

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUÇÃO DE INÓCULO E SOBREVIVÊNCIA DE**  
*Sclerotinia sclerotiorum*

**RICARDO BRUSTOLIN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, setembro de 2012

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUÇÃO DE INÓCULO E SOBREVIVÊNCIA DE**  
*Sclerotinia sclerotiorum*

**RICARDO BRUSTOLIN**

**Orientador: Prof. Ph.D. Erlei Melo Reis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, setembro de 2012



FAMV - Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária  
PPGAgro - Agronomia



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Produção de inóculo e sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum*”

Elaborada por

Ricardo Brustolin

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 19/09/2012  
Pela Comissão Examinadora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Erlei M. Reis'.

Dr. Erlei Melo Reis  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientador

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Simone M. Basso'.

Dra. Simone Meredith Scheffer Basso  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Louise Larissa May De Mio'.

Dra. Louise Larissa May De Mio  
UFPR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hélio Carlos Rocha'.

Dr. Hélio Carlos Rocha  
Diretor FAMV

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'David Souza Jaccoud Filho'.

Dr. David Souza Jaccoud Filho  
UEPG

CIP – Catalogação na Publicação

---

B912p    Brustolin, Ricardo  
          Produção de inóculo e sobrevivência de *Sclerotinia*  
          *sclerotiorum* / Ricardo Brustolin. – 2012.  
          107 f. : il. ; 25 cm.

          Orientador: Prof. Dr. Erlei Melo Reis.  
          Dissertação (Mestrado em Agronomia) –  
          Universidade de Passo Fundo, 2012.

          1. Soja - Doenças e danos. 2. Soja - Sementes. 3.  
          Fitopatologia. I. Reis, Erlei Melo, orientador. II. Título.

          CDU: 633.34

---

Catálogo: Biblioteca Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo o que tenho e conquistei e pela constante presença.

A professora Simone Meredith Scheffer-Basso pelo incentivo inicial em atuar na pesquisa, pela primeira bolsa de iniciação científica, pelos ensinamentos, dedicação no meu desenvolvimento pessoal, na pesquisa, na informática, na estatística, e pelos conselhos de amiga.

Ao meu Orientador, Dr. Erlei Melo Reis, pela orientação, incentivo, oportunidade de conhecer a realidade da área de fitopatologia no Brasil e outros países, palavras positivas e acima de tudo pela amizade.

Aos meus pais, Arcilio e Ilda, pelo exemplo de pessoas humildes e honestas, pela incansável dedicação, força, apoio e acima de tudo pelo amor.

A minha irmã Ângela pelos conselhos, incentivo a cursar a faculdade de Agronomia, pela paciência, dedicação e presença em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Roberto pela dedicação e que sempre esteve do meu lado,

Ao meu cunhado Erich pela pessoa humilde e acolhedora que trouxe mais luz a nossa família e minha cunhada Suélen, minhas sobrinhas, Marthina e Gabriela por serem meu porto seguro.

A minha namorada, Leandra Vicentina Leite, Pelo amor, incentivo, paciência, compreensão e entusiasmo.

Aos meus nonos Albino L. Scariot e Ângela Tomazini Scariot (*in memoriam*) que junto com meus pais me ensinaram os verdadeiros valores da vida.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, professores e funcionários, pelo auxílio e dedicação.

Aos professores convidados para a banca examinadora: professor Dr. David de Souza Jaccoud Filho e professoras Dr. Loise Larissa May De Mio e Dr. Carolina Deuner.

À Cinara Cardoso, Elaine Deuner e ao Paulo Tironi, pela colaboração no trabalho e pela amizade.

Aos principais colaboradores ao desenvolvimento deste trabalho: Lucas Pedron, Roberto Luis De Rossi, Gian Beledelli, Eder Junior

Aos demais estagiários do Laboratório de Fitopatologia:

Felipe Dalavechia, Bruna Pollo, Cristina Boaretto.

Às grandes amizades decorrentes do curso de Pós-Graduação, Roberto Luis De Rossi, Sandra M. Zoldan, Camila Turra, Eduardo Viana, Anderson Danelli, Aveline Avozani, Rosane Tonin, Camila Ranzi, Juliane N. Camera, Lilian Cerbaro, Jônata Galvan, Leandro Costa, Wanessa Escopel, Lucas Zernielli e Julio Franz.

Aos amigos que sempre me apoiam: Maria Tereza Bolzon Soster, Ricardo Maran, Luciano Remor, Sérgio Antônio, Laércio Luiz Hoffmann, Fernando Brustolin, Guilherme Menegatti, Alex Inocente e Jorge Buch.

A todas as pessoas que ou pela amizade ou pela dedicação, contribuem à minha formação profissional e pessoal.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1 Nomes comuns.....	6
2.2 Ocorrência.....	7
2.3 Danos.....	8
2.4 Hospedeiros.....	8
2.5 Etiologia e sistemática.....	8
2.6 Ciclo das relações <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em soja...	12
2.6.1 Sobrevivência (escleródios).....	13
2.6.2 Sobrevivência (sementes).....	14
2.6.3 Transmissão semente - cotilédono.....	15
2.6.4 Restos culturais.....	17
2.6.5 Germinação carpogênica dos escleródios.....	17
2.6.6 Liberação e transporte do inóculo.....	20
2.6.7 Disseminação.....	21
2.6.8 Deposição e penetração.....	21
2.6.9 Colonização.....	23
2.7.0 Sintomatologia.....	25
2.8 Ciclos secundários.....	25
2.9 Fatores ambientais e a doença.....	26
3.0 Controle.....	27
<b>CAPÍTULO I</b>	
Comparação de métodos para a produção in vitro de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	32
<b>RESUMO</b> .....	32
<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
2.1 Isolamento monospórico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	36
2.2 Preparos dos substratos, inoculação e incubação.....	37

2.3 Colheita dos escleródios.....	39
2.4 Avaliações .....	39
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>

## CAPÍTULO II

Comparação de métodos para indução da germinação carpopogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	49
<b>RESUMO.....</b>	<b>49</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>50</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
2.1 Obtenção dos escleródios.....	55
2.2 Preparo dos substratos para a indução da germinação carpopogênica de escleródios.....	56
2.3 Avaliações.....	57
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>

## CAPÍTULO III

Longevidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na superfície do solo em condições de campo.....	62
<b>RESUMO.....</b>	<b>62</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>63</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>

## CAPÍTULO IV

Sementes de soja infectadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> : fonte de inóculo e transmissão.....	74
<b>RESUMO.....</b>	<b>74</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>75</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>80</b>
2.1 Isolamento monospórico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	80
2.2 Inoculação artificial de sementes de soja e incidência da infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	81
2.3 Inoculação de sementes para avaliação da transmissão	

semente-plântula.....	82
2.4 Transmissão semente-plântula em ambiente controlado.....	83
2.5 Transmissão semente-plântula no campo.....	84
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
3.1 Inoculação artificial de sementes de soja e incidência da infecção por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	86
3.2 Transmissão semente-plântula em ambiente controlado.....	88
3.3 Transmissão semente-plântula no campo.....	91
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

### LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>		
1	Longevidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> citados na literatura.....	13
<b>CAPÍTULO I</b>		
1	Substratos (métodos/meios) testados para produção de escleródios.....	38
2	Condições de ambiente para a incubação em cada método.....	39
3	Massa (g) total de escleródios produzida nos substratos.....	41
4	Massa (g) total dos escleródios retidos nas peneiras com malha de 4, 2,5 e 1 mm.....	42
5	Número de escleródios por grama de escleródios retidos nas peneiras com malha de 4, 2,5 e 1mm.....	44
6	Massa (g) de escleródios produzidos por grama de substrato e retidos nas	

	peneiras com malha 4, 2,5 e 1mm.....	45
<b>CAPÍTULO II</b>		
1	Combinação dos tratamentos do ensaio bifatorial.....	55
2	Germinação carpogênica (%) de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos.....	58
3	Germinação micéliogênica (%) de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos.....	59
4	Número de apotécios por escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos.....	60
5	Número total de apotécios formados por unidade experimental (gerbox) durante 60 dias, em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos.....	61
<b>CAPÍTULO III</b>		
1	Registro das variáveis ambientais durante a condução do experimento.....	71
<b>CAPÍTULO IV</b>		
1	Registro das variáveis ambientais durante a condução do experimento.....	85
2	Efeito da infecção de sementes na emergência de plântulas de soja e formação de escleródios a partir de sementes não germinadas.....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>		<b>Página</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>		
1	Sintomas e sinais do mofo-branco em hastes de soja, causados por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	7
2	Conjunto de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	10
3	Escleródios germinados com a formação de apotécios.....	11
4	Escleródios (a) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , germinado, asca com ascosporos (c), paráfise (c) e ascosporo (d).....	11
5	Monociclo do mofo-branco causado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em soja <i>Glycine max</i> .....	12
6	Escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> misturados e comparados com sementes de nabo-forrageiro.....	13
7	Viabilidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> posicionados na superfície do solo e enterrados a 10 cm.....	14
8	Sementes e resíduo de soja oriundo de equipamento de pré-limpeza, com presença de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	15
9	Semente de soja colonizada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e posterior formação de escleródios quando semeada no solo.....	16
10	Escleródios deixados na superfície do solo após a colheita mecanizada.....	17
11	Nuvem de ascosporos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> liberada violentamente pela expulsão dos ascosporos das ascas	

	(balistosporia).....	20
12	Sintomas e sinais iniciais da infecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> de hastes (axilas) e sua relação com a presença de pétalas.....	22
13	Infecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na porção inferior das hastes.....	24
14	Massa miceliana e formação de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , na superfície da haste e na medula.....	24
15	Sintomas de plantas mortas pelo mofo-branco em lavoura de soja.....	27
 <b>CAPÍTULO III</b>		
1	Longevidade (meses) de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na superfície do solo em condições naturais.....	68
 <b>CAPÍTULO IV</b>		
1	Infecção de sementes de soja com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em diferentes tempos de exposição ao micélio.....	88

**PRODUÇÃO DE INÓCULO E SOBREVIVÊNCIA DE**  
*Sclerotinia sclerotiorum*

**RICARDO BRUSTOLIN<sup>1</sup>**

**RESUMO** – O mofo-branco da soja, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), tornou-se uma doença importante em diferentes regiões do Brasil, em especial naquelas com ambiente favorável, causando perdas ao agronegócio brasileiro. A experiência de outros países que convivem com este patógeno, é de fundamental importância para o Brasil, mas é preciso conhecer o comportamento de isolados do Brasil, para direcionar estratégias de manejo de acordo com os diferentes sistemas de produção. Desta forma os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar o melhor método para produção de escleródios; (ii) determinar o melhor método para a indução da germinação carpôgenica; (iii) quantificar a longevidade de escleródios, produzidos em plantas de soja; (iv) desenvolver a metodologia para inoculação artificial de sementes de soja e quantificar a transmissão para a parte aérea via cotilédones, e a formação de escleródios no interior do solo pelo micélio colonizando as sementes. Os ensaios foram desenvolvidos na Universidade de Passo Fundo durante o ano de 2011 a junho de 2012. Foram comparados quatro métodos para a produção de escleródios com diferentes substratos nutritivos adicionados ou não de farinha de milho

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

(FM). Os escleródios produzidos nos dois melhores métodos foram selecionados, juntamente com escleródios formados sobre meio em substrato composto por areia saturada e ágar-água. No ensaio da longevidade os escleródios foram expostos a condições de campo e mensalmente foi determinada a viabilidade, considerando viável os que germinaram carpogênicamente. Para obter sementes infectadas artificialmente foi avaliado a exposição das sementes sobre micélio de Ss em quatro tempos (12, 24, 36 e 48 horas). As sementes infectadas foram identificadas utilizando-se o meio de NEON-S em ensaio realizado em ambiente climatizado e a campo para quantificar a transmissão via lesão cotiledonar e a formação de escleródios a partir de sementes não germinadas. Os melhores métodos para produção de escleródios foram os compostos por grãos de trigo mesclados com perlita grossa com e sem presença de FM respectivamente. Estes escleródios foram selecionados, juntamente com escleródios formados sobre meio de cultura, e germinaram carpogênicamente em maior número total de apotécios por escleródios, no substrato de areia saturada quando comparado com o substrato ágar-água (A/A). No ensaio de sobrevivência no campo, constatou-se que escleródios depositados na superfície do solo, simulando o sistema de plantio direto, perderam a viabilidade com 12 meses. As sementes de soja podem ser inoculadas artificialmente com exposição por 48 horas sobre o micélio do fungo em placas de Petri. Comprovou-se que as sementes infectadas, não germinadas, podem formar até 2,18 escleródios por semente, no interior do solo, em ambiente controlado. No campo, não houve a formação devido ao déficit hídrico. Tanto em câmara de crescimento,

como no campo, não foi comprovada a transmissão via lesão cotiledonar.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, escleródios, ascosporos, infecção, sementes.

### **INOCULUM PRODUCTION AND SURVIVAL OF *Sclerotinia sclerotiorum***

**ABSTRACT** - The white mold of soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), has become an important disease in different growing regions of Brazil, especially in those with favorable environment, causing losses to the Brazilian agribusiness. The experience of other countries who live with this pathogen is of fundamental importance for Brazil, but we need to know the behavior of isolates from the country, to direct management strategies according to different production systems. Thus the objectives of this study were to: (i) determine the best method for sclerotia production, (ii) determine the best method to induce carpogenic germination (iii) quantify the longevity of sclerotia produced in soybean; (iv) develop a methodology for artificial inoculation of soybean seeds and quantify the transmission to stems via the cotyledons, and the formation of sclerotia in the soil by the mycelium colonizing the seeds. The experiments were conducted at the University of Passo Fundo during the years 2011 to June 2012. Four methods for sclerotia production in different nutritive substrates, added or not to corn flour (CF) were compared. These sclerotia were selected, together with those formed

on the PDA medium and with carpogenic gemination and the greatest number of apothecia by sclerotia, in sand substratum saturated with water when compared to the water-agar (A/A). In the longevity test the sclerotia were exposed to field conditions and their viability determined at a monthly intervals, where those that germinated producing apothecia were considered viable. For artificially seed infection seeds were exposed to Ss mycelium for four times (12, 24, 36 and 48 hours). Infected seed was identified by plating on NEON-S medium and used in growth chamber and in the field work to quantify the cotyledonary transmission by the presence of lesions and sclerotia formation by non-germinated seeds. The best methods for sclerotia production were wheat grains mixed with coarse perlite with and without the presence of CF. These sclerotia were selected, together with those formed on the culture medium, and that germinated carpogenically with a great total number of apothecia per sclerotia, on the sand saturated with water when compared to the substrate water-agar (A/A). In the longevity experiment in the field, it was shown that sclerotia deposited on the soil surface, simulating the no till system, lost their viability after 12 months. Soybean seeds can be artificially inoculated with 48 hours of exposure to the fungus mycelium in Petri dishes. It was shown that infected seeds do not germinate when seeded in the soil, and they can form up to 2.18 sclerotia per seed in a controlled environment nevertheless, in the field, sclerotia were not formed due to water deficit. Both in growth chamber and in the field, cotyledonary transmission was not proved

**Key words:** *Glycine max*, sclerotia, ascospore infection, seeds.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma planta herbácea pertencente à família das Fabaceas, originária do sudoeste asiático, com relatos de seu cultivo há mais de 6 mil anos na China. Atualmente, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (BORÉM, 1999).

No Brasil, a área semeada com a cultura na safra 2011/2012 foi de 25,04 milhões de hectares e produção de 66,4 milhões de toneladas, 11,8% inferior em relação a safra anterior (CONAB, 2012).

A cultura da soja apresenta adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas além de ser considerada uma das plantas mais fáceis de ser cultivada, entretanto, seu potencial produtivo dificilmente é alcançado. Entre os fatores que limitam a obtenção de altas produtividades estão as doenças.

Segundo Sinclair & Backman (1989) são listadas mais de 100 doenças afetando a cultura, sendo que 47 foram descritas no Brasil, causando perda anual na ordem de 1,3 bilhões de dólares (SILVA, 2002). A importância de cada uma das doenças varia com o ano (ambiente), com a região, com as cultivares, com a época de semeadura e com as práticas agronômicas adotadas (SILVA, 2002).

Dentre as doenças relatadas em soja, encontra-se o mofo-branco da haste, que nas últimas safras tem aumentado em ocorrência e em intensidade em todo o Brasil, destacando-se a região dos cerrados. Por isso, se tornou numa grande preocupação aos pesquisadores e produtores de soja.

Quando se cultiva na lavoura espécies vegetais anuais de folhas largas, na mesma área e por vários anos, aumenta o inóculo no solo e os danos na produção de grãos. Por isso, se faz necessário conhecer melhor o ciclo deste patógeno através da literatura, propondo pesquisas inovadoras e com isolados do Brasil. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar o melhor método para produção de escleródios; (ii) determinar o melhor método para a indução da germinação carpôgenica; (iii) quantificar o tempo de sobrevivência de escleródios no campo coletados em plantas de soja; (iv) desenvolver a metodologia para inoculação artificial de sementes de soja e, com elas quantificar a transmissão para a parte aérea via cotilédonar, assim como a formação de escleródios, no interior do solo, pelo micélio colonizando as sementes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Nomes comuns**

Esta doença recebe várias denominações populares. Em inglês é chamado de “white mold” e “sclerotinia stem rot”. Em português é chamado de mofo-branco (Figura 1), podridão branca-da-haste ou esclerociniose. O nome de mofo-branco é o que melhor contribui para a diagnose da doença (REIS et al., 2011a).



Figura 1. Sintomas e sinais do mofo-branco em hastes de soja, causados por *Sclerotinia sclerotiorum*

## 2.2 Ocorrência

Em 1921, foi relatada pela primeira vez no Brasil na cultura da batata, em São Paulo por Saccá e, posteriormente, em outros estados em diferentes hospedeiros (CHAVES, 1964). Na cultura da soja no Brasil, o primeiro relato descrito de epidemia do mofo-branco foi na década de 70 no Paraná (HENNING, 2004; YAMASHITA et al., 1978). Este fato foi confirmado também por Reis<sup>1</sup> (informação verbal) na safra de 1974/75, onde foi diagnosticado alta incidência em soja, em lavoura no município de Tapejara, RS. Ultimamente, informações pessoais de pesquisadores dão conta de sua ocorrência em quase todas as regiões onde a soja é cultivada no Brasil.

---

<sup>1</sup>REIS, E.M. (Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo - PPGAGRO/UPF - Campus Passo Fundo).

### 2.3 Danos

Nos Estados Unidos Hoffmann et al. (1998), obtiveram uma relação entre o rendimento de grãos e a incidência do mofo-branco em plantas de soja representada pela função matemática linear  $R=1000 - 6,26 I$  ( $R$  = rendimento de grãos normalizado e  $I$  a incidência em plantas), semelhante a equação gerada por Yang et al. (1999) que teve o dano representado por  $R=1000 - 8,43 I$ . No Brasil Reis et al. (2011b) também determinaram as funções de dano do mofo-branco em soja de diferentes regiões do centro oeste brasileiro, em função da incidência em plantas e obtiveram em média a equação  $R = 1000 - 6,7 I$ , que representa o dano de acordo com a incidência em plantas de soja, assim calculando para uma lavoura com 45,5% de incidência em plantas, um dano de 304,85 kg/ha a cada 1000kg/ha colhidos.

### 2.4 Hospedeiros

No site [nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm) são listados 652 hospedeiros de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. São de interesse no Brasil, os cultivados em sucessão ou rotação com a soja como algodoeiro, canola, ervilha, ervilhaca, feijoeiro, girassol, nabo-forrageiro e etc (REIS et al., 2011a).

### 2.5 Etiologia e sistemática

O mofo-branco é causado por um fungo da Classe dos Ascomycetos, Subclasse Discomycetos, Ordem Helotiales, Família

Sclerotiniaceae e ao gênero e espécie *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) (Lib.) De Bary descrito em 1837. Tem em torno de 21 sinônimos sendo o mais citado *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf & Dumont. ([nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/index.cfm))

O micélio é hialino, septado (PURDY, 1979), muito ramificado formando uma massa algodonosa na superfície dos órgãos atacados (Fig. 1) (ABAWI & GROGAN, 1979). A partir deste micélio são formados os escleródios (GRAU & HARTMAN, 1999) tanto na superfície, como no interior da haste e vagens infectadas (ALMEIDA et al., 2005), (Figura 2 e 5).

Três estágios no desenvolvimento escleródios têm sido descritos (TOWNSEND & WILLETTS, 1954): (i) iniciação (agregação de hifas para formar uma massa branca chamada de iniciais de escleródios), (ii) o desenvolvimento (crescimento de hifas e agregação adicional para aumentar o tamanho), e (iii) delimitação e maturação da superfície (a deposição de melanina nas células da casca e consolidação interna).

Uma extensa lista de fatores ambientais e nutricionais que influenciam desenvolvimento escleródios tem sido compilado (CHET & HENIS, 1975; LE TOURNEAU, 1979; WILLETTS & BULLOCK, 1992; WILLETTS & WONG, 1980).

Portanto, os escleródios são formados por um agregado de hifas com exterior preto e várias camadas de melanina. Os escleródios tem um papel importante na proteção em condições adversas e de degradação microbiana em muitos fungos (BELL & WHEELER, 1986; HENSON et al., 1999) A porção interna dos escleródios, a medula, está embutida em uma matriz fibrilar composta de hidratos de

carbono, principalmente  $\beta$ -glucanos e proteínas (LE TOURNEAU, 1979).

Escleródios de *Ss* variam drasticamente em tamanho dependendo do hospedeiro. Em girassol, por exemplo, o escleródio pode ter 1 cm de espessura e 35 cm de diâmetro, podendo apresentar as dimensões de um capítulo, enquanto que no feijão escleródios podem ser globosos, de 2-10 mm de diâmetro.

Segundo Steadman (1983), são estruturas de dormência resistentes a dessecação e medem entre 2mm a 20mm de comprimento e podem germinar de duas formas, micéliogenicamente que infecta hospedeiros, como girassol, feijão, alface e dentre outros e a germinação carpogênica, produzindo um ou mais apotécios (SCHWARTZ & STEADMAN, 1989). Segundo Steadman<sup>1</sup> (informação verbal, 2012), a infecção em plantas de soja através da germinação micéliogenica de escleródios não é importante para causar epidemias em lavouras comerciais, pois raramente ocorre.



Figura 2. Conjunto de escleródios formados na medula da soja

Segundo Bedi (1963), quanto maior o escleródio, maior o número de apotécios formados; um escleródio grande (13 x 5mm)

originou até 15 apotécios. Os apotécios são estruturas carnosas na forma de taça, com diâmetro de 0,5 – 2mm de diâmetro e sustentados por pedúnculos (estipes) (GRAU & HARTMAN, 1999) (Figura 3 e 5).



Figura 3. Escleródios germinados com a formação de apotécios

Os apotécios contém em sua parte superior, ascas cilíndricas com dimensões de 7-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 112-156  $\mu\text{m}$  de comprimento (COE, 1944; KOSASIH & WILLETTS, 1975); os ascosporos, unicelulares, em número de oito em cada asca, medem 4 – 10  $\mu\text{m}$  de largura por 9 – 16  $\mu\text{m}$  de comprimento e com paráfises ligeiramente clavadas e de largura igual às ascas (COE, 1944; KOSASIH & WILLETTS, 1975) (Figura 4).

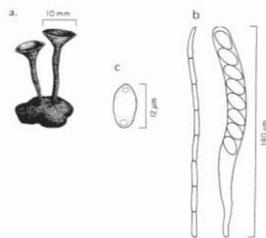
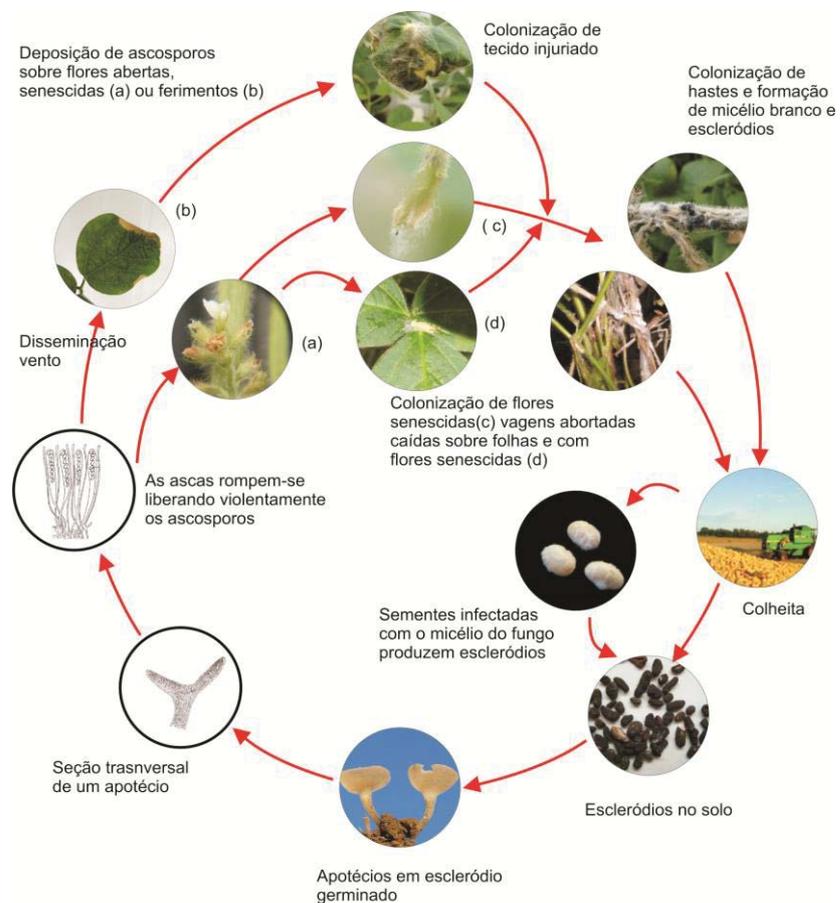


Figura 4. Escleródio (a) de *Sclerotinia sclerotiorum*, germinado, asca com ascosporos (b), paráfise (b) e ascósporo (c) (Reproduzido de Hanlin & Menezes, 1996).

## 2.6 Ciclo das relações *Sclerotinia sclerotiorum* em soja

Para entender o ciclo de uma doença é um processo cíclico e dinâmico, apresenta-se a sucessão dos eventos que ocorrem no mofo branco da cultura da soja (Figura 5).



(Fonte: REIS, DANELLI & BRUSTOLIN, 2012)

Figura 5. Monociclo do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em soja *Glycine max* (BRUSTOLIN et al. 2012).

### 2.6.1 Sobrevivência (escleródios)

Os escleródios são estruturas de sobrevivência que desempenham um papel importante no ciclo da doença, pois mantêm o inóculo ao longo do tempo, que de acordo com a literatura pode ser de anos ou meses (Tabela 1) (Figura 7).

Tabela 1. Longevidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* citados na literatura

Longevidade	Autor
11 a*	GÖRGEN et al., 2010; LEITE, 2005
8 a	ADAMS & AYERS, 1979
3 a 5 a	MCLEAN, 1958; SHWARTZ & STEADMAN, 1978
Mínimo 3 a	COOK et al., 1975
Mínimo 2 a	COLEY-SMITH & COOKE, 1971
Na superfície do solo menos de 1 a	DAVIS, 1925
A 10cm de profundidade 34 m	REIS & TOMAZINI, 2005
Na superfície 14 m	REIS & TOMAZINI, 2005

\*a: anos; m: meses.

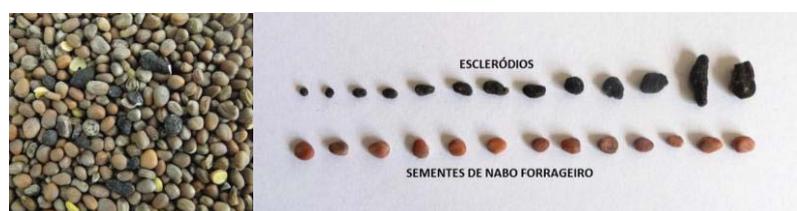


Figura 6. Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* misturados e comparados com sementes de nabo-forrageiro.

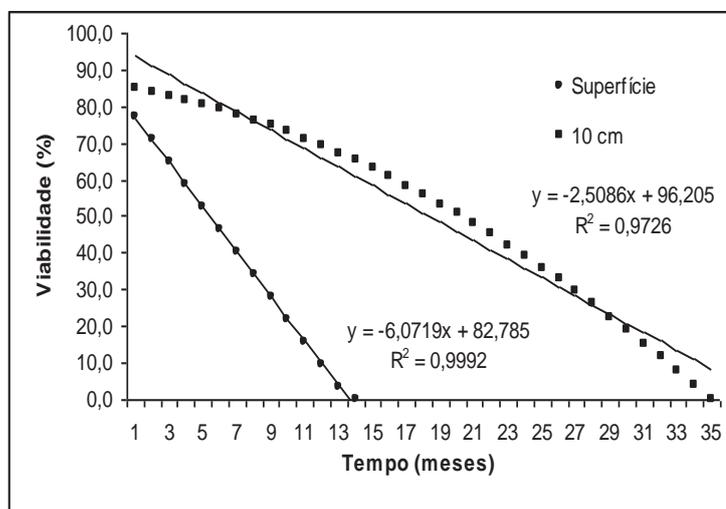


Figura 7. Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* posicionados na superfície do solo e enterrados a 10 cm (REIS & TOMAZINI, 2005).

### 2.6.2 Sobrevivência (sementes)

Provavelmente, a principal fonte de inóculo primário, responsável pela introdução deste fungo nas lavouras de soja no sul do Brasil, tenha sido a semente de feijão e, principalmente a de nabo forrageiro, na maioria das vezes, infestada com escleródios (Figura 6). No centro-oeste este papel deve ser desempenhado pelas sementes do feijoeiro e da ervilha (REIS et al., 2011a).

O fungo sobrevive também como micélio dormente no interior da semente e como escleródios entre elas (Figura 5 e 8). Tanto o tegumento da semente como o cotilédone podem ser colonizados por Ss. O fungo atinge as vagens com sementes em formação causando a destruição da maioria, porém, as colonizadas com pouco micélio, com

o embrião viável, passam pela classificação sendo comercializadas (BOLAND & HALL, 1988). Ss pode sobreviver em sementes infectadas com micélio dormente no tegumento e nos cotilédones por três anos ou mais (TU, 1988). A presença do micélio de Ss, infectando internamente a semente tem sido citada por outros autores (YANG et al., 1998) ou infestada com micélio ou escleródios entre as sementes (ZAMBOLIM, 2005).



Figura 8. Sementes e resíduo de soja oriundo de equipamento de pré-limpeza, com presença de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 2.6.3 Transmissão semente - cotilédone

Várias tentativas foram realizadas na Universidade de Passo Fundo para testar a hipótese de que o micélio interno na semente origina, após a germinação e emergência, lesão cotiledonar e nesta produzir escleródios, introduzindo o fungo em novas áreas. No entanto, está hipótese ainda não foi comprovada. Neste trabalho se demonstrou que as sementes infectadas artificialmente não germinam,

porém, formam escleródios dentro do solo. As sementes não germinadas produziram até 3,07 escleródios por semente, em ambiente controlado (Figura 9). Os escleródios recém formados foram retornados ao solo, posicionados a profundidade de 1cm, formando apotécios a partir de 45 dias. Para isso, o solo manteve-se úmido com e temperatura média de 22°C (BRUSTOLIN et al., 2011a). Steadman (1983), Tu (1988), Yang et al. (1998) e Mueller (1999) relatam a formação de escleródios a partir de sementes infectadas e, conseqüentemente, apotécios. Mueller et al. (1999) comprovaram a formação de escleródios e apotécios a partir de sementes de soja infectadas pelo patógeno quando semeadas no campo. Yang, et al. 1998, concluíram que a semente portadora do fungo origina inóculo para infectar plantas e aumentar a quantidade de escleródios presentes no solo para as posteriores estações do ano ou na mesma estação de cultivo.



Figura 9. Semente de soja colonizada por *Sclerotinia sclerotiorum* e posterior formação de escleródios quando semeada no solo

#### 2.6.4 Restos culturais

Os escleródios formados sobre, ou no interior dos tecidos, são liberados caindo ao solo durante e após a decomposição das hastes da soja. Na colheita mecânica grande quantidade de escleródios é deixada também na superfície do solo pelo mecanismo de limpeza da máquina colhedora, garantindo a presença do fungo na área de cultivo (REIS, et al., 2011; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978). Brustolin et al. (2011b) quantificaram até 45,6 kg/ha de escleródios numa lavoura em Coxilha - RS (Figura 5 e 10).



Figura 10. Escleródios deixados na superfície do solo após a colheita mecanizada.

#### 2.6.5 Germinação carpogênica dos escleródios

Segundo ABAWI & GROGAN (1979), o teor de água no solo, a temperatura e a luz são considerados os fatores mais importantes para a germinação carpogênica (produção de apotécios) de escleródios

de Ss, mas que devem passar por um período de condicionamento no solo, antes de germinar carpogenicamente. Esse período varia de acordo com a origem do isolado, mas em geral, escleródios recém formados precisam ser incubados por maior período de tempo sob temperaturas amenas e alta umidade do solo (MILA & YANG, 2008; HUANG & KOZUB, 1994; ABAWI & GROGAN, 1979) embora , outros fatores como textura do solo e qualidade da luz também desempenham papel importante (SINGH & SINGH, 1983; ROUSSEAU et al., 2006; SUN & YANG, 2000).

A germinação carpogênica é altamente dependente da disponibilidade de água no solo. Pesquisas relatam que a germinação pode ocorrer desde condições de solo saturado até relativamente seco, com tensão de água variando de zero a 750 kPa (BOLAND & HALL, 1987; FERRAZ et al., 1999; MORRALL, 1977; PHILLIPS, 1987), entretanto Venette (1998) e Clarkson et al. (2003) relatam que as condições ótimas para a germinação de escleródios ocorre quando a umidade do solo for superior a 50% da capacidade de campo. Segundo Cook et al. (1975), embora outros fatores estejam envolvidos, a flutuação da umidade do solo pode ser um estímulo para a germinação. Boland & Hall (1987) observaram que nas duas semanas que antecederam a formação de apotécios no campo, a temperatura do solo ficou na faixa de 15-30°C e o potencial matricial do solo, geralmente acima de 5 bars. No campo, essas condições podem ocorrer quando do fechamento das entrelinhas do feijoeiro.

O microclima entre as fileiras de feijão em pleno desenvolvimento é menos sujeito a variações de temperatura e umidade que do que ambiente externo (NATTI, 1971). Às vezes,

grande número de apotécios são encontrados em reboleiras na lavoura, geralmente onde o solo estava mais saturado de água (LLOYD, 1975). Um ligeiro estresse hídrico previne a germinação carpogênica e a formação de apotécios.

A faixa de temperatura mais favorável a sua produção é de 12 – 18°C (SUN & YANG, 2000). Para Venette (1998) e Clarkson et al. (2003) a temperatura ideal situa-se entre 15°C e 17,8°C. Mas Abawi & Grogan (1975) e Hao et al. (2003) relatam que a germinação carpogênica pode ocorrer numa ampla faixa de temperatura, entre 10 e 25°C. Devido a grande variação em temperaturas ótimas requeridas ter sido relatada, suspeita-se que exista adaptação do patógeno a diferentes regiões geográficas (PHILLIPS, 1987; BARDIN & HUANG, 2001). Sob baixa intensidade luminosa a produção de apotécios inicia com uma soma térmica de 760°C e cessa com 1.720°C e com alta intensidade inicia com 160 e cessa com 900°C (SUN & YANG, 2000). Para a produção de apotécio os escleródios necessitam de luz, como estímulo morfogenético para a expansão do apotécio. Escleródios presentes nas camadas superficiais do solo (entre 2 e 3 cm de profundidade) germinam cerca de 10 a 14 dias (ABAWI & GROGAN, 1975).

Um apotécio pode produzir ascosporos no campo por cerca de sete dias. Cada apotécio produz cerca de  $2,3 \times 10^6$  ascosporos em condições controladas (SCHWARTZ & STEADMAN, 1978) (Figura 3 e 5).

### 2.6.6 Liberação e transporte do inóculo

Os ascosporos em grande quantidade são ejetados ao exterior dos apotécios, com violência, numa nuvem visível (Figura 11) e transportados pelo o vento (REIS et al., 2011a). Segundo Clarkson et al. (2003) a liberação dos ascosporos ocorre tanto de dia como a noite e que a duração do período de liberação pode variar de 36 a 168 horas, declinando quando a umidade relativa do ar atinge 65 a 75%.

Foram coletados ascosporos a 6m de altura, indicando que o inóculo pode ser transportado por vários quilômetros de distância (VENETTE, 1998; LI et al., 1994). Quando depositado sobre as folhas os ascosporos podem sobreviver por 12 a 14 dias, dependendo das condições ambientais, com alta umidade relativa do ar e luz ultravioleta (VENETTE, 1998; CLARKSON et al., 2003).



Figura 11. Nuvem de ascosporos de *Sclerotinia sclerotiorum* liberada violentamente pela expulsão dos esporos das ascas.

### **2.6.7 Disseminação**

O fungo dissemina-se principalmente na forma de escleródios, ascosporos e micélio dormente no interior e exterior de sementes. Os escleródios são disseminados por implementos e máquinas agrícolas, por animais ao se alimentarem de restos culturais contaminados com estas estruturas e principalmente entre as sementes. O uso de resíduos da limpeza de grãos e de sementes de soja para alimentar animais contribui para sua disseminação para novas áreas (Figura 8) (REIS et al., 2011a). Os animais alimentados por resíduos vegetais contendo escleródios não inativam o patógeno durante a sua digestão, podendo então disseminá-los pelas fezes (KORA et al., 2003).

Os ascosporos são ejetados das ascas e pelo vento levados a plantas e lavouras vizinhas (ATHOW, 1973). Segundo Steadman (1983) os ascosporos são disseminados pelo vento e podem alcançar distâncias de até 100 metros da fonte.

As sementes infectadas com micélio também são agentes de disseminação. Por isso é importante a acuracidade dos métodos de detecção deste patógeno em sementes em análises patológica, bem como da eficiência do tratamento de sementes (HENNEBERG et al. 2012).

### **2.6.8 Deposição e penetração**

Os ascosporos são depositados por impacto ou sedimentação sobre os tecidos suscetíveis. O principal sítio de infecção são as pétalas senescidas presas, geralmente, sobre axilas. Estes órgãos

servem como fonte de energia para garantir a infecção dos tecidos saudáveis pelos ascósporos e posterior colonização do hospedeiro (McLEAN, 1958; ABAWI et al., 1975; BOLAND & HALL, 1988) (Figura 12). Segundo Sutton & Deverral (1983), é necessário uma fonte de nutrientes exógena, como flores senescentes de feijão e de soja para ocorrer a infecção ou partes mortas de plantas crucíferas (McLEAN, 1958), ou infectando a partir de fermentos (PURDY, 1958; NEWTON & SIQUEIRA, 1972; DILLARD & COBB, 1995) (Figura 5). Segundo Vieira (1994), a ocorrência do mofo-branco se relaciona com o estágio de florescimento dos hospedeiros. Contudo, os ascósporos podem infectar plantas injuriadas mecanicamente ou com lesões necróticas incitadas por outros patógenos. Isto explica a ocorrência esporádica do mofo branco antes da floração do feijoeiro (VIEIRA, 1994).



Figura 12. Sintomas e sinais iniciais da infecção de *Sclerotinia sclerotiorum* de hastes (axilas) e sua relação com a presença de pétalas senescentes.

### 2.6.9 Colonização

Uma vez tendo a planta sido infectada o fungo pode atacar folhas, pecíolos, internódios, e também as plantas próximas, através do contacto com as doentes. Os tecidos corticais são invadidos rapidamente, até que se produz a morte da parte aérea da planta (Fig. 12) (MUELLER et al., 2002) .

A colonização é não seletiva (não específica a tecidos como o xilema) (REIS et al., 2011a) Segundo Echandi & Walker (1957), o desenvolvimento dos sintomas de Ss estão associados ao ácido oxálico e as enzimas pectolíticas produzidas pelo fungo. Inicialmente o ácido oxálico penetra no tecido, reduzindo o pH de 6,8 para 4,0, fornecendo assim um pH ótimo para a ação da enzima pectolítica. O ácido oxálico produzido por Ss no tecido do hospedeiro e em cultura, reduz o pH dos substratos alcalinos. As espécies de Ss podem tolerar uma ampla faixa de pH, mas adaptam-se melhor ao substrato ácido (WILLETTS & WONG, 1980).

A ação do patógeno resulta em regiões de encharcamento ao redor das lesões, que podem ser variáveis, conforme a tolerância ou resistência do hospedeiro ao ácido (TU & BEVERSDORF, 1982).

Segundo Boland & Hall (1988), as lesões surgem frequentemente do primeiro ao quinto nó e em ramificações secundárias da soja. As lesões se expandem da inflorescência para a haste principal colonizando os tecidos e aumentando as lesões. A doença aumenta até a maturação da soja, podendo chegar a 90,3% de incidência em plantas (Tabela 1).



Figura 13. Infecção de *Sclerotinia sclerotiorum* na porção inferior das hastes.



Figura 14. Massa miceliana e formação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, na superfície da haste (a) e na medula (b).

### **2.7.0 Sintomatologia**

Os sintomas/sinais do mofo-branco surgem na parte inferior das hastes da planta próximas ao solo, mas, em muitos casos surge na metade da haste envolvendo ramos e vagens. Os primeiros sintomas surgem no ponto de inserção dos pecíolos ou na base das ramificações da haste e nestes locais são observadas áreas descoloridas de cor pardo-avermelhada (CHAMBERLAIN, 1973) (Figura 13).

O primeiro sinal da doença é a presença de uma massa de micélio branco, de aspecto algodinoso, na haste, ramos e vagens de plantas atacadas. Com a evolução da moléstia, surgem estruturas macroscópicas, negras, rígidas de forma variável, no meio da massa micelial, os escleródios. Esses desprendem-se com facilidade quando as plantas são agitadas. Essas estruturas apresentam a forma cilíndrica quando formados na medula da planta, e nas vagens, morfologia variada (CHAMBERLAIN, 1973) (Figura 14). Por ocasião da colheita grande quantidade de escleródios são deixados sobre o solo (REIS et al., 2011).

Na ausência de medidas de controle são observadas reboleiras de plantas amareladas e murchas, que tendem aumentar de tamanho até tomar toda a área de cultivo (Fig. 15) (GÖRGEN et al., 2011).

### **2.8 Ciclos secundários**

O mofo branco é uma doença monocíclica, pois os escleródios formados nas plantas, durante a safra, não germinam e não liberam

ascosporos para novas infecções no mesmo ciclo da soja (REIS et al., 2011a).

## **2.9 Fatores ambientais e a doença**

A alta densidade populacional do hospedeiro favorece o desenvolvimento da moléstia, devido as hastes permanecem molhadas por período mais longo (maior período de molhamento sujeito a infecção). A ocorrência e intensidade do mofo-branco esta relacionada com a duração de período de molhamento no interior do dossel como 40 a 112 h, ou 70 – 120 h a 20°C (BOLAND & HALL, 1988). Abawi e Grogan (1975) verificaram que o crescimento da lesão foi interrompido abruptamente quando secou a superfície do tecido infectado, retomando a expansão quando água livre se tornou disponível novamente.

Em feijão, Abawi & Grogan (1975) citam que 48 a 72h de molhamento contínuo das plantas são necessários para a manifestação dos sintomas quando ascosporos foram inoculados em flores senescidas, em plantas cultivadas em câmara de crescimento com temperatura entre 20 e 25°C. A umidade relativa próxima a 100% não foi suficiente para a infecção ou, expansão em folhas de feijão. Boland & Hall (1987) constataram que o desenvolvimento da lesão em feijão branco foi associado, em alguns casos, com 12-15h de molhamento contínuo das plantas. Em feijão irrigado, o mofo-branco se desenvolveu em períodos diários de molhamento contínuo das plantas de 11-12h. Temperaturas favoráveis ao desenvolvimento da doença variam de 10°C a um ótimo de 20-25°C; acima de 30°C, a doença não

ocorre (WEISS et al., 1980; BOLLAND & HALL, 1987). Para Abawi & Grogan, 1979 e Phillips, 1994 a infecção ocorre entre 5 e 30° com temperatura ótima requerida para a infecção de 20 a 25°C.



Figura 15. Sintomas de plantas mortas pelo mofo-branco em lavoura de soja no município de Coxilha/RS.

### 3.0 Controle

Medidas de controle isoladas são pouco eficientes no controle do mofo-branco. Por isso, deve-se considerar o Manejo Integrado de Doenças (MID). A NAS (National Academy of Science dos Estados Unidos, 1969) apresentou o conceito oficial de MID como sendo a “utilização de todas as técnicas disponíveis dentro de um programa unificado de tal modo a manter a população de organismos nocivos abaixo do Limiar de Dano Econômico (LDE) e a minimizar os efeitos colaterais deletérios ao meio ambiente”. O MID satisfaz as exigências técnicas de sustentabilidade da agricultura (REIS et al., 2011c).

No manejo integrado do mofo-branco da soja se deve considerar que:

- a. As sementes infestadas/infected das plantas hospedeiras são as responsáveis pela introdução do fungo nas áreas novas de cultivo (Ex. de soja, nabo forrageiro e feijoeiro) (YANG et al., 1998). Segundo Muller et al., (1999) obtiveram controle superior a 98% na formação de escleródios a partir de sementes de soja infectadas, em dois anos de estudos, pelo uso de fludioxonil, tiram e captana + pentacloronitrobenzeni + thiabendazol.
- b. A sucessão, rotação e o monocultivo (soja) de espécies vegetais de folhas largas, na mesma lavoura, como colza, ervilha, ervilhaca, feijoeiro, girassol, nabo forrageiro etc. contribuem para aumentar o inóculo (densidade de escleródios) no solo (SCHWARTZ & STEADMAN, 1978);
- c. A lavra do solo, enterrando os escleródios no perfil aumenta sua longevidade (REIS & TOMAZINI, 2005);
- d. Sob plantio direto os escleródios perdem a viabilidade mais rapidamente (REIS & TOMAZINI, 2005);
- e. A maximização da cobertura morta do solo com *Brachiaria* no centro-oeste e aveia preta no sul constitui uma barreira física da palha que reduz a inoculação das plantas (FERRAZ et al., 1999; GORGEN et al., 2009; BRUSTOLIN et al., 2012) relatam que o desenvolvimento da supressividade do solo e a redução da incidência de mofo-branco da soja é obtido com a implantação de lavouras sobre palhada de brachiária, com obrigatoriedade de rotação de culturas e presença de matéria seca da forrageira superior a 7 t/ha na superfície do solo.
- f. O aumento do espaçamento entrelinhas > 0,5m reduz a duração do molhamento dos órgãos suscetíveis e conseqüentemente a

probabilidade de infecção (pétalas mortas) (BLAD et al., 1978; BOLAND & HALL, 1988);

g. O uso de população de plantas de soja  $< 25/m^2$  reduz a infecção pela mesma razão do item anterior (BLAD et al., 1978; BOLAND & HALL, 1988);

h. O cultivo de variedades com arquitetura (Hábito ereto, folhas pequenas, que não acame, ciclo precoce, período de curto de florescimento) pela mesma razão do item “e” reduz a probabilidade de infecção doença (BLAD et al., 1978; BOLAND & HALL, 1988);

i. A prática da sucessão/rotação de culturas com espécies vegetais não suscetíveis, como o milho, sorgo e milheto evitando folhas largas, reduz o inóculo no solo (GRACIA-GARZA et al., 2002);

j. Se deve produzir e usar continuamente sementes sadias (De todas as espécies vegetais cultivadas na propriedade) (REIS et al., 2009), seguidas de análise sanitária com método específico para detecção (PERES et al., 2002) e tratamento com carbendazim + tiram (MUELLER et al., 1999) ou captana + tiofanato metílico (TU, 1989). Embora o tratamento de sementes elimine o inóculo presente nessas estruturas, o método é ineficaz para o controle em lavouras já infestada com escleródios (MULLER et al., 1999).

k. Há a possibilidade de uso da indução da resistência pela aplicação do herbicida lactofem, o qual estimula a produção de fitoalexinas na planta (ALTMAN & CAMPBELL, 1977; DANN et al., 1999; GRAHAN et al., 2001; YANG & LUNDEEN, 2001; NELSON et al., 2002);

l. O controle biológico de Ss em soja por meio de agentes de controle biológico, tais como *Trichoderma* spp., mostra-se como uma opção e necessita ser melhor estudado (DANDURAND & KNUDSEN, 1993).

m. Nos Estados Unidos foram identificadas fontes de resistência parcial em material introduzido (NELSON et al., 1991; KIM et al., 1999; YANG et al., 1999) e em cultivares, tais como, SyngentaS19-90 (KIM et al., 1999; KIM et al., 2000) e na linhagem AXN-1-55 (DIERS et al., 2006). No Brasil, as cultivares tem apresentado suscetibilidade a doença, não havendo relatos, até o momento, de fontes de resistência ao mofo branco (VILLAS BOAS, 2007).

Cultivares com ciclo mais curto e resistência ao acamamento reduzem o risco de infecção, facilitando a seleção de variedades (HOFFMAN et al., 2002), assim como a época de floração e a arquitetura, geram diferentes intensidade da doença (BOLLAND & HALL, 1987; NELSON et al., 1991; KIM & DIERS, 2000).

Outra forma de aumentar a resistência do mofo em plantas de soja é apresentada por Peltier et al. (2009), que correlaciona o teor de lignina das diferentes partes da planta e estádios fenológicos com a intensidade da doença.

n. Os fungicidas têm sido frequentemente usados no controle de doenças causadas por Ss devido a falta de resistência genética nas plantas hospedeiras (BARDIN & HUANG, 2001). O controle químico do mofo-branco na cultura da soja pode ser também ineficiente devido as dificuldades de se obter cobertura total da planta. O controle químico deve ser realizado preventivamente, indicando-se a pulverização entre o início da floração até a queda das primeiras flores da cultura, concomitantemente com a presença de apotécios no solo

(GÖRGEN et al., 2010). Nunes Junior et al. (2009), verificaram a redução da incidência da doenças utilizando os fungicidas fluazinam, procimidona, dimoxistrobina+boscalida, tiofanato metílico+Mn, fluopiram e algumas formulações de carbendazim, demonstrando várias opções para o controle de Ss em soja.

A perda ou redução de sensibilidade de isolados de Ss da cultura do alface (*Lactuca sativa* L.) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) para o benomil, foi constatado por Muller et al. (2002), o mesmo autor identificou redução da sensibilidade para o tiofanato metílico.

O mofo-branco da soja é uma doença de difícil manejo porque o parasita ataca inúmeras espécies de plantas cultivadas, produz estruturas de dormência e é transmitido por sementes (REIS et al., 2011).

## CAPÍTULO I

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*

RICARDO BRUSTOLIN<sup>1</sup>

**RESUMO** - Dentre as inúmeras doenças relatadas em soja encontra-se o mofo-branco da haste. Trata-se de uma doença com alto potencial de danos para a qual ainda não estão disponíveis cultivares que apresentem um nível de resistência que reduzam os danos a níveis sub-econômicos. Por isso, necessita-se conhecer melhor o ciclo da doença envolvendo a obtenção de inóculo do patógeno para agilizar pesquisas direcionadas ao seu manejo. O objetivo deste trabalho foi selecionar um método para a produção massal de escleródios *in vitro*. Nesse sentido foram selecionados cinco métodos na literatura, baseados em: i) grãos de arroz, ii) de trigo misturado com perlita grossa iii) trigo sem perlita grossa, iv) areia, e v) farinha de milho (FM), os quais foram avaliados isoladamente ou combinados com FM, constituindo um experimento bifatorial com quatro repetições. O isolado utilizado foi obtido de escleródios de plantas de soja coletados no município de Coxilha-RS. Os escleródios obtidos nos substratos foram classificados em três malhas de peneira (4 mm; 2,5 mm; 1 mm). Em cada classe foi determinado o peso total, o número de escleródios

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

por grama de escleródios e o rendimento de escleródios. O método constituídos por grãos de trigo misturado com perlita, sem adição de FM, foi selecionado para a multiplicação de escleródios, pela disponibilidade dos componentes, quantidade, praticidade na obtenção de escleródios e baixo custo, sendo o método que melhor se ajusta a necessidade dos pesquisadores.

**Palavras chaves:** mofo-branco, inóculo, *Glycine max*.

### **COMPARISON OF METHODS FOR SCLEROTIA PRODUCTIONS BY *Sclerotinia sclerotiorum***

**ABSTRACT** - Among many diseases reported in soybean is the white mold (WM) stem rot. WM is a disease with high damage potential for which are not yet available cultivars that have a level of resistance able to reduce the damage to sub-economic levels. Therefore, one needs to know more about the disease cycle involving the inoculum production to accelerate research directed to its management. The objective of this work was to select a method for *in vitro* mass production of sclerotia. Five methods were selected in the literature based on: i) rice grains, ii) wheat kernel mixed with coarse perlite; iii) wheat kernel without perlite; iv) sand, and; v) corn flour (CF), which were evaluated alone or combined with CF. The experiment was a factorial with four replications. The isolate used was obtained from sclerotia taken from soybean plants collected in Coxilha-RS county. The sclerotia were classified into three sieve meshes (4 mm, 2.5 mm, 1 mm). For each class the total weight, the number of sclerotia per

gram of sclerotia and yield of sclerotia were determined. The wheat grains mixed with perlite, without the CF, was selected for the sclerotia production due to the components availability, low cost, quantity and convenience in sclerotia production

**Keywords:** white mold, inoculum, soybean *Glycine max*.

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das principais doenças da soja é o mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) (Lib.) De Bary, descrito em 1837. Segundo Meyer<sup>1</sup>, a área de soja atacada no Brasil é de aproximadamente 6,3 milhões de hectares (informação verbal, 2012). Nestas áreas infestadas pela doença os danos ser estimados pela função  $R = 1.000 - 6,07 I$  (onde R = rendimento de grãos normalizados, e I = incidência em plantas) (REIS et al., 2011).

O mofo-branco é uma doença de infecção floral na qual o processo infeccioso inicia com a deposição dos ascósporos nas pétalas senescidas (McLEAN, 1958; ABAWI et al., 1975; BOLAND & HALL, 1988).

Em trabalhos de pesquisa, onde é requerida a inoculação, devem ser usados como inóculo, os ascósporos, a semelhança do que ocorre naturalmente. Para a sua produção é necessária, primeiramente, a obtenção de escleródios e, às vezes em grande quantidade.

---

<sup>1</sup>MEYER, M. (Embrapa Soja - Londrina/PR)

Os ascósporos tem sido usados na inoculação de plantas, em diferentes estudos, como a prova de patogenicidade (ABAWI et al., 1975), a seleção de plantas resistentes (DILLARD et al., 1995), em estudos do ciclo da doença (BERLIN et al., 1988), na determinação da eficiência de fungicidas (HUNTER et al., 1978), na determinação das condições ambientais requeridas ao processo infeccioso e no desenvolvimento da doença (ABAWI & GROGAN, 1975).

A produção massal das estruturas de dormência pode ser obtida em laboratório por diferentes métodos, geralmente usando substratos naturais como grãos (SMITH & BOLAND, 1989; SANSFORD & COLEY-SMITH, 1992; COSTA & COSTA, 2006 e MYLCHREEST & WHEELER, 1987). Outros usaram raízes de cenoura, mandioquinha salsa, pecíolo de repolho, alface e vagem mais batata-dextrose, misturados ou não com farinha de milho (FM) (FERNANDES et al., 1993). Nelson et al. (1988) utilizou meio contendo FM, vermiculita, solução de casamino ácidos, extrato de levedura e adicionado de água até o potencial de 25 bars.

O objetivo deste trabalho foi selecionar um método para a produção massal de escleródios *in vitro* no menor tempo, com praticidade, tamanho uniforme e de baixo custo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/RS durante o ano de 2011. Neste experimento foram avaliados cinco meios de cultura

isoladamente e combinados com FM. O delineamento experimental foi fatorial em blocos ao acaso com dois fatores (métodos/meios e adição de FM) e quatro repetições (Tabela 1).

### **2.1. Isolamento monospórico de *Sclerotinia sclerotiorum***

Os escleródios de Ss presentes no solo após a colheita da soja em lavoura comercial no município Coxilha-RS-Brasil, foram coletados e trazidos ao laboratório. Foram desinfetados em uma solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1% por cinco minutos, lavados com água destilada e esterilizada (ADE). As estruturas de dormência foram colocadas a germinar em gerbox (caixas de acrílico 11 x 11 x 3,0 cm de altura) contendo areia de rio lavada, peneirada (peneira com malha de 1mm), esterilizada e saturada com água até atingir o potencial osmótico de zero (capacidade de campo). Posteriormente, foram colocados em câmara climatizada na temperatura de  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$ , com fotoperíodo de 12 horas, por 40 dias. A fonte de luz foi constituída por lâmpadas fluorescentes distantes 5 cm acima dos gerboxes. Após a germinação, os apotécios foram removidos pelo corte das estipes com tesoura e pinça esterilizada. O material foi transferido para um cadinho, marca Chiarotti/Mauá (0,060 mL), contendo 3 mL de ADE e macerados com o pistilo. Posteriormente, foi adicionado 100 mL de ADE ao macerado, coado com um pano de voal de seda e a concentração ajustada para 5.300 ascosporos viáveis/mL. Desta suspensão, foram vertidos 300  $\mu\text{L}$  por placa de Petri plásticas de 60 mm de diâmetro, contendo água-ágar. Depois de 6 horas no escuro, a temperatura de

21°C ±2, foi verificada e germinação em microscópico óptico. Quando o pró-micélio atingiu o tamanho menor do que a metade do diâmetro do ascosporo, o mesmo foi retirado com uma agulha histológica e transferido para placas de petri contendo meio BSA. Após sete dias de incubação a temperatura de 25° e fotoperíodo de 12 horas luz obteve-se colônias puras. Posteriormente discos de 6 mm de diâmetro foram retirados das colônias e transferidos para tubos de ensaio (N° 9820) contendo grãos de trigo esterilizados. Após a colonização dos grãos, foram armazenados em refrigerador a 5°C para uso posterior.

## **2.2. Preparos dos substratos, inoculação e incubação**

Foram selecionados na literatura cinco métodos/meios para a produção massal de escleródios *in vitro*: i) de Sansford & Coley-Smith (1992) baseado em trigo misturado com perlita grossa (T+P); ii) de Mylchreest & Wheeler (1987), baseado somente em grãos de trigo sem perlita (T); iii) de Costa & Costa (2006) baseado em grãos de arroz (AZ), iv) de Nelson et al. (1988) composto de FM (NELSON) e v) o método baseado em areia sugerido no projeto deste trabalho (AR) (sem citação na literatura).

Estes métodos/meios utilizados pelos autores foram modificados e avaliados isoladamente ou combinados com 20% de farinha de milho (FM), exceto o método de NELSON que usa como principal substrato nutritivo, 54 gramas de FM (Tabela 1).

Os meios (Tabela 1) foram preparados em erlenmeyers de vidro de 1,0 L de volume. Em seguida, foram autoclavados por uma

hora a 120°C e no dia seguinte re-autoclavados. Após resfriar, foram transferidos 40 discos de 9 mm de diâmetro, de colônias puras do fungo, para cada frasco e misturados na massa do substrato com um bastão de vidro esterilizado.

Tabela 1. Substratos (métodos/meios) testados para produção de escleródios

Tratamentos	Métodos/meios		
	Substratos nutritivos	Substratos inertes	Outros aditivos
<sup>5</sup> T	Trigo (100g)	-	ADE <sup>4</sup> (10mL)
<sup>6</sup> AZ	Arroz <sup>1</sup> (100g)	-	ADE (30mL)
<sup>7</sup> T+P	Trigo <sup>1</sup> (100g)	Perlita moída (Grossa) <sup>3</sup> (50g)	ADE (100mL)
<sup>8</sup> NELSON	FM <sup>2</sup> (54g)	Vermiculita (3,5g)	1% Casamino-ácidos (37,5mL) + 1% de extrato de levedura + ADE (35mL)
<sup>9</sup> AR	-	Areia (100g)	ADE (40 mL)

<sup>1</sup> Os grãos de trigo e arroz foram embebidos em água destilada por 12h

<sup>2</sup> FM: farinha de milho

<sup>3</sup> Perlita moída grossa: moída em forrageira, peneirada e selecionada a retida em peneira com malha de 4mm.

<sup>4</sup> ADE: Água destilada e esterilizada

<sup>5</sup>T: Trigo; <sup>6</sup>Arroz; <sup>7</sup>Trigo mais perlita; <sup>8</sup>NELSON; <sup>9</sup>Areia;

Os meios dentro dos frascos foram incubados por 45 dias, seguindo as condições de ambiente descritas por cada autor em cada um dos meios/m (Tabela 2).

Tabela 2. Condições de ambiente para a incubação em cada método

Tratamentos	Temperatura (°C)	Regime de luz
<sup>1</sup> T+P	25	Fotoperíodo de 12h
<sup>2</sup> T	25	Fotoperíodo de 12h
<sup>3</sup> AZ	20	Escuro
<sup>4</sup> NELSON	25	Fotoperíodo de 12h
<sup>5</sup> AR	20	Escuro

<sup>1</sup>Trigo mais perlita; <sup>2</sup>T: Trigo; <sup>3</sup>Arroz; <sup>4</sup>NELSON; <sup>5</sup>Areia;

### 2.3 Colheita dos escleródios

Após a incubação, com um bastão de vidro, foi retirado o meio, contendo os escleródios formados, e depositado sobre uma peneira de 1,0 mm de malha. A massa de escleródios mais substrato foi lavada com jato de água e transferida para bandejas de plástico de 0,3 m x 0,4 m para secagem por três dias no interior de uma casa-de-vegetação temperatura e luz do ambiente. Posteriormente, os escleródios foram colhidos manualmente, avaliados e armazenados em tubos de vidro num refrigerador a temperatura de 5°C.

### 2.4 Avaliações

A massa total dos escleródios produzidas por unidade experimental foi pesada em balança de precisão. Posteriormente, foi realizada a classificação, separando-os em três classes de peneiras: i) 4 mm, ii) 2,5 mm e iii) 1 mm. Os escleródios retidos em cada peneira foram quantificados em massa total, número de escleródios/grama de escleródio e massa de escleródios produzida por grama de substrato

nutritivo seco, como por exemplo trigo (100 gramas) mais farinha de milho (20 gramas), totalizando 120 gramas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os diferentes métodos com diferentes substratos nutritivos, apresentaram variabilidade no tamanho dos escleródios e na quantidade produzida, possibilitando o uso destes métodos para produzir escleródios do tamanho e quantidade desejada.

Para todas as variáveis avaliadas houve interação entre os fatores métodos/meios e presença ou ausência de FM.

Utilizando-se o meio T+P com ausência de FM, (Tabela 3), obteve-se a maior produção, com um total de 34,07g escleródios em 100 g de grãos de trigo, superando a produção obtida por Ferraz & Café Filho (1998) que produziram em meio com grãos de feijão, com adição de FM, até 10 gramas de escleródios em 100 gramas de meio de cultura e incubados em condições diferentes deste trabalho.

Os métodos contendo somente FM (AR e NELSON) não superaram a produção dos demais métodos complementados de FM, provando que a FM isolada ou completada com outros aditivos não superaram a produção de método como o T+P que é mais prático e barato para atender a demanda de produção de escleródios. Por outro lado, estes métodos (AR e NELSON) quando retirada a FM não foram capazes de produzir escleródios somente com outros aditivos (Tabela 3).

A FM não contribuiu para o aumento da massa de escleródios produzidas nos meios T+P, T e AZ, discordando com o relato de Fernandes et al. (1993) onde evidenciaram que meios adicionados de FM favoreceram a formação de escleródios.

Tabela 3. Massa (g) total de escleródios produzida nos substratos

Farinha de milho	Métodos/meios				
	T	AZ	T+P	AR	NELSON
Presença	19,0 aA	7,7 aB	14,4 bA	5,6 aB	17,2 aA
Ausência	21,1 aB	6,34 aC	34,0 aA	0,0 bD	0,0 bD
CV (%)	20,3				

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Além do massa total, é possível selecionar escleródios de diferentes tamanhos, os quais podem estar relacionados com o número de apotécios formados. Ben-Yephet (1993) e Dillard et al. (1995), relataram que os escleródios maiores produziram maior número de apotécios, o que é desejável.

Na Tabela 4 é possível selecionar o método que produziu a maior quantidade de escleródios do tamanho desejado.

No meio T+P na ausência de FM, houve a maior produção de escleródios nas peneiras 4 mm, 2,5 mm e 1 mm.

A maior quantidade de escleródios ficou retida entre a peneira de 4 mm e 2,5 mm para todos os métodos e destacando-se novamente o método T+P, que além de produzir maior massa total, concentra maior número de escleródios retidos na peneira 2,5 mm, por isso, posteriormente podem ser usados na indução da germinação carpegênica. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Ferraz &

Café Filho (1998) que dentre os diferentes meios avaliados, o maior número de escleródios ficou retido nas peneiras de diâmetro entre 6,35 mm a 2,38 mm. Estes escleródios também foram selecionados para uso em ensaios posteriores da germinação carpogênica.

Tabela 4. Massa (g) total dos escleródios retidos nas peneiras com malha de 4, 2,5 e 1 mm

Peneira/ malha	Farinha de milho	Métodos/meios				
		T <sup>1</sup>	AZ <sup>2</sup>	T+P <sup>3</sup>	AR <sup>4</sup>	NELSON <sup>5</sup>
4 mm	Presença	6,7 aA	1,1 aC	3,0 bB	0,5 aC	5,5 aA
	Ausência	5,36 aA	0,2 bB	7,2 aA	0,0 bB	0,0 bB
	CV (%)	16,9				
2,5 mm	Presença	9,33 aA	4,5 aBC	8,4 bA	3,6 aC	6,6 aAB
	Ausência	9,1 aB	3,1 aC	18,7 bD	0,0 bD	0,0 bD
	CV (%)	12,1				
1 mm	Presença	2,8 aA	2 aA	2,8 bA	1,4 aA	2,8 aA
	Ausência	6,5 aA	2,9 aB	8,06 aA	0,0 bC	0,0 bC
	CV (%)	17,0				

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>T: Trigo; <sup>2</sup>Arroz; <sup>3</sup>Trigo mais perlita; <sup>4</sup>Areia; <sup>5</sup>NELSON

Na Tabela 5 são apresentados valores que podem ser utilizados para produção de escleródios segundo a necessidade para cada método.

Por esse trabalho foi possível selecionar o método que mais se ajusta as necessidade do pesquisador, pois poderá escolher o substrato nutritivo disponível e assim definir a quantidade e tamanho de escleródios que deseja. O número de escleródios que contém uma grama de escleródios, permite obter uma vez selecionado o método de produção, realizada a colheita dos escleródios, secados, classificados, selecionado o tamanho desejado através da malha da peneira, a

quantidade de escleródios desejada para um experimento através do seu peso.

Conforme diminuiu a malha da peneira houve aumento do número de escleródios por grama, mostrando que o peso de escleródios resulta em números diferenciados de unidades infectivas, dependendo do método de produção.

A FM não influenciou diretamente no tamanho do escleródio nos diferentes métodos, confirmado o mesmo relato feito por Ferraz & Café Filho (1998).

O método AZ apresentou maior número de escleródios nas peneiras 4 mm e 1 mm, não havendo uniformidade na produção dos escleródios, diferente do método T+P que teve a tendência de produzir escleródios com mais uniformidade, considerando os escleródios retidos nas diferentes peneiras (Tabela 5). A FM favoreceu a formação de escleródios maiores retidos na peneira de malha 4 mm no método AZ (Tabela 5).

Na peneira de malha 2,5 mm para todos os métodos, não houve diferença estatística no que se refere a número de escleródios por grama, independente da presença ou ausência de FM (Tabela 5).

Na peneira de malha 1 mm, ficou retido maior número de escleródios considerados pequenos em todos os métodos. O método T+P sem presença de FM teve a tendência de produzir menor número de escleródios por grama na malha de 1mm, mas não diferiu estatisticamente dos métodos T e AZ (Tabela 5).

Tabela 5. Número de escleródios por grama de escleródios retidos nas peneiras com malha de 4, 2,5 e 1mm

Peneiras /malha	Farinha de milho	Métodos/meios				
		T <sup>1</sup>	AZ <sup>2</sup>	T+P <sup>3</sup>	AR <sup>4</sup>	NELSON <sup>5</sup>
4 mm	Presença	15,7 aB	22,3 aA	15,5 aB	15,3 aB	16 aB
	Ausência	12,6 aA	10,5 bA	13,5 aA	0,0 bB	0,0 bB
	CV (%)	10,53				
2,5 mm	Presença	53 aA	53 aA	52 aA	52,3 aA	55 aA
	Ausência	53,6 aA	53,5 aA	49 aA	0,0 bB	0,0 bB
	CV (%)	5,6				
1 mm	Presença	168,7 aA	160 aAB	133 aB	153 aAB	168 aA
	Ausência	145 bA	157,5 aA	128 aA	0,0 bB	0,0 bB
	CV (%)	6,1				

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>T: Trigo; <sup>2</sup>Arroz; <sup>3</sup>Trigo mais perlita; <sup>4</sup>Areia; <sup>5</sup>NELSON

Na Tabela 6 são apresentados os rendimentos de escleródios para cada meio com a presença e ausência de FM. Para a peneira de malha 4 mm o método NELSON apresentou o maior rendimento, com 1,68 escleródios por grama de meio. Na ausência de FM, no método T+P o rendimento foi mantido, como nas variáveis apresentadas anteriormente. Na peneira com malha 2,5 mm para os métodos AR e T+P, houve o maior rendimento de escleródios na presença e ausência de FM, respectivamente. O mesmo fato ocorreu na peneira com malha 1 mm, mas na presença de FM o método AR e NELSON não diferiram entre si e na ausência os métodos T+P e T também foram semelhante estatisticamente quanto ao rendimento de escleródios.

Tabela 6. Massa (g) de escleródios produzidos por grama de substrato e retidos nas peneiras com malha 4, 2,5 e 1mm

Peneira /malha	Farinha de milho	Métodos/meios				
		T <sup>1</sup>	AZ <sup>2</sup>	T+P <sup>3</sup>	AR <sup>4</sup>	NELSON <sup>5</sup>
4 mm	Presença	0,9 aA	0,2 aC	0,4 bC	0,4 aC	1,7 aA
	Ausência	0,7 aA	0,02 bB	0,9 aA	0,0 bB	0,0 bB
	CV (%)	25,9				
2,5mm	Presença	4,1 aC	1,9 aD	3,7 bC	9,6 aA	6,8 aB
	Ausência	4,9 aB	1,7 aC	9 aA	0,0 bD	0,0 bD
	CV (%)	11,4				
1 mm	Presença	3,9 bB	2,6 aB	3,2 bB	11,1 aA	8,7 aA
	Ausência	9,4 aA	4,5 aB	10,3 aA	0,0 CB	0,0 CB
	CV (%)	18,8				

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>T: Trigo; <sup>2</sup>Arroz; <sup>3</sup>Trigo mais perlita; <sup>4</sup>Areia; <sup>5</sup>NELSON

O meio T+P, com grãos de trigo misturados com perlita, sem adição de FM, descrito por Sansford & Coley-Smith (1992), foi o melhor para produção de escleródio do isolado utilizado. Este método mostrou-se prático e rápido, sendo que a presença da perlita facilita a colheita dos escleródios. O método selecionado supera a produção total de escleródios obtidos por Mylchreest & Wheeler (1987), Costa & Costa (2006) e Berlin et al. (1988), exceto o próprio método T+P descrito por Sansford & Coley-Smith (1992) que produziu independente do tamanho de escleródios, entre 27 e 42 escleródios por grama de trigo dependendo do isolado. Esses dados confirmam os resultados obtidos por este método que foi o melhor na maioria das variáveis avaliadas neste experimento. Considerando a produção total de escleródios no método T+P, obteve um rendimento de 22 escleródios por grama de trigo, independente da malha da peneira.

Este menor rendimento em relação ao método original de Sansford & Coley-Smith (1992) pode ser explicado pela redução na quantidade de perlita e a origem do isolado ser diferente. A perlita grossa, quando misturada com os grãos de trigo deixaram o substrato com maior aeração, com menor densidade, facilitando a colonização do fungo e posterior formação de escleródios.

A diferença de isolados na capacidade de produzir escleródios em diferentes substratos pode ser mais importante do que a fonte nutricional, pois no trabalho de Sansford & Coley-Smith (1992) houve incremento de até 52% a mais de alguns isolados em relação a outros com o mesmo substrato, nas mesmas condições de incubação e ambiente. Alguns isolados produziram até 42 escleródios por grama de meio de trigo misturado com perlita grossa (proporção de 1:2).

Portanto, na literatura existe muita diferença na capacidade de produção de escleródios, pois trata-se de um fungo com alta variabilidade genética, devido a reprodução sexuada.

Quanto a contribuição da adição de FM, obteve-se diferentes resultados em função dos métodos. Em geral, não houve incremento, ou não houve diferença estatística, entre presença e ausência de FM no rendimento de escleródios, discordando de Fernandes et al. (1993), que relatam que a adição de fubá favoreceu a formação de escleródios.

Segundo Nelson et al. (1988), a FM pode ser utilizada na produção de escleródios. Estes autores obtiveram em média, 11,56 (isolado S12) a 24 (isolado S-1) escleródios por grama de meio com tamanho de 4,8 mm a 5,4 mm respectivamente. Esse mesmo método (NELSON), quando repetido neste experimento, produziu 17

escleródios por grama de substrato (FM), mas com tamanho menores, ficando retidos entre as malhas de peneira de 1 mm e 4,0 mm. Essa diferença do método original, pode ter sido influenciada pelas características do isolado utilizado e algum detalhe da metodologia que não foi descrita claramente no artigo.

Para o método AZ, com a metodologia de Costa & Costa (2006), a base de grãos de arroz, dificultou a separação dos resíduos dos grãos de arroz. Em relação ao método T+P, houve menor quantidade de escleródios retidos em cada malha de peneira, mas dependendo da disponibilidade de substratos e necessidade de inóculo o método AZ pode ser utilizado para produção de escleródios.

Outros autores investigaram também a produção de escleródios *in vitro*, com substratos diferentes dos usados nestes ensaios. Nasser et al. (1995), relatam que liquidificando as colônias puras e distribuindo o líquido sobre cenouras autoclavadas em bandejas de alumínio, recobertas com papel-alumínio, obtiveram 112 g de escleródios em 1,9 kg de cenouras.

Fernandes et al. (1993), avaliaram a produção de escleródios em raízes de cenoura, mandioquinha salsa, pecíolo de repolho, alface e vagem mais batata-dextrose, misturados ou não com FM. Os melhores resultados foram com repolho, cenoura, ou mandioquinha salsa mais farinha de milho adicionados com batata-dextrose, produzindo 2,6 escleródios por grama de meio.

Garcia (2008), obteve maior rendimento e número de escleródios nos meios contendo feijão e girassol, suplementados de FM. Este mesmo autor concluiu que a produção de escleródios pode ser obtida por diferentes substratos, escolhendo-se de acordo com a

disponibilidade dos componentes de preparo, quantidade e praticidade de obtenção dos escleródios e o seu custo.

Em geral, os autores citados não conseguiram superar os rendimentos do melhor método (T+P), selecionado no presente trabalho.

#### **4 CONCLUSÃO**

O meio de cultura mais prático, que produz escleródios em maior número, maior tamanho e peso foi no meio T+P, composto por grãos de trigo e perlita grossa sem adição de FM.

## CAPÍTULO II

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA INDUÇÃO DA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE ESCLERÓDIOS DE

#### *Sclerotinia sclerotiorum*

**RICARDO BRUSTOLIN<sup>1</sup>**

**RESUMO** - O mofo-branco causa danos em várias culturas suscetíveis de importância econômica, dentre elas, a soja, o feijoeiro e algodoeiro. A obtenção de inóculo e a avaliação da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* é de fundamental importância na condução de pesquisas direcionadas ao manejo integrado da doença. O objetivo deste trabalho foi identificar o melhor método para indução da germinação carpogênica de escleródios para produção de ascosporos, de um isolado, produzidos em diferentes substratos. Para isso, foram testados ágar-água e areia de rio saturada com água para quantificar a capacidade de favorecer a germinação carpogênica de três tipos de escleródios: i) produzidos em meio de cultura BSA, ii) produzidos em grãos de trigo com adição de farinha de milho e iii) produzidos em grãos de trigo sem adição de farinha de milho. O ensaio fatorial foi constituído por seis tratamentos com quatro repetições. Os substratos foram acondicionados em gerboxes. Os escleródios foram desinfestados, enxaguados e acondicionados nos

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

substratos. Os gerboxes foram vedados com parafilme e incubados em câmara climatizada a temperatura de 15°C ±2 e fotoperíodo de 12 horas. Decorridos 28 e 32 dias, teve início a germinação com a produção de estipes e de apotécios respectivamente. A partir desse momento, monitorou-se a germinação e, após 60 dias, foi realizada a contagem de escleródios germinados carpopogenicamente, miceliogênicamente e o número total de apotécios formado por unidade experimental e por escleródio. A areia favoreceu a germinação carpopogênica dos escleródios formados em meio de cultura de grãos de trigo com e sem adição de farinha de milho, apresentando 99%, 77% e 21% de escleródios que formaram pelo menos um apotécio, respectivamente.

**Palavras chaves:** soja, *Glycine max*, mofo-branco, apotécio, ascosporos, inóculo, produção

### **COMPARISON OF METHODS FOR CARPOGENIC GERMINATION INDUCTION OF *Sclerotinia sclerotiorum* SCLEROTIA**

**ABSTRACT** - The white mold causes damage to many susceptible economic crops, such as, soybean, beans, sunflower, canola, and cotton. Inoculum production and the evaluation of sclerotia longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* is of fundamental importance in research work directed to integrated disease management. The objective of this study was to identify the best method to induce the sclerotia carpopogenic germination to produce ascospores. Were tested water-agar

and river sand saturated with water to promote carpogenic germination of three sclerotia types: i) produced in the culture medium PSA, ii) produced in wheat kernel with the addition of corn flour (CF) and iii) produced in wheat kernels without the addition of corn flour, in acrylic boxes. The experimental design was a factorial with six treatments and four replications. The sclerotia were surface sterilized, rinsed in water and placed on the substrates. Boxes were sealed with parafilm and incubated in a growth chamber at  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$  and 12 h photoperiod. After 28 and 32 days, germination began with the stipe growth and apothecia formation respectively. Thereafter, the germination was monitored and after 60 days sclerotia germination, either for carpogenic and myceliogenic, were counted, and the total number of apothecia formed per experimental unit and per sclerotia. Sand saturated with water enhanced carpogenic germination of sclerotia formed in wheat grain not containing CF, showing 99%, 77% and 21% of sclerotia that formed at least one apothecium respectively

**Keywords:** soybean, *Glycine max*, white mold, apothecia, ascospores, inoculum production.

## 1 INTRODUÇÃO

O mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) (Lib.) De Bary tem aumentado de ocorrência em lavouras de soja, no Brasil.

Os escleródios podem germinar de duas formas, micéliogenicamente (PURDY, 1979) e carpogenicamente

(SCHWARTZ & STEADMAN, 1989). A produção de ascosporos depende da formação de apotécios através da germinação carpogênica. Para isso a dormência exógena dos escleródios deve ser superada. (COLEY-SMITH & COOKE, 1971).

A inoculação de plantas de soja [*Glycine max* (L) Merr] com Ss, em estudos envolvendo o processo infeccioso, requer a produção de ascosporos, a semelhança do que ocorre naturalmente. Para a obtenção de ascosporos é necessária a germinação dos esclerócios originando os apotécios. Diversos fatores devem ser satisfeitos para que ocorra a germinação destas estruturas de dormência. Dentre eles, a temperatura (CLARKSON et al., 2007), a umidade do solo, a aeração a profundidade da sua posição no perfil do solo (WU & SUBBARÃO, 2008) são considerados determinantes. A umidade do solo também tem um efeito significativo sobre germinação carpogênica dos escleródios (MORRALL, 1977), mas o período que o solo permanece úmido para que ocorra a germinação carpogênica, varia de acordo com o isolado, mas em geral, escleródios recém formados precisam ser incubados por maior período de tempo sob temperaturas amenas e alta umidade do solo (MILA & YANG, 2008; HUANG & KOZUB, 1994; ABAWI & GROGAN, 1979)

A germinação carpogênica é altamente dependente da disponibilidade de água no solo. Pesquisas indicam que a germinação pode ocorrer desde condições de solo saturado até relativamente seco, com tensão de água variando de zero a 750 kPa (BOLAND & HALL, 1987; FERRAZ et al., 1999; MORRALL, 1977; PHILLIPS, 1987). Venette (1998) e Clarkson et al. (2003) relatam que as condições ótimas para formação de apotécios ocorre quando a umidade do solo

for superior a 50% da capacidade de campo. Segundo Cook et al. (1975) embora outros fatores estejam envolvidos, a flutuação de umidade do solo pode ser um estímulo importante para a germinação. Boland & Hall (1987) observaram que nas duas semanas que antecederam a ocorrência de apotécios no campo, a temperatura do solo esteve na faixa de 15-30°C e o potencial matricial do solo, geralmente acima de 5 bars. No campo, essas condições podem ocorrer quando as entrelinhas da cultura do feijoeiro fechar. O microclima entre as fileiras de feijão em pleno desenvolvimento é menos sujeito a variações de temperatura e umidade em comparação ao ambiente externo (NATTI, 1971).

Outros fatores como textura do solo e qualidade da luz também desempenham papel importante na germinação carpogênica e formação dos apotécios (SINGH & SINGH, 1983; ROUSSEAU et al., 2006; SUN & YANG, 2000; WILLETTS & WONG, 1980).

Os relatos encontrados na literatura são contraditórios quanto o efeito destes fatores sobre a germinação carpogênica de escleródios de diferentes isolados. As diferenças no potencial de germinação dos escleródios de diferentes isolados, podem ser explicadas por sua origem geográfica (HUANG & KOZUB, 1994) ou pelos requerimentos térmicos na qual escleródios foram formados (HUANG E KOZUB, 1989).

Para a indução da germinação carpogênica *in vitro*, objetivando a maior produção de apotécio e ascosporos, deve-se considerar o substrato que os escleródios foram formados. Nasser et.al. (1998) descreveram que escleródios oriundos de lavoura com um ano de incubação no solo germinam mais rápido e, com um maior

número de apotécios do que a produção de escleródios *in vitro*, decrescendo em número de apotécios ao longo de 60 dias, indicando que os escleródios necessitam passar por processo de maturação e que o decréscimo pode ser devido a presença de contaminantes que inviabilizam os escleródios. Estes autores também fazem referência de que escleródios produzidos em meio contendo farinha de milho, não foi favorável a germinação carpogênica, ou seja, pode ser afetada pela concentração de carboidratos do substrato.

Na produção de apotécios, os escleródios devem ser produzidos em meios com menor concentração de carboidratos. Budge & Whipps (1991), obtiveram o maior número de apotécios a partir de escleródios formados em meios com baixa concentração de sacarose.

O substrato para indução da germinação carpogênica do escleródios também deve ser considerado, a relatos do uso de ágar-água (KOSASIH & WILLETTS, 1975; TOMAZINI & REIS, 2005), areia úmida; (SINGH & SINGH, 1979) ou solo, HONDA & YUNOKI, 1977).

A complexidade do tema ainda se torna mais confusa quando se considera, na germinação carpogênica de escleródios, o fator efeito de isolados de diferentes regiões geográficas (GARG & SIVASITHAMPARAM, 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o melhor método para indução da germinação carpogênica de escleródios para produção de ascosporos, a partir de escleródios produzidos em diferentes substratos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na câmara climatizada do Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo-RS (UPF), em 2012. Foi testada a eficiência da areia e agar água (A/A) na indução da germinação carpogênica de escleródios produzidos em diferentes substratos (Tabela 1). O delineamento experimental foi um fatorial em blocos ao acaso com quatro repetições.

Tabela 1. Combinação dos tratamentos do ensaio bifatorial

Tratamentos	Substrato	Origem dos escleródios
1	Areia	Trigo com FM <sup>1</sup>
2	Areia	Trigo sem FM
3	Areia	BSA <sup>2</sup>
4	Agar/água	Trigo com FM
5	Agar/água	Trigo sem FM
6	Agar/água	BSA

<sup>1</sup>FM: farinha de milho; <sup>2</sup>BSA: batata sacarose ágar.

### 2.1. Obtenção dos escleródios

Os escleródios utilizados foram produzidos a partir de um isolado monospórico de escleródios de Ss coletado em plantas de soja doentes em lavoura no município de Coxilha-RS-Brasil.

Os escleródios foram obtidos utilizando-se meios de cultura selecionados na literatura e validados no Capítulo 1 desta dissertação. Assim, foram utilizados escleródios formados em: i) grãos de trigo

com adição de farinha de milho (FM), ii) grãos de trigo sem adição de FM e iii) os formados em meio de cultura BSA (batata sacarose ágar) que foram coletados de colônias puras com tamanho médio de 4,4 mm x 2,2 mm com um mês de idade armazenados em condições de ambiente no laboratório. Os escleródios formados em grão de trigo com e sem adição de FM foram utilizados depois de três meses de armazenamento em geladeira a 5°C. Foram peneirados e selecionados os retidos na peneira de malha 2,5 mm.

## **2.2. Preparos dos substratos para a indução da germinação carpogênica de escleródios**

Foram avaliados a areia e o A/A como substratos para indução da germinação carpogênica. Inicialmente, foi preparado 1L de meio A/A com concentração de 1,5% de ágar, autoclavado por 20 minutos a 120°C e vertidos 40 mL em caixas de acrílico (gerbox) com tamanho de 11 x 11cm e altura de 3,5cm de altura, devidamente esterilizadas com formol por 2 dias. No mesmo dia foi preparado o tratamento com areia, utilizando areia de rio lavada em água corrente por 10 vezes para retirar todas as impurezas (argila, matéria orgânica), seca ao sol sobre uma lona plástica negra, por três dias, após foi peneirada e selecionada a que passou na peneira com malha de 1mm. A areia foi transferida para erleynmeyers de capacidade de 1L de volume, tamponados e autoclavados por 1 hora a 120°C e re-autoclavados após 24 h. Foram depositas 180 gr de areia por unidade experimental (gerboxes), devidamente esterilizados, seguida da adição de 39 mL de água destilada e esterilizada (ADE) resultando num potencial

osmótico de zero. Posteriormente, os escleródios selecionados foram desinfestados por cinco minutos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1%, enxaguados com ADE, plaqueados 25 por gerbox, e vedados com parafilme de pvc e incubados a  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$ , em câmara climatizada com fotoperíodo de 12 horas luz (intensidade de 5000 lux).

### **2.3 Avaliações**

As avaliações iniciaram a partir da formação do primeiro apotécio. Foi realizada a contagem do número de apotécios completamente formados a intervalos de 15 dias, finalizando aos 60 dias de incubação. Os dados foram apresentados como percentagem de germinação carpôgenica e miceliogênica, nos diferentes tratamentos e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Aos 28 dias após o plaqueamento houve a emissão das primeiras estipes e aos 32 dias surgiram os primeiros apotécios.

Na areia saturada com água, houve a maior germinação carpogênica, independentemente das origens dos escleródios, exceto para os formados em grãos de trigo sem a presença de FM, onde não houve diferença estatística entre o substrato de areia e A/A. A presença de FM favoreceu a maior percentagem de formação de apotécios na areia e no A/A (Tabela 2), discordando do relato citado

por Nasser, (1998) que relata que a FM desfavorece a formação de apotécios.

Tabela 2 - Germinação (%) carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos

Substratos	Origem dos escleródios		
	MC <sup>1</sup>	Trigo com FM <sup>2</sup>	Trigo sem FM <sup>2</sup>
Areia	A 99 a	B 77 a	C 21 a
Ágar/água	A 49 b	A 57 b	B 5 a
<b>CV (%)</b>	<b>23,4</b>		

Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>MC: meio de cultura BSA; <sup>2</sup>FM: com e sem presença de farinha de milho

Nos escleródios formados em grãos de trigo, independente da utilização de FM na formação dos escleródios, predominou a germinação micéliogênica, ao contrário ocorreu para MC. O A/A favoreceu também a formação de micélio. Na areia, os escleródios formados em grãos de trigo, tanto com e sem presença de FM, germinaram em alguns casos nas duas formas, micéliogênica e carpogênicamente (Tabela 3).

As formas de germinação podem ser explicado a partir do relato de Nelson et al (1988) que avaliaram a germinação carpogênica logo após a produção de escleródios em substrato composto principalmente por FM, sendo que a germinação carpogênica foi avaliada depois de 5 e 7 meses de armazenamento dos escleródios do mesmo isolado, os quais foram pré condicionados por 72 horas em água destilada a 4°C. Deduz-se que escleródios recém formados

tendem a predominar a germinação micéliogenicamente e que se armazenados por 5 a 7 meses tendem a germinar na forma carpogênica. De forma semelhante, Nasser et.al. (1998), concluíram que escleródios oriundos de lavoura, com um ano de incubação, germinaram mais rápido e, com um maior número de apotécios do que a produção de escleródios *in vitro*.

Desta forma, visando a obtenção de apotécios e diminuindo a germinação micéliogênica, sugere-se novas pesquisas avaliando o tempo de armazenamento de escleródios produzidos *in vitro*, a campo, em plantas de soja.

Tabela 3 - Germinação (%) micéliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos

Substratos	Origem dos escleródios		
	MC <sup>1</sup>	Trigo com FM <sup>2</sup>	Trigo sem FM <sup>2</sup>
Areia	B 0,0 a	A 36 b	A 45 b
Ágar/água	B 0,0 a	A 85 a	A 97 a
<b>CV (%)</b>	<b>34,7</b>		

Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>MC: meio de cultura BSA; <sup>2</sup>FM: com e sem presença de farinha de milho

O maior número de apotécios por escleródio ocorreu em areia com os escleródios produzidos no substrato de MC e trigo com e sem presença de FM, concordando com o relato de Singh & Singh (1979), que selecionaram a areia como substrato para indução da germinação carpogênica. O trigo com FM formou 1,05 apotécios produzidos em A/A, superior aos escleródios do MC e do trigo sem FM (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de apotécios por escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos

Substratos	Origem dos escleródios		
	MC <sup>1</sup>	Trigo com FM <sup>2</sup>	Trigo sem FM <sup>2</sup>
Areia	A 1,45 a	A 1,33 a	B 0,38 a
Ágar/água	B 0,52 b	A 1,05 a	C 0,11 a
<b>CV (%)</b>	<b>24,01</b>		

Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>MC: meio de cultura BSA; <sup>2</sup>FM: com e sem presença de farinha de milho

O número de apotécios formados por escleródio oriundos de MC e de grãos de trigo com FM, não diferem entre si (Tabela 5).

Apesar da germinação miceliogênica na areia dos escleródios produzidos em grãos de trigo com presença de FM, podem ser utilizados para obtenção de apotécios, visto que esta metodologia não necessita de pré condicionamento dos escleródios, como citado por Nelson et al. (1988) possibilitou a partir de 32 dias a colheita de apotécios, tempo inferior ao relatado por outros autores (NELSON et al., 1988).

Considerando o potencial de produção de ascósporos em um apotécio, sugere-se o planejamento desde a produção do escleródio até a sua germinação carpogênica, dependendo da demanda de ascósporos para utilização futuras.

Tabela 5 - Número total de apotécios formados por unidade experimental (25 escleródios) durante 60 dias, em função do substrato onde foram produzidos e sobre dois substratos

Substratos	Origem dos escleródios		
	MC <sup>1</sup>	Trigo com FM <sup>2</sup>	Trigo sem FM <sup>2</sup>
Areia	A 36,2 a	A 33,2 a	B 9,5 a
Ágar/água	B 13,0 b	A 26,2 a	C 2,7 a
<b>CV (%)</b>	<b>24,01</b>		

Médias seguidas por mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

<sup>1</sup>MC: meio de cultura BSA; <sup>2</sup>FM: com e sem presença de farinha de milho

#### 4. CONCLUSÕES

A areia saturada com água foi o melhor substrato para induzir a germinação carpogênica dos escleródios independente do substrato sobre o qual foram produzidos;

Os escleródios formados em BSA (MC) e em grãos de trigo suplementado com FM, produzem o maior número de apotécios a partir de 32 dias de incubação;

### CAPÍTULO III

#### LONGEVIDADE DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* NA SUPERFÍCIE DO SOLO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

RICARDO BRUSTOLIN<sup>1</sup>

**RESUMO** - Em experimento conduzido no campo quantificou-se o período de viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss). Escleródios naturalmente produzidos em plantas de soja por Ss foram coletados numa máquina de pré-limpeza. Separaram-se apenas aqueles produzidos dentro da medula das plantas e com tamanho semelhante, medindo aproximadamente 8 mm de comprimento e 1,9 mm de diâmetro. Cinquenta escleródios foram colocados em cada recipiente feito com tela de nylon branca, malha de 0,25 mm e medindo 25 x 25 cm. Posicionaram-se na superfície do solo 80 recipientes, simulando o plantio direto, sendo que mensalmente foram removidos quatro recipientes e trazidos ao laboratório. O solo aderido foi removido das embalagens com jato d'água e os escleródios submetidos a assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e postos a germinar em areia de rio, lavada e esterilizada acondicionada em gerboxes, os quais foram incubados em câmara de crescimento a 15°C±2 e fotoperíodo de 12 horas. Os escleródios na superfície perderam a viabilidade em

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

12 meses. Conclui-se que sob plantio direto os escleródios perderam a viabilidade num período de tempo menor do que os citados na literatura e que a densidade de inóculo de Ss pode ser reduzida pela rotação de culturas.

**Palavras chaves:** sobrevivência, estrutura de repouso, mofo-branco, soja, *Glycine max*.

#### **LONGEVITY OF *Sclerotinia sclerotiorum* SCLEROTIA ON THE SOIL SURFACE UNDER FIELD CONDITIONS**

**ABSTRACT** - In an experiment conducted in the field the longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) sclerotia was quantified. Naturally sclerotia produced in soybean plants were collected in a pre-cleaning machine. Only those produced within the plant pith with similar size, measuring approximately 8 mm long and 1.9 mm in diameter were selected. Fifty sclerotia were placed in each container made of a nylon white mesh of 0.25 mm and measuring 25 x 25 cm. Eighty container were positioned on the soil surface, simulating zero tillage, and at monthly interval, four containers were brought to the laboratory. The soil was removed with water jet and the clean sclerotia were surface sterilized with sodium hypochlorite 1%, for 5 minutes. They were induced to germinate on river sand saturated with water in sterile acrylic boxes and incubated in a growth chamber at  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$  and 12 h photoperiod. The sclerotia lost viability in 12 months. It was concluded that under no till the sclerotia can lost viability within a shorter time than those reported in the literature and the Ss inoculum

density can be reduced by crop rotation/succession with nonsusceptible plant species.

**Keywords:** survival, resting structure, white mold, soybean, *Glycine max*.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a área de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] atacada por mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Ss), segundo Meyer<sup>1</sup> é de aproximadamente 6,3 milhões ha (informação verbal, 2012).

O mofo-branco é considerada uma das doenças mais destrutivas. A função de danos na soja, uma média de nove experimentos, foi de  $R = 1.000 - 6,7 I$  ( $R$  = rendimento normalizado para 1.000 kg / ha e  $i$  = incidência em plantas) (REIS et al., 2011).

O escleródio é um agregado de hifas com o exterior preto formando uma casca com várias células de melanina, importante na proteção em condições adversas e de degradação microbiana de muitos fungos (BELL & WHEELER, 1986; HENSON et al., 1999). Por isso, desempenham um papel importante no ciclo da doença, sendo as principais estruturas de sobrevivência a longo prazo (WILLETTSSE & WONG, 1980).

A longevidade dos escleródios é muito variável de acordo com

---

<sup>1</sup>MEYER, M. (Embrapa Soja - Londrina/PR)

os diferentes autores. Davis (1925) verificou que escleródios Ss próximos a superfície, não permanecem viáveis por mais de um ano; podem permanecer viável de três a cinco anos (MCLEAN, 1958; SHWARTZ & STEADMAN, 1978); no mínimo dois anos (COLEY-SMITH & COOKE, 1971); no mínimo por três anos (COOK et al., 1975); até oito anos quando no solo (ADAMS & AYERS, 1979); 11 anos (GÖRGEN et al., 2010; LEITE, 2005).

O período de sobrevivência de escleródios de Ss no solo, em condições de campo, segundo Reis & Tomazini (2005), varia com a sua profundidade. Escleródios apresentaram maior viabilidade quando enterrados a 10 cm do que aqueles mantidos na superfície do solo. O decréscimo da viabilidade mensal pode ser representada pelas equações  $y = -2,5086x + 96,205$  ( $R^2 = 0,97$ ),  $y = -6,0719x + 82785$  ( $R^2 = 0,99$ ) respectivamente.

Na literatura as informações sobre o período de longevidade são muito confusas. Na maioria dos trabalhos a metodologia não está bem descrita, dificultando a comparação entre as diferentes situações de ambiente. Assim, para esclarecer sobre a longevidade dos escleródios nas condições edafoclimáticas de Passo Fundo/RS, objetivo deste trabalho foi determinar o tempo necessário para que escleródios de Ss perdessem por completo a viabilidade na superfície do solo, em condições de campo, simulando o sistema de plantio direto na palha.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido entre abril de 2011 e junho de 2012 no campo experimental da Universidade de Fundo com altitude de 705 m acima do nível do mar (anm). Os escleródios foram obtidos de plantas de soja em uma lavoura comercial, onde foram coletados em um equipamento de pré-limpeza. Escleródios com tamanho médio de 8,02 mm x 1,95 mm foram selecionados, para uso no trabalho.

Cinquenta escleródios foram introduzidos em cada recipientes feito com malha de nylon de 0,25mm e medindo 25 x 25 cm. Um total de 80 recipiente foram preparados.

Em abril de 2011 os recipientes foram levados para o campo e colocados sobre a superfície do solo, sob resíduos da soja logo após a colheita, simulando o sistema de plantio direto na palha. Os recipientes foram fixados com grampos de arame. No inverno, a área foi cultivada com aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), seguida de soja no verão, observando-se a sequência de soja/aveia/soja. Na semeadura, os recipientes foram retirados e imediatamente após foram realocados e colocados novamente os resíduos vegetais sobre os mesmos. No cultivo da soja após a aveia preta, seguiu-se o mesmo procedimento, e posteriormente as embalagens ficaram entre as linhas de soja, nas condições ambientais do dossel das plantas de soja, simulando uma lavoura normal.

Em intervalos mensais, quatro sacos (repetições) foram retirados do campo. No laboratório, eles foram lavados com jatos de água, retirados os escleródios do recipiente, desinfestados por cinco minutos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1%,

enxaguados com ADE e plaqueados 25 escleródios por gerbox previamente desinfestado. Em cada gerbox foi adicionado 180 gr de areia de rio, lavada, peneirada (peneira com malha de 1mm), esterilizada e saturada através da adição de 39 mL de água destilada e esterilizada (ADE), resultando num potencial osmótico de zero. Posteriormente os gerboxes foram vedados com parafilme de pvc e incubados a  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$ , em câmara climatizada com fotoperíodo de 12 horas luz.

Considerou-se germinado aquele que formou apotécio em um período máximo de 60 dias.

O delineamento foi em blocos ao acaso e os dados foram submetidos à análise de regressão linear.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os escleródios na superfície do solo perderam a viabilidade em 12 meses nas condições edafoclimáticas de Passo Fundo (Figura 1). Este período de tempo é necessário para eliminar o inóculo de Ss na superfície do solo, gerando informação de quanto tempo uma cultura suscetível pode voltar a ser cultivados na área anteriormente infestada. Saber a longevidade dos escleródios, é importante para determinar o período de rotação, ou o período entre o cultivo de hospedeiros suscetíveis na área para controle de Ss.

Com o passar do tempo, houve um declínio linear da viabilidade dos escleródios. No momento de cada coleta, observou-se que a maior parte dos escleródios havia germinado, enquanto alguns, ainda permaneciam dormentes, rígidos sem a emissão da estipe.

Após 12 meses, em 16 de junho de 2012, a viabilidade de escleródios, chegou a zero (Figura. 1) tempo menor do que algumas referências (MCLEAN, 1958; COLEY-SMITH & COOKE, 1971; COOK et al., 1975; SHWARTZ & STEADMAN, 1978; ADAMS & AYERS, 1979; STEADAMAN, 1983; LEITE, 2005; GÖRGEN et al 2010), mas esse dados foram semelhante ao relato de Davis (1925) e de Reis & Tomazini (2005).

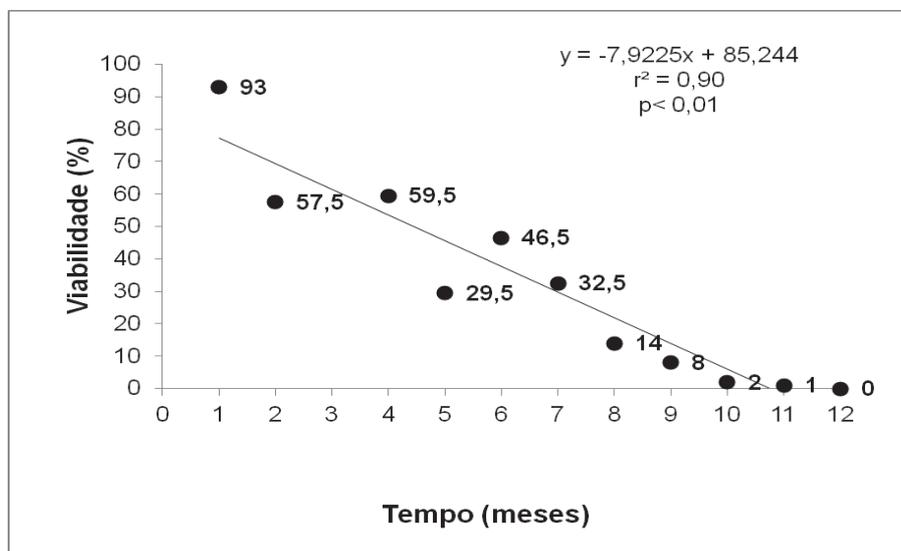


Figura 1. Longevidade (meses) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na superfície do solo em condições naturais. Cada ponto representa a média de quatro repetições.

Com a germinação carpogênica é reduzida a densidade de escleródios no solo. Ferraz et al. (1999) estimularam a germinação por meio da cobertura do solo como com a *Brachiaria* ao fornecer umidade suficiente para a sua germinação.

Outra alternativa para reduzir a densidade de escleródio no solo pode ser a rotação de culturas com as culturas não suscetíveis como as gramíneas, durante um período de tempo no qual ocorra a germinação de todos escleródios no banco do solo. Este período foi determinado por Reis & Tomazini (2005) e confirmada no presente trabalho. Diversos fatores estão envolvidos na germinação de escleródios. Segundo ABAWI & GROGAN (1979), o teor de água no solo, a temperatura e a luz são considerados os fatores mais importantes para a germinação carpogênica (Produção de apotécios) de escleródios de *Ss*. A faixa de temperatura ótima a sua produção é de 12 – 18°C (SUN & YANG, 2000). Ferraz et al. (1999) relataram que o teor de umidade do solo e frequência de irrigação, afetam diretamente a germinação carpogênica.

Na Tabela 1 é apresentada as condições ambientais ocorrentes na UPF durante o experimento e foi constatado precipitação pluvial abaixo da normal de setembro de 2011 a abril de 2012 quando o ensaio foi finalizado.

Com isso pode-se deduzir que a perda da viabilidade poderia ter sido menor que 12 meses, caso não tivesse ocorrido a estiagem no local do ensaio. Deduz-se que a precipitação pluvial pode está diretamente relacionada com o teor e a duração da umidade do solo e conseqüentemente com a germinação carpogênica. Pesquisas indicam que a germinação pode ocorrer desde condições de solo saturado até relativamente seco, com tensão de água variando de zero a 750 kPa (BOLAND & HALL, 1987; FERRAZ et al., 1999; MORRALL, 1977; PHILLIPS, 1987).

Venette (1998) e Clarkson et al. (2003) relatam que as condições ótimas para formação de apotécios ocorre quando a umidade do solo for superior a 50% da capacidade de campo. Segundo Cook et al. (1975) embora outros fatores estejam envolvidos, a flutuação de umidade do solo pode ser um estímulo importante para a sua germinação.

Boland & Hall (1987) observaram que nas duas semanas que antecederam a ocorrência de apotécios no campo, a temperatura do solo esteve na faixa de 15-30°C e o potencial matricial do solo, geralmente acima de 5 bars.

Ferraz et al. (1999) mencionam que a doença causada por Ss no feijão, foi menor no plantio direto do que no preparo convencional e discutem a possibilidade do desempenho da palha como uma barreira física para a disseminação de ascósporos. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos com a viabilidade de escleródios em um curto intervalo de tempo sob plantio direto, como a supressividade do solo.

Tabela 1 - Registro das variáveis ambientais durante a condução do experimento

Meses/ano	Temperatura média (C°)	Precipitação pluvial (mm)	Precipitação pluvial (mm) (média últimos 8 anos)
Abr-11	18,4	108,8	165,0
Mai-11	14,1	137,1	170,5
Jun-11	11,4	226,7	163,4
Jul-11	12,4	340,0	172,9
Ago-11	13,3	253,9	138,0
Set-11	15,4	47,3	189,7
Out-11	18,3	194,7	225,3
Nov-11	20,2	77,1	183,4
Dez-11	21,2	91,2	151,7
Jan-12	22,1	105,2	136,1
Fev-12	23,6	86,0	142,3
Mar-12	20,7	114,5	122,3
Abr-12	20,5	23,2	165,0
<b>Média/total</b>	<b>17,8</b>	<b>1805,7</b>	<b>2125,6</b>

A viabilidade das estruturas de repouso no solo pode ser afetada por vários fatores, incluindo o teor de água do solo, profundidade no solo, alternância do molhamento e secagem, (DAVIS et al. 1997). Além destes, as estruturas de repouso necessitam de luz como um estímulo para a germinação como citado por Sun & Yang (2000) e confirmado por Reis & Tomazini (2005) ao discutirem que no plantio direto ficam mais expostos a luz enquanto que os enterrados não.

No presente experimento, e no realizado por de Reis & Tomazini (2005), a germinação ocorreu na ausência de hospedeiro, evidenciando que provavelmente não requerem estímulo do hospedeiro suscetível, mas sim de estímulos do ambiente.

De forma semelhante ao banco de sementes de ervas daninhas no solo, termo que tem sido usado para descrever o montante de sementes viáveis e outras estruturas de propagação presentes no solo, que representam um papel ecológico importante no suprimento de novos indivíduos para as comunidades vegetais ao longo do tempo (CARMONA, 1992), pode-se inferir também da existência de um banco de escleródios de Ss no solo.

O escleródios são produzidos por todos os hospedeiros suscetíveis no inverno, primavera e verão. Assim, sempre e constantemente, germinam, formando apotécios e infectando plantas suscetíveis, causando doença e formando novamente os escleródios, cumprindo a sua função biológica. No momento da colheita das espécies cultivadas, ou senescência de ervas daninhas, caem no solo, e novamente a densidade de inóculo é aumentada ou substituída, que tinha sido reduzida desde a colheita de culturas suscetíveis. Se não houver reposição, a densidade dos escleródios é reduzida e o banco pode chegar a zero na superfície do solo.

As doenças causadas por Ss são considerados de difícil controle porque o fungo pode permanecer viável no solo por até 8 anos (ADAMS & AYERS, 1979), e, por conseguinte, não seria controlada pela rotação de culturas por um período de tempo menor.

Diante dos dados aqui obtidos, confirmando os de Reis & Tomazini (2005), se pode inferir que há potencial de redução/eliminação do banco de escleródios de Ss no solo, pela rotação/sucessão de culturas com espécies não suscetíveis.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os escleródios de *Ss* perdem a viabilidade na superfície do solo, em condições de campo, simulando o plantio direto, num período de tempo de 12 meses.

## CAPÍTULO IV

### SEMENTES DE SOJA INFECTADAS POR *Sclerotinia sclerotiorum*: FONTE DE INÓCULO E TRANSMISSÃO

RICARDO BRUSTOLIN<sup>1</sup>

**RESUMO** - Os objetivos deste trabalho foram (i) identificar uma metodologia para a inoculação artificial de sementes de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), (ii) descrever o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos aéreos por via lesão cotiledonar e (iii) verificar a ocorrência da produção de escleródios no processo de transmissão. Para isso necessitou-se obter sementes infectadas para testar as hipóteses do trabalho. Assim, foi realizado um experimento com quatro tempos de exposição (12, 24, 36 e 48 horas) das sementes de soja ao micélio de Ss. Foi utilizado um isolado monospórico do fungo do município de Coxilha/RS (CX). As sementes de cada tratamento foram distribuídas em quatro repetições e retiradas nos tempos estabelecidos, secadas e plaqueadas, 125 sementes por tratamento, em cinco gerbox contendo meio de NEON-S para detecção de Ss. Foi avaliada a incidência de Ss e a germinação das sementes. Com essa metodologia foi infectada sementes de soja para os experimentos de transmissão conduzido em ambiente controlado e no campo. No ambiente controlado após cinco dias, as infectadas e

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

não infectadas foram semeadas em solo e avaliada a emergência de plântulas, a transmissão para os cotilédones (lesões) e a formação de escleródios nas sementes que não germinaram. Os cotilédones das plântulas emergidas a partir das sementes infectadas foram retirados das plântulas e colocados em câmara úmida e observada a formação de escleródios. No processo de infecção artificial para obter sementes de soja infectadas com germinação de sementes de soja acima de 60% foi selecionado o tempo de 48 horas de exposição sobre o micélio do fungo. A partir dessas sementes infectadas comprovou-se que as não germinadas apodrecem e podem formar até 2,18 escleródios por semente e no campo não houve a formação devido o deficit hidrico ocorrido. Tanto em câmara de crescimento como no campo, não foi comprovada a transmissão via lesão cotiledonar. Os escleródios formados a partir de sementes infectadas e mortas, podem constituir-se em fonte de inóculo primário em lavouras.

**Palavras chaves:** patologia de sementes, transmissão, mofo-branco, *Glycine max*

**SOYBEAN SEED INFECTED BY *Sclerotinia sclerotiorum*:  
INOCULUM SOURCE AND TRANSMISSION**

**ABSTRACT** - The objectives of this work were to: (i) identify a method for artificial inoculation of soybean seeds with *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss); (ii) describe the transmission process of seed inoculum to aerial organs via cotyledonary lesions; (iii) determine the occurrence of sclerotia production in the transmission process. Artificially inoculated soybean seeds were obtained by four exposure

times (12, 24, 36 and 48 hours) of soybean seeds to Ss mycelium. A monosporic isolate from Coxilha, RS county, was used. The seeds were divided into four replicatios and taken at the appointed times, dried and plated 125 seeds per treatment in five acrylic boxes containing NEON-SE medium for the detection of Ss. The Ss incidence and seed germination were evaluated. With this methodology soybean seeds were infected and used in the transmission experiments conducted in a controlled environment and in the field. In the controlled environment after five days, the infected and uninfected seeds were sown in soil and evaluated seedling emergence, transmission to the cotyledons (lesion presence) and the sclerotia formation by the non germinated seeds. The cotyledons from infected seeds were removed from seedlings and placed in a moist chamber and observed the sclerotia formation. Artificial infected soybean seed with germination over 60% were selected as the exposure time under 48 hours to the fungus mycelium. From these infected and non germinated seeds up to 2.18 sclerotia per seed were formed and in the field was not formed due to the drought. In both growth chamber and in the field was not sees the transmission via cotyledonary lesions. The sclerotia formed from infected dead seeds, can be an inoculum source.

**Keywords:** seed pathology, transmission, white mold, *Glycine max*

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da área infestada e os danos causados pelo mofo-branco na cultura da soja, no Brasil, preocupa o agronegócio. Várias pesquisas apontam como a principal estratégia, no momento, o controle químico da doença. No entanto, é necessário ampliar o conhecimento do ciclo desta doença na procura de fases vulneráveis a outras táticas de controle de modo a viabilizar o seu manejo integrado (MID).

A semente é um veículo importante na disseminação de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Ss) contendo internamente e externamente o micélio dormente ou, também, podendo estar como escleródios entre as sementes. Na literatura há poucas informações sobre a transmissão semente/plântula deste patógeno e a possibilidade de sua introdução em áreas livres.

A presença do micélio de Ss, infectando internamente a semente tem sido citada por alguns autores (YANG et al., 1998) ou infestada com micélio ou escleródios externamente (ZAMBOLIM, 2005).

Tem sido timidamente afirmado que este patógeno é transmitido por sementes. Neste sentido, Hoffman et al. (1998), estudando a qualidade de sementes de soja produzidas em campos infestados pelo patógeno Ss, detectaram incidências em plantas de 0 a 95%, em lavouras, e de 0,3 a 0,7% de sementes infectadas. Do que se pode deduzir que em lavouras com alta incidência da doença em plantas, a incidência em sementes é baixa.

Diante da necessidade de se quantificar a importância da disseminação de *Ss* via sementes infectadas, é necessário o aprimoramento dos métodos para a sua detecção.

Segundo as regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), existem vários métodos para detecção de *Ss* em sementes, com variações na sensibilidade, reprodutibilidade, economicidade e rapidez de resultados. O método recomendado pelas Regras (BRASIL, 2009), e o mais utilizado rotineiramente pelos laboratórios de análise de sementes é o de papel de filtro. Outro método recomendado pelas Regras (BRASIL, 2009), é o de rolo de papel modificado, onde é detectada a semente que evidenciam a presença de micélio algodonoso e com formação de escleródios (PARISI et al., 2006). E por fim, o método mais recente recomendado pelas Regras, o método Neon, descrito originalmente por Steadman et al. (1994) e Nasser et al. (1995). O método Neon passou a ser chamado de Neon-S a partir da modificação proposta por Napoleão et al. (2006), que excluiu o ajuste do pH do meio. O princípio deste meio é a produção de ácido oxálico, pelo micélio do fungo, que reage com o indicador de pH do meio (azul de bromofenol) passando de azul para amarelo, formando um halo amarelado em volta das sementes colonizadas por *Ss*. Mas é preciso o emprego de lupa para confirmar através das estruturas de *Ss*, a sua presença sobre as sementes, pois há outros fungos que produzem ácidos (NAPOLEÃO et al., 2006).

As dificuldades de obter sementes com diferentes incidências naturais por fungos necrotróficos, como *Ss*, tem retardada a comprovação de que as sementes infectadas podem introduzir o fungo nas áreas de cultivo, como ocorre com outros fungos necrotróficos de

órgãos aéreos (REIS & CASA, 1996; PINTO, 1996; ZAMBOLIM et al., 2000).

Por isso, a inoculação de sementes torna-se uma ferramenta útil para o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa em patologia de sementes. A inoculação deve garantir a reprodução da sintomatologia da doença e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção (TANAKA & MENTEN, 1991), transmissão semente-plântula, controle e, principalmente, a quantificação do impacto do inóculo na semente transmitido aos órgãos aéreos, no desenvolvimento de epidemias em órgãos aéreos à partir desta fonte de inóculo.

Comprovar cientificamente a incidência em sementes e a transmissão do inóculo para os órgãos aéreos, resultando na introdução do fungo em novas áreas de cultivo, é um desafio que, uma vez comprovado, pode contribuir para a conscientização da necessidade de se produzir sementes indenes de fitopatógenos, ou de se desenvolver método para sua erradicação. Os dados gerados poderão ser subsídios importantes no estabelecimento de padrões sanitários de sementes de soja.

Os objetivos deste trabalho foram, (i) identificar uma metodologia prática, rápida e de baixo custo, para a inoculação artificial de sementes de soja com Ss, (ii) descrever o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos aéreos via de lesão cotiledonar e (iii) determinar se ocorre a produção de escleródios no processo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia, em câmara climatizada e no campo experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF (Universidade de Passo Fundo) entre março de 2011 e março de 2012.

### 2.1 Isolamento monospórico de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios de Ss presentes na superfície do solo, após a colheita da soja em uma lavoura no município Coxilha-RS-Brasil (CX), foram coletados e trazidos ao laboratório. As estruturas de repouso foram desinfetadas com uma solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos e lavados com água destilada e esterilizada (ADE). As estruturas foram acondicionadas em gerbox (caixas de acrílico 11 x 11cm e 3,5 cm de altura) contendo areia de rio, lavada, esterilizada e saturada com água esterilizada até atingir o potencial osmótico de zero (capacidade de campo), para indução da germinação. Posteriormente, foram colocados em câmara climatizada na temperatura de  $15^{\circ}\text{C}\pm 2$ , com fotoperíodo de 12 horas por 40 dias. A fonte de luz foi constituída por lâmpadas fluorescentes distantes a 20 cm dos gerbox. Após a germinação, os apotécios foram removidos pelo corte das estipes com tesoura e pinça esterilizada. O material foi transferido para um cadinho (marca Chiarotti/Mauá (0,060 mL), contendo 3 mL de ADE e macerados com o pistilo. Posteriormente, foi adicionado 100 mL de ADE ao macerado, coado com um pano de

voal de ceda e a concentração ajustada para 3.000 ascosporos viáveis /mL. Desta suspensão foi vertido 300 µL por placas placa de petri plásticas de 60 mm de diâmetro contendo água-ágar. Após seis horas no escuro a temperatura de  $21^{\circ}\text{C}\pm 2$  , foi realizado o isolamento monospórico (vide capítulo 1), obtendo colônias puras de cada isolado. Discos de 6 mm de diâmetro foram retirados das colônias puras e transferidos para tubos de ensaio (Nº 9820) contendo grãos de trigo esterilizados. Após a colonização dos grãos, foram armazenados em refrigerador a  $5^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

## **2.2 1 Inoculação artificial de sementes de soja e incidência da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum***

Foram avaliados quatro tempos de exposição das sementes depositadas sobre o micélio de Ss: 12, 24, 36 e 48 horas. Inicialmente, foi transferido fragmentos da estrutura do isolado de CX em 16 placas de Petri esterilizadas, com 84 mm de diâmetro, contendo meio BSA (200g de batata, 12g de ágar e 20g de sacarose, 1.000 mL de água destilada). Com sete dias de idade iniciou a formação de escleródios. Neste momento, foi adicionado em cada placa sobre o micélio, 80 sementes de soja da cultivar BMX Ativa com 92% de poder germinativo, sem desinfestação, obtidas de lavouras de produção de semente básica. As placas foram fechadas e lacradas com para filme PVC e incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas. Após completar o tempo de cada tratamento, as sementes de quatro placas (320 sementes) foram removidas e secadas por 72 horas em condições de ambiente. Concluída a secagem, foi determinada a incidência da

infecção para cada tempo de exposição. Para isso, 25 sementes foram desinfestadas por um minuto com hipoclorito de sódio na concentração de 1%, lavadas com água destilada e plaqueadas em gerbox contendo meio de NEON-S descrito por Napoleão et al. (2006), sem a adição do ácido livre 2,4-D. Na avaliação, foi determinado a germinação, onde foi considerada germinada a semente que emitiu a radícula e tocou o meio de cultura e a incidência do fungo nas sementes. A semente que estava infectada foi indicada pelo meio de Neon-S, onde o azul do meio passou para o amarelo, indicando a presença do micélio de Ss.

O delineamento experimental foi em blocos ao a caso com cinco repetições e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **2.3 Inoculação de sementes para avaliação da transmissão semente-plântula**

Foi utilizado o isolado CX tomado da micoteca e transferido para 25 placas de Petri de 84 mm de diâmetro contendo meio BSA . Após 12 dias de idade de crescimento do isolado, foi colocado na superfície das colônias 90 sementes de soja da cultivar BMX Ativa com poder germinativo de 92%, sem desinfestação, obtidas de lavouras de produção de semente básica sem histórico de ocorrência de mofo branco, totalizando 2000 sementes. As sementes ficaram expostas a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 48 horas (tempo selecionado do ensaio descrito anteriormente. Após as

sementes foram secas em câmara climatizada a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 72 horas.

#### **2.4 Transmissão semente-plântula em ambiente controlado**

A transmissão foi avaliada em câmara climatizada. Para isso, após a secagem das sementes inoculadas, foram desinfestadas por um minuto com hipoclorito de sódio na concentração de 1% e lavadas com ADE. As sementes foram colocadas sobre papel toalha esterilizado e separada as sementes que soltaram ou não o tegumento. As que não soltaram o tegumento foram separadas e plaqueadas 600 sementes em 30 gerboxes de acrílico contendo meio de NEON-S.

As avaliações iniciaram a partir do segundo até o sexto dia. Durante este intervalo, as sementes que apresentavam início de halo amarelado e os primeiros sinais da estrutura (micélio) de Ss foram retiradas com uma pinça e imediatamente semeadas, na profundidade de 2 cm, em copos de plástico (volume 500mL) contendo solo. No sexto dia, obteve-se 68 sementes infectadas que foram divididas em quatro repetições, compostas por 17 vasos cada uma. A posição de cada semente infectada, em cada vaso, foi marcada com um palito de dente. As sementes que não apresentaram o halo amarelado, foram consideradas não infectadas e utilizada como testemunhas, e semeadas nos vasos nas mesmas condições e quantidades das sementes infectadas. Os vasos foram mantidos em câmara climatizada a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. O solo foi mantido úmido, suficiente para emergência das plântulas. Após 14 dias foi avaliado os dois tratamentos (testemunha e sementes infectadas), quantificando o

número de plântulas normais emergidas, emergidas com lesão cotiledonar e as não emergidas. As sementes não emergidas foram removidas do solo e quantificado o número de escleródios formados. Os cotilédones com lesão em ambos os tratamentos, foram coletados, desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 1%, lavados com ADE e submetidos a câmara úmida, para posterior avaliação da presença de sinais de Ss sobre as lesões.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## **2.5 Transmissão semente-plântula no campo**

Para testar a hipótese que a semente infectada introduz Ss nas lavouras, foram semeadas no campo as sementes infectadas pelo método de exposição de sementes sobre o micélio. Foram utilizadas sementes de soja da cultivar BMX Ativa infectadas, do mesmo lote usado para a avaliação da transmissão em ambiente controlado. As sementes apresentavam 11,3% de incidência de Ss.

Devido a estiagem ocorrida na região de Passo Fundo/RS, com precipitação abaixo do normal, o ensaio foi instalado, no dia 28/02/2012 (Tabela 1). Posteriormente a semeadura, a estiagem continuou predominando no local do ensaio. Foram avaliados dois tratamentos, semente infectada e sementes não infectadas. Para cada tratamento foram semeadas quatro linhas contendo 100 sementes, sendo que cada linha constituiu uma repetição. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito na concentração de 1% lavadas, selecionadas as sementes com tegumento aderido e colocadas

a profundidade de 3 cm e distanciadas 7 cm uma da outra. Todas as sementes foram identificadas com estacas de 25 mm de altura e 3,5 mm de diâmetro. Finalmente, foi realizada uma irrigação com água, totalizando 5 L/m<sup>2</sup>. A avaliação foram realizadas 15 dias após a semeadura. Foram avaliados a emergência de plântulas, a presença de lesões cotiledonares e das não emergidas foi contado o número de escleródios formados.

Os dados foram submetidos a uma análise descritiva, comprovando ou não a transmissão deste patógeno via sementes infectadas artificialmente.

Tabela 1 - Registro das variáveis ambientais durante a condução do experimento

Meses/ano	Temperatura média (C°)	Precipitação pluvial (mm)	Precipitação pluvial (mm) (média últimos 8 anos)
Abr-11	18,4	108,8	165,0
Mai-11	14,1	137,1	170,5
Jun-11	11,4	226,7	163,4
Jul-11	12,4	340,0	172,9
Ago-11	13,3	253,9	138,0
Set-11	15,4	47,3	189,7
Out-11	18,3	194,7	225,3
Nov-11	20,2	77,1	183,4
Dez-11	21,2	91,2	151,7
Jan-12	22,1	105,2	136,1
Fev-12	23,6	86,0	142,3
Mar-12	20,7	114,5	122,3
Abr-12	20,5	23,2	165,0
<b>Média/total</b>	<b>17,8</b>	<b>1805,7</b>	<b>2125,6</b>

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Inoculação artificial de sementes de soja e incidência da infecção por *Sclerotinia sclerotiorum***

O método de infecção de sementes de soja pelo contato direto da semente com micélio do fungo mostrou-se eficiente para gerar gradiente de infecção. Os tratamentos de 24, 36 e 48 horas de exposição ao micélio do fungo, foram eficientes para infectar sementes de soja com diferentes incidências (Figura 1). Estes dados foram diferentes dos obtidos por Santos (1995) e Albuquerque (2000) que não tiveram sucesso infectando sementes em contato com a colônia do fungo, desenvolvida em meios de cultura, como os meios agarizados. Tanaka & Menten (1991) e Machado et al. (2001), discutem que por este método, os fungos ficam, em sua maioria, aderidos ao tegumento das sementes, dessa maneira o processo de infecção não é assegurado, em níveis satisfatórios, mas sim apenas a contaminação superficial das sementes. Machado et al. (2001), citam que sem hidratação das sementes não ocorre a sua infecção por fungos. Além disso, outro fator limitante é o tempo de exposição das sementes à colônia do fungo, visto que as sementes podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo, dependendo da espécie avaliada.

A germinação foi reduzida com o aumento do tempo de exposição. Com 12 horas praticamente não houve redução, visto que a germinação antes da infecção era de 92%. Assim para o isolado CX,

as sementes podem ser infectadas com 24, 36 e 48 horas de exposição, dependendo da incidência desejada.

O sucesso obtido no presente trabalho, com a infecção artificial por meio do contato direto das sementes com o fungo crescido em meio BSA sem restrição hídrica, pode ser explicado pelo seguinte fato. Ao utilizar as sementes sobre colônias mais velhas (7 a 10 dias de idade) com presença de escleródios formados, resultou em infecção menos agressiva, possibilitando ainda a germinação das sementes e também, pode se explicar que a infecção foi favorecida, pois em uma placa de Petri com diâmetro de 84 mm foram colocadas 80 sementes que cobriram toda a superfície da colônia, o que pode ter aumentado a competição pela água disponível no meio, ocorrendo baixa hidratação, o que é desejado. Segundo Heydecker et al. (1975) e Bradford (1986) isso pode possibilitar a penetração do fungo a partir de 24 horas de exposição e posterior germinação das sementes para realização de pesquisas para demonstrar a transmissão de Ss e o impacto no desenvolvimento da doença em lavouras de soja.

Os tempos testados neste ensaio possibilitaram gerar diferentes incidências em sementes de soja de acordo com a idade da colônia e a quantidade de semente colocada sobre o micélio.

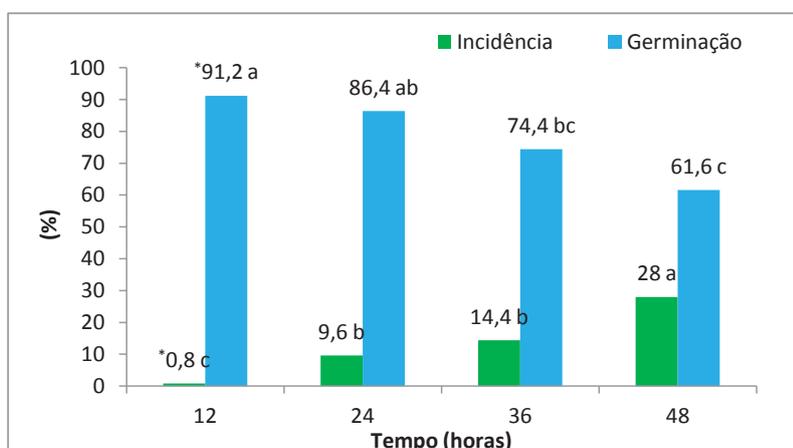


Figura 1. Infecção de sementes de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição ao micélio.

\*Letras iguais nas colunas de mesma cor, não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

### 3.2 Transmissão semente-plântula em ambiente controlado

Após a desinfestação das sementes, cerca de 32% das sementes soltaram o tegumento, 3 % apresentaram-se quebradas e 65 % sementes permaneceram com o tegumento aderido. Dessas que não soltaram o tegumento, foram plaqueadas 600 sementes que passaram pelo processo de infecção e das quais 68 apresentaram infecção por Ss, com 11,3% de incidência. Esta incidência foi inferior aos resultados do ensaio de inoculação artificial de sementes, que foi de 28% no mesmo tempo de 48 horas de exposição ao micélio de Ss, devido o aumento do número de sementes, de 80 para 90 sementes por placa de Petri e colocadas sobre as colônias com 12 dias de idade, o que diminuiu a incidência.

Das sementes infectadas emergiram 8,3% comparada com a testemunha que emergiu 95%, indicando que a semente infectada por Ss teve 86,7% dos embriões mortos ( $95 - 8,3$ ), pois não germinaram (Tabela 2). Em cada semente que não germinou houve o desenvolvimento do micélio de Ss e a formação de 2,18 escleródios/semente. Este fato verificado neste trabalho, confirma o relato de Steadman (1983), Tu (1988), Yang et al. (1998) e de Mueller (1999) que também relataram a formação de escleródios a partir de sementes infectadas que não germinaram.

Dos cotilédones com lesões nas plântulas emergidas, a partir de sementes infectadas, não se houve o desenvolvimento dos sinais do fungo quando submetidos a condições ideais (câmara úmida). Portanto, não houve formação de escleródios sobre os cotilédones com lesão e, conseqüentemente, não foi comprovada a transmissão de Ss para a parte aérea via lesão cotiledonar. Sugere-se a continuidade destes estudos a campo por mais de uma safra, simulando diferentes condições ambientais, fechamento de dossel e a possível formação de escleródios sobre os cotilédones.

Tabela 2. Efeito da infecção de sementes na emergência de plântulas de soja e formação de escleródios a partir de sementes não germinadas

<b>Tratamentos</b>	<b>Plântulas emergidas (%)</b>	<b>Plântulas não emergidas (%)</b>	<b>Número de escleródios por semente</b>
Testemunha	95 a	5 b	0 b
Semente infectada	8,3 b	91,7 a	2,18 a
<b>C.V (%)</b>	<b>12,9</b>	<b>13,79</b>	<b>13,78</b>

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A transmissão por sementes infectadas naturalmente é baixa, de acordo Hoffman et al. (1998) que detectaram de 0,3 a 0,7% em lotes de sementes de lavoura com 0 a 95 % de incidência em plantas. Henning et al. (2009), também verificaram que em 10.400 sementes de soja, incubadas pelo método papel de filtro, foram observadas apenas oito sementes infectadas por Ss. Estes valores parecem baixos, mas podem ser suficiente para introdução de Ss em novas áreas. Em sementes infectadas artificialmente, podem formar até 2,18 escleródios por semente (Tabela 2).

A formação de escleródios pode ter sido favorecida pelas condições ideais controladas em câmara climatizada, no que se refere a umidade do solo ideal para a germinação das sementes, temperatura e fotoperíodo. Se estas condições ocorrem em campo, poderá haver a formação de escleródios a partir de sementes infectadas.

Com base nos resultados de Henning et al. (2009) pode-se calcular o número de focos em um hectare de lavoura cultivada com um lote de sementes que apresenta a incidência descrita por este autor.

Considerando que a densidade de sementeira é de 280.000 sementes por ha, e que a cada 10.400 sementes, oito estão infectadas, tem-se 215 escleródios por hectare. Segundo Steadman (1983) um escleródio pode produzir 20 apotécios com capacidade individual de liberar de 2.000.000 ascósporos, em 10 dias. Portanto, a incidência determinada por Henning et al. (2009) e Hoffman et al. (1998), deve ser considerada de grande importância epidemiológica, concordando com Tu (1988), que conclui que o micélio dormente no interior das sementes não é importante somente na disseminação do fungo, mas também na epidemiologia da doença.

A partir da importância das sementes na disseminação e epidemiologia de Ss, se faz necessário propor novas pesquisas, no que se refere a amostragem de sementes em lotes de soja visando a detecção deste patógeno, evitando os resultados falsos negativos e introduzindo o patógeno em áreas indenizadas. Smith (1995) cita que o inóculo na semente é responsável pelo transporte e disseminação dos patógenos necrotróficos dos órgãos aéreos do hospedeiros, desde os centros de origem das espécies vegetais para todos os locais de cultivo no mundo. Para Reis et al. (2009) a tarefa de produção de sementes indenizadas (livre de patógenos ou saudáveis) é o maior desafio aos fitopatologistas.

### **3.3 Transmissão semente-plântula no campo**

No experimento conduzido no campo não foi detectada a transmissão de Ss, em plântulas de soja, via a formação de lesões cotiledonares. Na testemunha houve 83% de emergência e no

tratamento com sementes infectadas houve 60% de emergência. Nos cotilédones com lesão das plântulas emergidas não foi detectado sinais de Ss quando submetidos a câmara úmida no laboratório. Nas sementes que não germinaram, ou germinaram e formaram uma plântula anormal, não foi detectado escleródios de Ss. Estes fatos sugerem que trabalhos devem ser repetidos em diversas regiões do Brasil, visando a expor diferentes isolados em diferentes condições ambientais para avaliar a possibilidade de transmissão via cotilédone ou pela formação de escleródios nas sementes não germinadas. A avaliação da transmissão foi prejudicada devido a estiagem durante o período de condução do ensaio, sendo necessário realizar a irrigação para haver germinação e emergência.

A hipótese é que o fungo pode ser transmitido via lesão formada no cotilédones, e que em condições de alta umidade relativa, com solo úmido e temperatura ideal, o micélio do fungo pode colonizar estes cotilédones, caindo sobre o solo e aí formarem escleródios. Portanto novas tentativas devem ser realizadas nas próximas safras, na Universidade de Passo Fundo para comprovar esta hipótese.

A introdução de Ss em lavouras pode ser via a formação de escleródios a partir das sementes não germinadas e mortas presentes no solo, das quais desenvolve-se o micélio formando escleródios que podem germinar na mesma safra e liberar ascósporos para infecção de flores.

#### 4. CONCLUSÃO

O método de inoculação de sementes de soja, sem restrição hídrica, com a exposição das sementes por 48 h, sobre a colônia de Ss em placas de Petri, pode ser usado para obtenção de sementes de soja infectadas;

O processo de transmissão via lesões cotiledonares não foi comprovado em ambiente controlado e em condições de campo;

As sementes infectadas por Ss em câmara de crescimento, podem formar até 2,18 escleródios por semente não germinada;

Os escleródios formados, a partir de sementes infectadas e mortas pelo fungo, são consideradas fonte de inóculo primário em áreas que não tem histórico de ocorrência de Ss;

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S.; POLACH, F. J.; MOLIN, W. T. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v.65, p. 673-678, 1975.

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, Saint Paul, v.69, n. 8, p.899-903, 1979.

ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 65, p. 300-309, 1975.

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 8. p. 896-899, 1979.

ALBUQUERQUE, M. C. F. *Desempenho germinativo e testes de vigor para sementes de girassol, milho e soja, semeadas sob*

*condições de estresse ambiental*. 2000. 161 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

ALTMAN, J.; CAMPBELL, C.L. Effect of herbicides on plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v. 15, p. 361-385, 1977.

ATHOW, K.L. Fungal diseases. Soybeans: Improvement, production and uses. Madison, *American Society of Agronomy*, p. 459-489, 1973.

BARDIN, S.D.; HUANG, H.C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 23, p. 88-98, 2001.

BEDI, K.S. The age and size of sclerotia of *Sclerotinia sclerotinia* (Lib) de Bary in relation to the formation of apothecia. *Journal of the Indian Botanical Society*, v. 42, p. 204-207, 1963.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, v. 24, p. 411-451, 1986.

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

BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of Sclerotinia stem rot of bean in Ontário. *Phytopathology, Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 9, p. 218-224, 1987.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of Sclerotinia stem rot of soybean in Ontário. *Phytopathology*, v. 78, p. 1241-1245, 1988.

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 10: 101-107, 1999.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hort Science*, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, 1986.

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

BRUSTOLIN, R., REIS, E.M., PEDRON, L., DE ROSSI, R.L., DANELLI, A.D., ZOLDAN, S.M., VIANA, E., BELEDELLI, G.L., SIQUEIRA, D.D. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, no solo, a partir de sementes de soja infectadas pelo método de restrição hídrica. *Tropical Plant Pathology*, Bento Gonçalves/RS, v.36, p. 3299, 2011a. (Suplemento).

BRUSTOLIN, R; REIS, E.M; DE ROSSI, R.L; PEDRON, L; DANELLI, A.D; ZOLDAN, S.M; VIANA, E; BELEDELLI, G. L. Incidência, danos e densidade de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* em lavoura de soja no Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology*, Bento Gonçalves/RS, v.36, p. 300, 2011b. (Suplemento).

BRUSTOLIN, R.; DE ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; Mofu branco. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. (Org.). *Doenças da soja*. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 217 - 232.

BUDGE, S.P.; WHIPPS, J.M. Effect of sucrose concentration on sclerotia production and subsequent apothecial formation by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research*, v.95, p.195-198, 1991.

CARMONA, R. Problemática e manejo de bancos de sementes de invasoras em solos agrícolas. *Planta Daninha*, v.10, n.1/2, p.5-16, 1992.

CHAMBERLAIN, D.W. *Soybean diseases in Illinois*. Urbana, University of Illinois, 1973. p. 9-10 (Circular, 1085).

CHAVES, G. M. *Estudos sobre Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Experientiae*, Viçosa, v.4, n.2 1964.

CHET, I.; HENIS, Y. Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* v. 13, p. 169–192, 1975.

CLARKSON, J.P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C.S.; WHIPPS, J.M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological research.* v. 107, p. 213–222, 2003.

COE, D.M. Variations in single ascospore isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, v. 39, p. 190-195, 1944.

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review. Phytopathology*, v.9, p.65-92, 1971.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. *Estimativas de safras da produtividade brasileira da safra 2011/2012*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 de junho de 2012.

COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in western Nebraska. *Phytopathology*, v.65, p. 250 - 255, 1975.

COSTA, G.R.; COSTA, J.L da S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 36, n.2, p. 83-87, 2006.

DANDURAND, L.M.; KNUDSEN, G.R. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere of pea. *Phytopathology*, v.83, n. 3, p. 265-270, 1993.

DANN, E.K.; DIERS, B.W.; HAMMERSCHMIDT, R. Suppression of sclerotinia stem rot of soybean by lactofen herbicide treatment. *Phytopathology*, v.95, p.598-602, 1999.

DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. Compendium of lettuce diseases. St. Paul: *The American Phytopathological Society*, p. 19-20, 1997.

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

DIERS, B.W.; KOPISCH-OBUCH, F.J.; HOFFMAN, D.D.; HARTMAN, G.L.; PEDERSEN, W.L.; GRAU, C.R.; WANG, D. Registration of AxN-1-55 soybean germplasm with partial resistance to sclerotinia stem rot. *Crop Science*, v. 46, p. 1403-1404, 2006.

DILLARD, H.R.; COBB, A.C. Relationship between leaf injury and colonization of cabbage by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Protection*, v. 14, p. 677-82, 1995.

ECHANDI, E.; WALKER, J. C. Pectolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 47, p. 303-306, 1957.

FERNANDES, N.T.; SANTOS, B.A.; ZAMBOLIN, L.; CHAVES, G.M.; MIZUBUTI, E.S.G. Avaliação de meios de cultura naturais na produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 323, 1993. (Suplemento).

FERRAZ, L. C., CAFÉ FILHO, A. C., NASSER, L. B., AZEVEDO, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v.48:77-82, 1999.

GARCIA, R.A. Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja a *Sclerotinia sclerotiorum*. 2008. *Dissertação* (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

GARG, H.; SIVASITHAMPARAM K, BARBETTI, M.J. Scarification and environmental factors that enhance carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 94, p. 1041-1047, 2010.

GÖRGEN, C.A.; HIKISHIMA, M.; SILVEIRA NETO, A.N. da.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Mofa branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S. *Soja: Doenças radiculares e de hastes e inter-relações como o manejo do solo e da cultura*. 1ed. Embrapa Soja: Londrina/PR, 2010. p. 73-104.

GÖRGEN, C.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Manejo do mofa branco da soja com palhada e *Trichoderma harzianum* '1306'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, p. 1583-1590, 2009.

GRACIA-GARZA, J. A.; BOLAND, G. J.; VYN, T. J. Influence of crop rotation and reduced tillage on white mold of soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.24, p.115-121, 2002.

GRAHAN, T.; DORRANCE, S.; LANDINI, S.; GRAHAN, M. Lacotofen induces multiple defense mechanisms in soybean. In: YOUNG, C. S., HUGHES, K. J. D., Eds. Proceedings of Sclerotinia 2001 – the XI International Sclerotinia workshop, York 8<sup>th</sup>- 12<sup>th</sup> July 2001, York, England: *Central Science Laboratory*, York, England 162-163, 2001.

GRAU, C. R.; HARTMAN, G. L. Sclerotinia stem rot. In: HARTMAN G.L., SINCLAIR J.B., RUPE J.C. *Compendium of Soybean Diseases*. APS, St. Paul. Fourth Edition, p. 46-48, 1999.

HANLIN, R.T.; MENEZES, M. *Gêneros ilustrados de ascomicetos*. Recife: Imprensa da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1996. 274p.

HAO, J.J.; SUBBARAO, K.V.; DUNIWAY, J.N. Germination of the *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology*, v. 93, p. 443-450, 2003.

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

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

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. v. 37, p. 447–471, 1999.

HEYDECKER, M.; HIGGINS, J. & TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? *Seed Science & Technology*, Zürich, v.3, p.881-8, 1975.

HOFFMAN, D. D., HARTMAN, G. L., MUELLER, D.M., LEITZ, R. A., NICKELL, C. D., AND PEDERSEN, W. L. Yield and seed

quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 82, p. 826-829, 1998.

HONDA, Y.H.; YUNOKI, T. Control of *Sclerotinia* disease of greenhouse eggplant and cucumber by inhibition of development of apothecia. *Plant Disease. Repr*, v.61, p. 1036-1040, 1977.

HUANG, H.C.; KOZUB, C.G. Longevity of normal and abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 78, p. 1164 - 1166, 1994.

HUNTER, J.E.; ABAWI, G.S.; CROSIER, D.C. Effects of timing, coverage, and spray oil content on control of white mold of snap bean by benomyl. *Plant Disease*, v.62, p.633-322, 1978.

KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. *Crop Science*, v. 40, p. 55-61, 2000.

KIM, H.S.; HARTMAN, G.L.; MANANDHAR, J.B.; GRAEF, G.L.; STEADMAN, J.R.; DIERS, B.W. Reaction of soybean cultivars to sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science*, v. 40, p. 665-669, 2000.

KIM, H.S.; SNELLER, C.H.; DIERS, B.W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to sclerotinia stem rot in field environments. *Crop Science*, v. 39, p. 64-68, 1999.

KORA, C.; MCDONALD, M.R.; BOLAND, G.J. Sclerotinia rot of carrot: an example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 87, p. 456-470, 2003.

KOSASIH, B.D.; WILLETS, H.J. Ontogenetic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annals of Botany*, v. 39, p. 185-191, 1975.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, v. 69, p. 887-890, 1979.

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

LI, Y.B.; YONGLI, Z.; NIAN, L.B. Study on the dissemination distance of sunflower stem rot fungus. *Plant Protection*, v. 20, p. 12-13, 1994.

LLOYD JUNIOR, E.H. White mold of pinto beans: effects on yield and fungicidal control. *Farm Research*, Fargo, v. 32, p. 9-14, 1975.

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

MAUDE, R.B. Achievements and objectives in research on seed-borne diseases of vegetables. In: NASSER, L.C., WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. (Eds.) Proceedings; *Seed Pathology International Advanced Course*. Brasília, ABRATES, 1988. Part 4, p. 267-275.

McLEAN, D.M. Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Plant Disease*, v.42, p.663-566, 1958.

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

MORRALL, R.A.A. Preliminary study of the influence of water potential on germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, v.55, p.8-11, 1977.

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

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

MYLCHREEST, S.J.; WHEELER, B.E.J. A method for inducing apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v. 36, p. 16-20, 1987.

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*, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

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

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Novo método de produção massal de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.276, 1995. (Suplemento).

NATTI, J.J. Epidemiology and control of bean white mold. *Phytopathology*, Saint. Paul, v. 61, p. 669-674, 1971.

NELSON, B.; DUVAL, D.; WU, H. An in vitro technique for large-scale production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 78, n. 11, p. 1470-1472, 1988.

NELSON, B.D.; HELMS, T.C.; OLSON, M.A. Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 75, p. 662-665, 1991.

NELSON, K.A.; RENNER, K.A.; HAMMERSCHMIDT, R. Cultivar and herbicide selection affects soybean development and the incidence of sclerotinia stem rot. *American Society of Agronomy*, Agronomy Journal 94:1270-1281, 2002.

NEWTON, H.C.; SEQUEIRA, L. Ascospores as the primary infective propagule of *Sclerotinia sclerotiorum* in Wisconsin. *Plant Disease*, v. 56, p. 798-802, 1972.

NUNES JUNIOR, J.; PIMENTA, C.B.; NUNES SOBRINHO, J.B.; FERREIRA, L.C.; COSTA, N.B.; ANDRADE, P.M.; MEYER, M.C. Avaliação da eficácia de fungicidas no controle de mofo branco

(*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, no Estado de Goiás. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. 102-102, 2009.

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

PELTIER, A.J.; HATFIELD, R.D.; GRAU, C.R. Soybean stem lignin concentration relates to resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 93, p. 149-154, 2009.

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

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

PHILLIPS, A.J.L. Influence of fluctuating temperatures and interrupted periods of plant surface wetness on infection of bean leaves by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annals of Applied Biology*, v. 124, p. 413-27, 1994.

PINTO, N.F.J. Tratamento com fungicidas de sementes de milho. In: SOAVE, J., OLIVEIRA, M.R.M.; MENTEN, J.O.M. (ed.) Tratamento químico de sementes. Campinas: Fundação Cargil, p. 52-57, 1996.

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

PURDY, L.H. Some factors affecting penetration and infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, p. 48, p. 605 609, 1958.

REIS, E. M.; BARUFFI, D.; REMOR, L; ZANATTA, M. Decomposition of corn and soybean residues under field conditions and their role as inoculum source. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.37, n.1, p.65-67, 2011.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; SEGALIN, M.; DEUNER, E.; CARMONA, M. Estratégias para a produção de material de propagação vegetal livre de patógenos. *Informativo Abrates*, v. 19, p. 19-36, 2009.

REIS, E. M.; TOMAZINI, S. L. Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, no campo, em duas profundidades do solo. *Summa Phytopathologica*, v. 31, n. 1, p. 97-99, 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T. *Manual de identificação e controle de doenças de milho*. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.D.; CASA, R.T. Ciclo do mofo branco. *Revista Plantio Direto*, v. 122, p. 24-27, 2011a.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.D.; CASA, R.T. Manejo integrado do mofo branco. *Revista Plantio Direto*, v. 122, p. 28-30, 2011c.

REIS, E.M.; ZANATTA, M.; CAMPOS, H.D.; SILVA L.H.C.P.; MEYER, M.C.; NUNES, J.N.; PIMENTA, C.B.; CASSETARI Neto, D.; MACHADO, A.Q.; JULIATTI, F.C.; UTIAMADA, C.M. Critical-point yield model to estimate grain yield damage caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 2011b. (Suplemento).

ROUSSEAU, G.X.; RIOUX, S.; DOSTALER, D. Multivariate effects of plant canopy, soil physico-chemistry and microbiology on *Sclerotinia* stem rot of soybean in relation to crop rotation and urban compost amendment. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, p. 3325-3342, 2006.

SANSFORD, C.E.; COLEY-SMITH, J.R. Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v. 41, p. 154-156, 1992.

SANTOS, A. C. K. S. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro: Detecção, inoculação artificial e controle químico. 1995. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SCHWARTZ, H. F.; J. R. STEADMAN. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* St. Paul, v. 68, p. 383-388, 1978.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. White mold. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, MA. (ed.). *Bean production problems in the tropics*. 2. ed. Cali: CIAT, 1989. 726p.

SILVA, J.F. *Contribuição ao desenvolvimento de soja com resistência a patógenos*. (Embrapa Soja Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1). Londrina: Embrapa Soja, 2002.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A.(Eds.). Frogeye leaf spot. In: Compendium of soybean diseases. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, USA. 1924. 1989.

SINGH, R.B.; SINGH, U.P. A modified method for testing pathogenicity of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Micologia*, v. 71, n.3, p.646-648, 1979.

SINGH, U.P.; SINGH, R.B. The effect of soil texture, soil mixture, soil moisture and depth of soil on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenzucht*, v. 90, p. 662-669, 1983.

SMITH, B.D. The emergence of agriculture. *Scientific American Library*, New York, 1995.

SMITH, E.A.; BOLAND, G.J. A reliable method for the production and maintenance of germinated sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.11, p. 45-48, 1989.

SOAVE, J.; M. M. V.S.; WETZEL, E. *Patologia de Sementes*. Campinas: Fund. Cargill, 1987.

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

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

SUN, O.; YANG, X.B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, v. 84, p. 1287-1293. 2000.

SUTTON, D.C.; DEVERAL, B.J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v.32, p.281-285, 1983.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossipii* var. *cephalosporioides* e *C. gossipii*. *Summa Phytopathologica*, v.17, p. 218-226, 1991.

TOWNSEND, B.B.; WILLETTS, H.J. The development of sclerotia in certain fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. v. 37, p. 213-221, 1954.

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

TU, J.C.; BEVERSDORF, W.D. Tolerance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in Ex Rico 23, a cultivar of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, v. 62, p.65-69, 1982.

VENETTE, J. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. In: *Sclerotinia Workshop. Proceedings, 1998*. Disponível em: <<http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>> Acesso em: 15/12/2011.

VIEIRA, R. O mofo branco do feijoeiro - Feijão no inverno, *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte (EPAMIG), v. 17, n. 178, p. 54-63, 1994.

VILLAS BOAS, R. Disponível em: <<http://www.niderasementes.com.br/biblioteca/Mofo%20Branco.pdf>> . Acesso em: 18 maio 2007.

WEISS, A.; HIPPS, L.E.; BLAND, B.L.; STEADMAN, J.R. Comparison of within-canopy microclimate and white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) development in dry edible beans as influenced by canopy structure and irrigation. *Agricultural Meteorology*, v. 22, n. 1, p. 11-21, 1980.

WILLETTS, H.J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. *Mycological research*, v.96, p. 801–816, 1992.

WILLETTS, H.J.; WONG, J.A. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review*, v. 46, p. 101–165, 1980.

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

YAMASHITA, J.; NASSER, L.C.B.; ALMEIDA, A.M.R.; MACHADO, C.C.; FERREIRA, L.P. Ocorrência da fase perfeita do fungo *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib) Korf & Dumont, em lavouras de soja no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, v. 3, n.1, p. 109, 1978.

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

YANG, X. B.; LUNDEEN, P. Use of herbicide induced resistance to control soybean stem rot. In: YOUNG, C. S., HUGHES, K. J. D., Eds. Proceedings of Sclerotinia 2001 – the XI International Sclerotinia workshop, York 8<sup>th</sup>- 12<sup>th</sup> July 2001, York, England: Central Science Laboratory, York, England 170-171, 2001.

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

YORINORI, J.T. *Reação das cultivares brasileiras de soja a nova raça CS-23 de Cercospora sojina*. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Poços de Caldas, 1997, p.518.

ZAMBOLIM, L. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L . *Sementes qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV; DFP, 2005. p. 75-112.

ZAMBOLIM, L., CASA, R.T. & REIS, E.M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. *Fitopatologia Brasileira* 25:585-595. 2000.