolution for *S. sclerotiorum*, suggesting recombination, genetic exchange and mutation can occur (Carbone et al., 1999; Cubeta et al., 1997; Kohli and Kohn, 1998). Litholdo Júnior et al. (2011) found that associated MCG and RAPD markers revealed a high level of variability among *S. sclerotiorum* isolates from different hosts and locations in Brazil. In a study of potato isolates from one field in the Washington Basin using microsatellite markers, high genetic diversity was found (Atallah et al., 2004). In some previous studies on *S. sclerotiorum* variation using microsatellite markers and MCGs, there was no relationship among the two genetic measures due to ecological adaptation of the pathogen and level of virulence of *S. sclerotiorum* isolates (Auclair et al., 2004; Kull et al., 2004; Malvárez et al., 2007; Litholdo Júnior et al., 2011). Additionally, microsatellite loci have been reported to have high mutation rates (Sirjusingh and Kohn, 2001). The structure and dynamics of *S. sclerotiorum* populations represent an essential part of understanding how the underlying mechanisms are involved in the pathogen history and distribution between and within geographical areas and different hosts (Carbone and Kohn 2001).

The results of this study indicate that 7 mycelial compatibility groups were formed among the 25 *S. sclerotiorum* isolates that were tested. Three MCGs, A, D and E, were comprised of a single isolate. However, four groups (MCGs B, C, F and G) contained a mixture of isolates from different locations

that were compatible. The variability found in 2 bean producer fields in Brazil using 21 *S. sclerotiorum* isolates showed the presence of two MCGs (Meinhardt et al., 2002), while Lehner et al. (2013) identified nine MCGs using 20 isolates from Minas Gerais (Zona da Mata and Northwest), São Paulo, Espírito Santo and Parana states, including a mixture of isolates from different locations in the same MCGs. In this study, the largest group of compatible isolates was MCG C with 52% of *S. sclerotiorum* isolates from 11 geographic locations in different states. One of the most effective ways to disseminate the causal agent of white mold is the use of seeds contaminated with sclerotia (Machado, 1988) and/or the fungal mycelia within the teguments as well as in the embryonic tissues (Tu, 1988). Introduction of the fungus to in non-infected areas or new pathotypes in the same areas by movement of seeds can help explain the genetic similarity among isolates in the same MCG.

Assessment of the range of aggressiveness of *S. sclerotiorum* isolates resulted in significant variation in the mean straw test ratings from 4.1 for least aggressive to 6.6 in the most aggressive isolate.

When the greenhouse aggressiveness test was compared with isolate MCGs in the laboratory there were significant differences in aggressiveness within MCGs, e. g. MCG C. Otto-Hanson et al. (2011) only found significant differences between isolates in different MCGs and not among isolates in the same MCG in beans collected from the major bean production areas in the United States. The MCG structure of *S. sclerotiorum* on cultivated hosts appears to more complex, indicating that agricultural practices may influence MCG frequencies and patterns which, can help to explain the results across field locations (Kull et al., 2004).

Characterizing *S. sclerotiorum* population structure and variability in isolate aggressiveness can guide development of management strategies, reducing the loss in yield and quality of crops caused by this pathogen, not only in Brazil,

but around the world where this pathogen is present or may be introduced.

In relation to the studies developed in vitro to check the reaction of *S. sclerotiorum* isolates to fungicides, the growth of the 25 Brazilian *S. sclerotiorum* isolates was inhibited when the highest concentration of the chemicals was used. However the effectiveness decreased at the lower concentration, regardless of fungicides or location of isolates. Each isolate of *S. sclerotiorum* presented a slightly different sensitivity for type and 6 concentrations of fungicides. These results support that the iprodione was the most effective product for control of 25 *S. sclerotiorum* isolates, although pyraclostrobin and metconazole were able to inhibit growth up to 80%. Nevertheless, the loss of effectiveness to inhibit growth exhibited by iprodione was reduced at lower concentrations and could reduce field control if rates are reduced.

Our study supports previous reports that the widely used fungicide iprodione has demonstrated effective control of *S. sclerotiorum* isolates from different crops (Matheron and Matejka, 1989; Mueller et al., 2002; Ma et al., 2009; Zancan et al., 2012).

Further fungicides studies should be conducted in bean fields to measure yield in Brazil where this disease occurs at high intensity.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Oscar Perez-Hernandez and Dr. Kent Eskridge Departments of Plant Pathology and Statistic, respectively, of the University of Nebraska-Lincoln for help in statistical analysis. Thanks are also due to CNPq, CAPES and FAPEMIG for supporting part of this project

REFERENCES

- Atallah, Z.K.; Larget, B.; Chen, X.; Johnson, D. A. 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. *Phytopathology* 94:737-742.
- Auclair, J.; Boland, G.J.; Kohn, L.M.; Rajcan, I. 2004. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. *Plant Disease* 88:891-895.
- Boland, G.J.; Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16:93-108
- Bolton, M.D.; Thomma, B.P.H.J.; Nelson, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7:1-16.
- Carbone, I.; Anderson, J.B.; Kohn, L.M. 1999. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* 53:11-21.
- Carbone, I.; Kohn, L.M. 2001. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology* 10:947-64.
- Carneiro FF, Zeviani WM, Santos JB, Carvalho RSB, Alves FC, Dias JA (2011) Minimum number of common bean plants per plot assess field resistance to white mold. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11:358-364.
- Cubeta, M.A.; Cody, B.R.; Kohli, Y.; Kohn, L.M. 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* in infected cabbage in eastern North Carolina. *Phytopathology* 87:1000-1004
- Cubeta, M.A.; Sermons, D.N.; Cody, B.R. 2001. Mycelial interactions of *Sclerotinia minor*. (Abstr.) *Phytopathology* 91:S19.
- Clarkson, J.P.; Coventry, E.; Kitchen, J.; Carter, H.E.; Whipps, J.M. 2013. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. *Plant Pathology* 62:309-324.

Hambleton, S.; Walker, C.; Kohn, L.M. 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:309-15.

Hawthorne, B.T.; Jarvis, W.R. 1973. Differential activity of fungicides on various stages in the life cycle of *Sclerotinia* spp. *New Zealand Journal Agricultural Research* 16:551-557.

Kohn, L.M. 1995. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. *Canadian Journal of Botany* 73:1231-1240.

Kohn, L.M.; Carbone, I.; Anderson, J.B. 1990. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology* 14:255-267.

Kohli, Y.; Kohn, L.M. 1998. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genetic Biology* 23:139-149.

Kovach, W.L. 2005. MVSP—A Multivariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.

Kull, L.S.; Pedersen, W.L.; Palmquist, D.; Hartman, G.L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 88:325-332.

Lehner, M.S.; Paula Júnior, T.J.; Lima, R.C.; Vieira, R.F.; Soares, B.A.; Cruz Neto, L.B.M.; Carneiro, J.E.S. 2013. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from four states of Brazil. *Annual Report Bean Improvement Cooperation* 56:53-54.

Litholdo Júnior, C.G.; Gomes, E.V.; Lobo Júnior, M.; Nasser, L.C.B.; Petrofeza, S. 2011. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 10 (2): 868-877.

Ma, H.-X.; Feng, X.-J.; Chen, Y.; Chen, C.-J.; Zhou, M.-G. 2009. Occurrence and characterization of dimethachlon insensitivity in *Sclerotinia sclerotiorum* in Jiangsu Province of China. *Plant Disease* 93:36-42.

Machado, J.C. 1988. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL/FAEPE, pp. 107.

Malvárez, M.; Carbone, I.; Grünwald, N.J.; Subbarao, K.V.; Schafer, M.; Kohn, L.M. 2007. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. *Phytopathology* 97:470-483.

Matheron, M.E.; Matejka, J.C. 1989. In vitro and field comparison of six new fungicides with Iprodione and Vinclozolin for control of leaf drop of lettuce caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 73:727-730.

Meinhardt, L.W.; Wulff, N.A.; Bellato, C.M.; Tsai, S.M. 2002. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:211-215.

Mueller, D.S.; Dorrance, A.E.; Derksen, R.C.; Ozkan, E.; Kurle, J.E.; Grau, C.R.; Gaska, J.M.; Hartman, G.L.; Bradley, C.A.; Pedersen, W.L. 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of Sclerotinia stem rot on soybean. *Plant Disease* 86:26-31.

Otto-Hanson, L.; Steadman, J.R.; Higgins, R.; Eskridge, K.M. 2011. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. *Plant Disease* 95:1370-1377.

Pariuad, B.; Ravigne, V.; Halkett, F.; Goyeau, H.; Carlier, J.; Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58:409-424

SAS Institute. 2011. The SAS system for windows: Release 9.3. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

Sambrook, J.; Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 3rd edition, pp. 2344.

Schafer, M.R.; Kohn, L.M. 2006. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 98(4):593-597.

Sirjusingh, C.; Kohn, L.M. 2001. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology Notes* 1(4): 267-269.

Teran, H.; Lema, M.; Schwartz, H.F.; Duncan, R.; Gilbertson, R.; Singh, S.P. 2006. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. Ann. Rep. Bean Improvement Cooperation. 49: 115-116.

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

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

ARTIGO 4

Viabilidade da detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de algodão e girassol, por meio da técnica de PCR convencional

Willian Luís Antônio Zancan¹, José da Cruz Machado²

^{1,2}Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras 37200-000, MG, Brasil

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum, causal agent of white mold may occur on many economically important crops and weeds, causing variable reductions in productivity in those species. One of the major ways of the disease dissemination is through use of infected seeds by mycelium of the fungus. Thus, the health quality of seeds should be checked by means of adequate techniques to detect this kind of infection by the pathogen. The objective in this study was to evaluate the specificity and sensitivity of conventional PCR in the detection of *S. sclerotiorum* in sunflower and cotton seeds. Seeds of both crops were artificially inoculated with the osmotic techniques described in literature, by which seeds are exposed to the pathogen colonies for 24, 48, 72 and 96 hours, corresponding these periods to inoculum potentials: P1, P2, P3 and P4, respectively. To obtain samples of sunflower and cotton seeds with different incidence percentages, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 5 and 10% of the pathogen, healthy seeds were mixed with infected seeds at different proportions for each inoculum potential. By this technique it was possible to detect the presence of the *S. sclerotiorum* at the lowest inoculum potential and incidence with reproducibility. From the results of this investigation it turns out clear that the use of conventional PCR technique is viable for detecting *S. sclerotiorum* in sunflower and cotton seed samples and its recommendation to certification programs could be considered after validation of the protocol by the correspondent official authorities in the country.

Keywords: Conventional PCR. White mold. Sensibility. Seeds.

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum, agente causal do mofo-branco, pode ocorrer em muitas culturas de importância econômica e em plantas daninhas, causando reduções na produtividade e contaminações do solo. Uma das principais formas de disseminação da doença é por meio de sementes infectadas pelo micélio do fungo. Desta forma, a presença deste tipo de inóculo nas sementes é um alvo a ser considerado nas análises sanitárias de amostras de sementes submetidas a análises em laboratório. O objetivo, neste trabalho, foi avaliar a sensibilidade da técnica de PCR convencional na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e girassol. Foram utilizadas sementes destas espécies inoculadas artificialmente por meio da técnica de condicionamento osmótico, pela qual as sementes são expostas ao patógeno por 24, 48, 72 e 96 horas, correspondendo aos potenciais de inóculo P1, P2, P3 e P4, respectivamente. Para se obter amostras de sementes de girassol e algodoeiro com diferentes níveis de incidência do patógeno, sementes sadias foram misturadas com sementes infectadas, gerando níveis diferenciados de incidência de 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10%, para cada potencial de inóculo. Por meio da técnica de PCR convencional foi possível detectar a presença do fungo *S. sclerotiorum* no menor potencial de inóculo e menor incidência do mesmo nas sementes de ambas as espécies estudadas, com reprodutibilidade. Dessa forma, a técnica de PCR convencional pode ser considerada uma alternativa eficaz e viável de detecção do agente do mofo-branco em sementes de algodão e girassol, podendo ela ser utilizada como parte de um esquema de screening em programas de certificação no país.

Palavras-chave: PCR convencional. Mofo-branco. Sensibilidade. Sementes.

INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente etiológico do mofo-branco é um patógeno altamente destrutivo, capaz de infectar espécies de grande importância econômica. Além de ser um fungo polífago, que infecta 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras, a sua ocorrência tem sido relatada tanto em regiões temperadas como nas tropicais e subtropicais (Bolton et al., 2006), podendo inviabilizar o plantio nas áreas de cultivo por períodos de até 10 anos (Boland & Hall, 1994).

Epidemias causadas por *S. sclerotiorum* na cultura de girassol têm sido responsáveis pela redução de produtividade em vários países, com perdas que chegam a 100%, sob condições favoráveis (Leite, 2005), enquanto na cultura do algodoeiro a doença foi relatada em 1996 (Charchar et al., 1999) e encontra-se disseminada pelas principais regiões produtoras, tanto em áreas irrigadas como em áreas de sequeiro (Chitarra, 2007).

O controle do mofo-branco em diversas espécies hospederias tem sido dificultado pela falta de medidas eficazes de controle, como uso de cultivar resistente e pela complexidade do ciclo biológico do patógeno. Contudo, o uso de sementes com qualidade sanitária comprovada tem sido uma das principais medidas de manejo da doença, pelo fato de que sementes portadoras do inóculo deste patógeno, na forma de micélio dormente ou na forma de escleródios em mistura nos lotes de sementes, podem ser um fator de introdução e reintrodução do mesmo em campos de cultivo (Tu, 1988; Henning, 2004; Leite, 2005; Botelho et al., 2013).

Em razão de sua natureza biológica complexa e ampla disseminação, *S. sclerotiorum* tem sido enquadrado, no Brasil, como uma praga não quarentenária regulamentada, havendo uma proposta de padrão zero para o mesmo em

amostras de sementes submetidas para análise em laboratório (Machado & Pozza, 2005; Machado, 1994).

Os métodos convencionais utilizados para a detecção de *S. sclerotiorum* incluem a incubação de sementes em substrato de papel ou método do papel de filtro (*blotter test*) e a incubação de sementes em meio semisseletivo ágar-bromofenol, conhecido como NEON (Nasser et al., 1999; Machado, 2002; Peres et al., 2002; Napoleão et al., 2006). Ambos os métodos são recomendados, pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), para a detecção do patógeno em sementes, porém, alguns inconvenientes, como o período longo de incubação e dificuldades de distinção de *S. sclerotiorum* e demais organismos também presentes nas sementes, ainda limitam o uso dos mesmos.

Os métodos moleculares baseados na técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) têm sido investigados para a detecção de diferentes patógenos em sementes cujas propriedades morfológicas sejam similares (Mbofung & Pryor, 2010; Glynn & Edwards, 2010; Consolo et al., 2009). Estas técnicas mostram-se promissoras e têm sido empregadas para o desenvolvimento de testes de sanidade de sementes (Jaccoud Filho et al., 2002; Taylor et al., 2006).

O objetivo, neste estudo, foi avaliar a especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR convencional na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e girassol, artificialmente infectadas.

MATERIAL E METODOS

Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos

Os isolados de *S. sclerotiorum* utilizados neste estudo foram provenientes de sementes de girassol e de algodoeiro, coletadas no município de Lavras, MG (CMLAPS 250) e Campo Verde, MT (CMLAPS 246), respectivamente, pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras. Inicialmente, os isolados foram cultivados em meio BDA (15 g de ágar, 39 g de dextrose/L de água destilada) com incubação a 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Para os demais fungos escolhidos neste estudo para verificar a especificidade do par de primers, tais como *Colletotrichum gossypi*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata* a incubação foi feita à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após o crescimento de cada isolado, o micélio produzido superficialmente foi raspado, lavado com água esterelizada, seco e armazenado em nitrogênio líquido, para posterior extração de DNA.

Procedimento de inoculação de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e girassol

Sementes de algodão e girassol, das cultivares Delta Opal e Helio 253, respectivamente, foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1%, durante 2 minutos e enxaguadas em água destilada. Em seguida, foram secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest, durante 48 horas. As sementes de ambas as espécies foram inoculadas com os isolados de *S. sclerotiorum*, pela técnica de condicionamento osmótico descrita por Costa et al. (2003) e Machado et al. (2012). De maneira simplificada, a técnica consiste no cultivo inicial dos fungos em meio BDA contendo restritor hídrico manitol, ajustado a -1,0 MPa

(algodoeiro) e -1,4 MPa (girassol), de acordo com o software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). As placas foram mantidas em incubação, a 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por 5 dias, ocasião em que as sementes foram depositadas em camadas simples sobre as colônias dos isolados de *S. sclerotiorum*, permanecendo por diferentes períodos de exposição: 24, 48, 72 e 96 horas, que correspondem aos potenciais de inóculo, P1, P2, P3 e P4, respectivamente. Em seguida, as sementes infectadas foram secas em câmara de fluxo laminar, para posterior mistura com sementes sadias.

Obtenção de diferentes níveis de incidência de *S. sclerotiorum* e extração de DNA

Para determinar a sensibilidade de detecção de *S. sclerotiorum*, quando associadas às sementes por meio da técnica PCR convencional, grupos de 400 sementes foram preparados misturando-se sementes artificialmente infectadas com sementes sadias, gerando níveis diferenciados de incidência de 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10,0%, para cada potencial de inóculo. As amostras de sementes de algodão e girassol, de cada nível de incidência, foram moídas separadamente em moinho A11 Basic IKA, contendo nitrogênio líquido. Em seguida, extraiu-se o DNA com Wizard Genomic DNA Purification kit, seguindo o protocolo do fabricante (Promega). Para cada nível de incidência de sementes em cada potencial de inóculo, foram realizadas cinco extrações de DNA e o experimento conduzido em quintuplicata. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro Nano Drop 3300 (Thermo Scientific).

Condições do PCR convencional

Para a amplificação dos fragmentos de 278 pares de base, foi utilizado o par de *primers* específicos para a detecção de *S. sclerotiorum* confeccionados por Freeman et al. (2002), SSFWD Forward

(GCTGCTCTTTTCGGGGCCTTGTA) e SSREV Reverse (TGACATGCACTCAATACCAAGCTG). Para o PCR convencional, utilizou-se o volume total de reação de 25 μ L, com o Top Taq Master Mix (Qiagen), com 0,625 μ M de cada *primer* e 2 μ L do DNA molde (50 ng). As amplificações foram feitas no termociclador Multigene, Labnet, NJ, USA. Avaliou-se uma alíquota de 10 μ l de cada produto da PCR em gel de agarose 1,0% em tampão TBE, a 90 V, por, aproximadamente, 1 hora. O gel foi corado com Gel Red (Biotium) e os produtos da PCR foram observados em transluminador UV L-PIX – Transiluminator (Loccus- Biotecnologia, Brasil).

As condições do ciclo para a amplificação foram de 95 °C, por 10 minutos, seguidas de um total de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, realizando-se a técnica de “touchdown” nas temperaturas de anelamento (decrecendo 1 °C a cada ciclo de 72 °C a 65 °C), por 1 minuto e extensão de 72 °C, por 1 minuto e extensão final de 72 °C, por 10 minutos (Freeman et al., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Especificidade dos primers na detecção de *S. sclerotiorum*

A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% dos fragmentos do DNA obtidos com a amplificação em PCR entre as regiões ITS4/ITS5 (*internal transcribed spacer*) dos isolados fúngicos provenientes de diferentes culturas e regiões com os *primers* confeccionados por Freeman et al. (2002) e específicos para *S. sclerotiorum* geraram bandas de, aproximadamente, 278 pares de bases, revelando especificidade somente para os isolados em questão, independente da região e hospedeiro (Tabela 1). Em relação aos demais fungos, *Colletotrichum gossypii*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, não houve amplificação dos fragmentos de DNA.

Tabela 1 Avaliação da especificidade dos *primers*, descritos por Freeman et al. (2002), em PCR convencional (SSFWR E SSREV) com extratos de culturas puras de fungos

Número do isolado*	Localização	Hospedeiro	Amplificação** SSFWR/SSREV
CMLAPS-250	Lavras, MG	Girassol	+
CMLAPS-423	Montevidiu, GO	Girassol	+
CMLAPS-243	Uberlândia, MG	Soja	+
CMLAPS-244	Uberaba, MG	Soja	+
CMLAPS-245	Lavras, MG	Feijão	+
CMLAPS-241	Goiânia, GO	Feijão	+
CMLAPS-246	Campo Verde, MT	Algodão	+
CMLAPS 04	-	Algodão	+
CMLAPS 282	Campo Verde, MT	Algodão	-
*SI	Campo Verde, MT	Algodão	-
CMLAPS 179	Lavras, MG	Girassol	-
**SI	Patos de Minas, MG	Algodão	-

*(+) reação positiva; (-) reação negativa

** Isolados: *S. sclerotiorum* - CMLAPS 250, 423, 243, 244, 245, 241, 246, 04; *Colletotrichum gossypii* - CMLAPS 282; *Rhizopus stolonifer* - Sem identificação - SI*; *Aspergillus niger* - CMLAPS 179; *Alternaria alternata* - SI**.

De acordo com alguns autores (Yanni et al. 2009, Kim & Knudsen, 2008, Rogers et al. 2008), pares de *primers* já foram descritos com sucesso para a detecção de *S. sclerotiorum* na forma de ascósporos e em tecidos de plantas infectadas pelo patógeno. É importante ressaltar que a utilização dos *primers* relatados por Freeman et al. (2002) só teve sucesso com a utilização da técnica de PCR “touchdown”.

Para a detecção de fungos, especificamente em sementes, é necessário que, independentemente do método adotado, o par de *primers* seja testado quanto à especificidade e otimizado para o máximo de sensibilidade, tanto para a colônia pura de fungos, como para o patógeno em associação com as sementes. A variabilidade naturalmente encontrada entre isolados fúngicos da mesma espécie, porém de regiões distintas, pode ocasionar resultados contraditórios entre trabalhos de detecção, quando desenvolvidos em países distintos, como, por exemplo, o que foi relatado por Barrocas et al. (2012) para o patossistema *Stenocarpella maydis* em milho, no qual o par de *primers*, descrito como específico para o referido fungo, não foi capaz de distinguir as espécies de *S. macrospora* e *S. maydis*, as quais ocorrem em sementes de milho.

Sensibilidade na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e girassol por meio da PCR convencional

De acordo com o teste de sanidade inicial por meio da técnica de PCR convencional, blotter test e NEON, não houve incidência natural de *S. sclerotiorum* encontrado no lote de sementes de algodão e de girassol.

A alta sensibilidade do teste de PCR convencional para a detecção do patógeno em amostras de sementes de girassol e de algodão inoculadas artificialmente foi observada neste estudo, independente do potencial de inóculo e da incidência de *S. sclerotiorum*, apresentando bandas correspondentes a 278 pares de base. A técnica utilizada apresentou reprodutibilidade na detecção de

amostras no menor potencial de inóculo, correspondente a 24 horas de contato das sementes com o fungo (Figura 1). Na menor incidência de contaminação do fungo em teste, ou seja, uma semente infectada em uma amostra composta por 400 sementes, foi possível detectar *S. sclerotiorum* em todas as cinco repetições de todos os potenciais de inóculo avaliados. Este fato confirma a maior sensibilidade da técnica do uso de PCR convencional.



Figure 1 Amplificação do DNA genômico de *S. sclerotiorum* por PCR convencional, em diferentes níveis de incidência em sementes de algodoeiro. Linha M – 100 bp ladder DNA (QUIAGEN GelPilot, E.U.A). Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam a amplificação do DNA genômico de *S. sclerotiorum* na incidência de 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10%, respectivamente, no potencial de inóculo P1; linhas 7, 8, 9, 10, 11 e 12 correspondentes às incidências 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10%, no potencial de inóculo P2; linhas 13, 14, 15, 16, 17 e 18 correspondente às incidências 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10%, no potencial de inóculo P3; Linhas 19, 20, 21, 22, 23 e 24 correspondente às incidências 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10%, no potencial de inóculo P4; Linha 25 - sementes sadias; linha 26 - cultura pura de *S. sclerotiorum* (CMLAPS 246)

É importante destacar que estes resultados podem ser considerados satisfatórios e promissores no tocante a futuros desdobramentos sobre a utilização desta tecnologia em programas de certificação de sementes. A detecção de *S. sclerotiorum* foi, portanto, observada em sementes com baixos potenciais de inóculo e em baixa incidência. Vale salientar que, na ausência de informações de pesquisas, 400 sementes de algodão e de girassol são analisadas

por amostra de acordo com as Regras para Análise de Sementes no país (Brasil, 2009).

A detecção molecular de *S. sclerotiorum* em sementes de girassol e de algodão, cujo índice de tolerância proposto em amostras no Brasil tem sido zero (Oliveira, 2005), pode ser uma medida das mais valiosas, se for recomendada como um procedimento de *screening* inicial, no intuito de indicar a presença ou a ausência do patógeno neste material. Neste caso, somente as amostras com resultados positivos deverão ser submetidas em sequência aos métodos biológicos já disponíveis para o patógeno em foco, como o método de rolo de papel e o uso da incubação em substrato de ágar com azul de bromofenol, conforme já tem sido relatado em trabalhos anteriores (Machado et al., 2002; Peres et al., 2002). Este fato vem ao encontro do que se tem procurado, em termos de viabilização dos testes de sanidade de sementes para os patógenos que são considerados de risco em cultivos como do algodão e do girassol.

Para uma melhor comprovação destes resultados, é recomendável que novos ensaios sejam conduzidos, lançando-se mão de ocorrências naturais de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes procedentes de diferentes regiões produtoras no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; ALMEIDA, M. F.; BOTELHO, L. S.; VON PINHO, E. V. R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp associated to maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, 2012.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 1-16, 2006.
- BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras de análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS Brasília, DF, p. 399, 2009.
- CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N.; OSSUPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, 1999.
- CHITARRA, L. G. **Mofa Branco em Algodoeiro**. Campina Grande, PB, 2007 (Comunicado Técnico, 336).
- CONSOLO, V. F.; ALBANI, C. M.; BERÓN, C. M.; SALERMO, G. L.; CORDO, C. A. A convencional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. **Australasian Plant Pathology** v.38, p.222-227, 2009.
- COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARAES, 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.

FREEMAN, J.; WARD, E.; CALDERON, C. McCARTNEY. A polimerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 877-886, 2002.

GLYNN, N. C.; EDWARDS, S. G. Evaluation of PCR assay for quantifying seed-borne infection by *Fusarium* and *Microdochium* seedling blight pathogens. **Applied Microbiology**, v. 108, p. 81-87, 2010.

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

JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; TAYLOR, E.; BATES, J.; LEE, D.; MORAIS, M. H. Diagnose molecular de fungos em sementes. In: Wilmar C. da Luz (Org.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 10, p. 287-331, 2002.

KIM, T. G.; KNUDSEN, G. R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 100-108, 2008.

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

MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; COSTA, M. L. N.; GUIMARAES, R. M.; MACHADO, C. F. Uso da técnica de restrição hídrica ou “condicionamento osmótico” em patologia de sementes. In: Wilmar C. da Luz (Org.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: RAPP, v. 20, p. 37-63, 2012.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 2002.138p.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. In: Wilmar C. da Luz (Org.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 229-264, 1994.

MBOFUNG, G. C.; PRYOR, B. M. A PCR-Based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. **Plant Disease**, v. 94, n. 7, p. 860-866, 2010.

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

NASSER, L. C. B.; ARANCIBIA, R. C.; NAPOLEAO, 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.

OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo do mofo branco**. DBO Agrotecnologia, v. 2, n. 4, p. 8-12, 2005.

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, p. 123-127, 2002.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculums of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, p. 324-331, 2008.

TAYLOR, E.; BATES, J.; JACCOUD, D. Diagnosis of Seedborne Pathogen. In: Barsa, A.S. (Ed.). **Handbook of seed science and technology**. Binghamton: Food Product Press, 2006. p. 649-675.

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

YANNI, Y.; DING, L.; LIU X.; YANG J.; MA, Z. Detection of *Sclerotinia sclerotinia in planta* by a real-time PCR assay. **Journal of Phytopatolgy**, v. 157, p. 465-469, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência explosiva de doenças causadas por *S. sclerotiorum* em diversas espécies de interesse agrônômico no Brasil tem sido causa de grande preocupação por parte dos produtores rurais e dos pesquisadores brasileiros, tendo em vista as consequências que esse fato provoca em relação à sustentabilidade do agronegócio destas culturas e pelo fato de não se dispor de material resistente e de outras medidas que possam se contrapor a este avanço surpreendente.

Por se tratar de um patógeno com ampla gama de hospedeiros e que pode permanecer nas áreas de ocorrência por muitos anos, é preciso que um conjunto de medidas de controle seja aplicado com rigor pelos agricultores e demais membros que atuam na cadeia de produção das culturas suscetíveis a tal patógeno. Neste contexto, o uso de sementes livres de inóculo do patógeno surge como uma das medidas principais visando impedir a introdução da doença em áreas que estejam isentas delas, bem como a sua disseminação a longas distâncias.

De maneira geral, o nível de conhecimento sobre o mofo-branco nas condições brasileiras tem sido aprofundado para algumas culturas, como a soja e o feijão. Entretanto, ainda é considerado baixo para outras espécies cujo cultivo vem se tornando popular em diversas regiões do país, em vista das alternativas que a agricultura oferece, em face de uma demanda cada vez maior por produtos destinados à produção de alimentos e de biocombustível.

Embora o sistema de plantio direto tenha sido desenvolvido e vem se constituindo em uma alternativa das mais vantajosas na exploração de diversas espécies de cultivos mais extensivos, principalmente em áreas de cerrado, percebe-se que o descuido em algumas etapas de condução deste sistema vem colocando em risco o seu sucesso em diversas regiões de agricultura intensiva. O

uso de sementes sem comprovação de qualidade sanitária é, certamente, uma das causas de introdução e acúmulo de inóculo de agentes fitopatogênicos, ao longo dos anos, que, atualmente, são considerados obstáculos dos mais difíceis de serem superados a curto prazo.

Especificamente para o caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, o fato de ter se negligenciado, por muitos anos, a qualidade sanitária de sementes, faz com que uma profunda reavaliação das estratégias em uso tenham que ser revistas, principalmente diante dos resultados de análises sanitárias de sementes de soja e de feijão nestes últimos anos, pelos quais uma preocupante proporção de lotes comercializados para sementes destas culturas tem sido portador do inóculo do patógeno no interior das sementes na forma de micélio dormente. Conforme já sinalizado por TU (1998), a má qualidade do beneficiamento de lotes de soja destinados a plantio tem sido também causa de disseminação da doença de forma avassaladora, conforme levantamentos recentes realizados por pesquisadores da Embrapa e de outras instituições envolvidas nessas atividades.

Portanto, o desenvolvimento de estudos sobre as relações de *S. sclerotiorum* com sementes de algodão e de girassol, que já se encontram comprometidas pelo avanço da referida doença em áreas favoráveis para o cultivo das mesmas, torna-se necessário e emergencial. O conhecimento até então disponível sobre o referido tipo de interação é apenas especulativo e muitas informações são extraídas por analogia com outros patossistemas.

Neste trabalho, os alvos de estudo foram voltados para a quantificação de efeitos potenciais e transmissão de *S. sclerotiorum* em associação com sementes de algodão e de girassol na forma de micélio dormente, sob condições controladas, além da checagem da viabilidade de emprego de técnicas moleculares, por meio de PCR, na detecção do patógeno em sementes destas espécies. Outro alvo foi avaliar o grau de variabilidade de isolados de *S.*

sclerotiorum procedentes de feijoeiro infectado e cultivado em diferentes regiões no Brasil.

Os efeitos potenciais de *S. sclerotiorum* na germinação e no vigor das plantas de duas cultivares de algodão (Artigo 1) foram evidenciados e quantificados, havendo variações entre as temperaturas de cultivo e entre potenciais de inóculo inicial nas sementes. Sob as condições mais favoráveis para o desenvolvimento da doença, as reduções na germinação de sementes infectadas foram da ordem de 6% e, para velocidade de emergência, as reduções foram, em média, de 2,2 para as duas cultivares utilizadas neste estudo. Em relação a estandes, as reduções foram igualmente drásticas e proporcionais com o aumento do potencial de inóculo. Em relação à taxa de transmissão potencial do patógeno pelas sementes, o maior valor chegou a 84,9%, para a cultivar mais suscetível na temperatura de 20 °C e no potencial de inóculo mais elevado.

Para o patossistema *S. sclerotiorum*-girassol (Artigo 2), os efeitos potenciais do fungo no desempenho de sementes infectadas na forma micelial seguiram a mesma tendência e intensidade do patossistema envolvendo algodão. Chama a atenção nestes estudos a ausência de *S. sclerotiorum* nos tecidos de plantas emergidas de sementes tanto de girassol como de algodão inoculadas pela técnica de condicionamento osmótico. Pela avaliação da transmissibilidade potencial do fungo pelas sementes de girassol, a maior taxa foi de 77,2% e a menor, de 35%. A exemplo do que ocorre com o algodão, o uso de sementes de girassol infectadas pelo agente do mofo-branco constitui, portanto, um alto risco para os agricultores, sendo esta fonte de inóculo um dos fatores que mais comprometem a continuidade desse tipo de cultivo.

Sobre variabilidade de populações de *S. sclerotiorum* associadas ao feijoeiro e procedentes de diferentes regiões no país (Artigo 3), observou-se que os isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram grande variação em relação aos quesitos referenciados para este tipo de comparação. Pelos marcadores

moleculares e a compatibilidade vegetativa empregados neste estudo, não houve correlação entre os isolados, bem como em relação aos demais marcadores, como agressividade e comportamento na presença de fungicidas *in vitro*. Estes resultados, ao lado de outros já relatados em literatura, evidenciam a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos neste tema. Chamaram a atenção, no entanto, as diferenças expressivas entre alguns isolados, no tocante à agressividade ao feijoeiro utilizado neste trabalho.

Para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de algodão e de girassol, tem-se lançado mão das metodologias já desenvolvidas para sementes de soja e de feijão. A exemplo do que ocorre com estas espécies, o grande número de análises que pode ser demandado em determinadas épocas do ano faz com que estas metodologias apresentem limitações de natureza operacional. Para contornar estas dificuldades, o uso de PCR convencional, conforme já tem sido investigado para sementes de soja e feijão, mostrou-se promissor e adequado para uso em sementes de algodão e de girassol (Artigo 5). A sensibilidade do método para ambas as espécies de sementes foi de 0,25%, ou seja, a detecção foi positiva em uma semente em mistura com 399 sementes sadias. Uma vez aferida, esta tecnologia pode ser utilizada em programas de certificação, no intuito de realizar um *screening* de amostras infectadas por *S. sclerotiorum*, sendo avaliadas depois, pelos métodos biológicos, apenas as amostras cuja indicação por PCR convencional foi positiva. Cabe, neste caso, uma discussão mais ampla pelos segmentos que compõem o setor sementeiro no país.