

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ROBERTO RESENDE DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM MEIO NEON-S
MODIFICADO EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

UBERLÂNDIA
2015

ROBERTO RESENDE DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM MEIO NEON-S
MODIFICADO EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237d Santos, Roberto Resende dos, 1960-
2015 Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon-S modificado
em sementes de soja e feijão / Roberto Resende dos Santos. - 2015.
34 p.

Orientador: Fernando Cezar Juliatti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Soja - Semente - Doenças e pragas - Teses.
3. Feijão - Semente - Doenças e pragas - Teses. 4. *Sclerotinia*
sclerotiorum - Teses. I. Juliatti, Fernando Cezar, 1957- . II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III.
Título.

ROBERTO RESENDE DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM MEIO NEON-S
MODIFICADO EM SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO**

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

UBERLÂNDIA, 24 de fevereiro de 2015.

Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi/UFU – MG

Dra. Adriana de Andrade Figueiró/UFU – MG

Dra. Juliana Araújo Santos Martins/IFTM – MG

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti/ ICIAG – UFU – MG
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Aos meus pais, Luiz de Oliveira Santos (In memoriam) e Maria José Resende Oliveira, pela educação, e pelo amor incondicional durante toda a minha vida.

Aos meus filhos Alexandre e Lucas, por serem meus grandes amigos.

Aos meus irmãos Luis, Marino, Ana e José pelo carinho.

A Elisa Martins, pelo amor, companheirismo e incentivo durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por me conceder o dom da vida.

Aos meus queridos pais, Luís de Oliveira Santos (*in memoriam*) e Maria José Resende Oliveira, pela vida, dedicação, pelo apoio, amor, carinho e incentivo.

À esposa Elisa Martins pelo amor, carinho, pelas palavras de encorajamento, paciência, incentivo e pelas horas dedicadas a me ajudar.

Ao Professor Dr. Fernando Cezar Juliatti, meu orientador, por ser um grande companheiro e amigo.

À Iara de Carvalho Silva, considerada como minha segunda mãe, esteve sempre disposta a colaborar e a orientar em minhas dúvidas, propondo-me soluções que foram fundamentais para a realização deste Mestrado.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade e pelo suporte para realização do curso.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos momentos vividos e pela aprendizagem.

Aos professores Prof. Dr. Jonas Jäger Fernandes (*in memoriam*) e Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho, Prof. Dr. Geraldo Alves de Souza e Prof. Dr. João Carlos, pelas palavras de incentivo.

Aos funcionários Abadia, Eduardo, Júlio Graciliano, Marly, Maria Aparecida, Maria Auxiliadora pela ajuda e pelas orientações.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Agronomia da UFU pelos conhecimentos transmitidos.

À Carina Bernardes, ao Gabriel e à Júlia, que sempre se dispuseram a colaborar e a acompanhar o desenvolvimento desta dissertação.

À Sebastiana Resende e ao Márcio Botrel, lutando com afinco, realizamos nossos sonhos.

Aos amigos de empreitada, Aurilene, Adriana Figueró, Érika Sagata, Anakelly, Fausto Fernandes, Júlia Araújo, Maristela, Igor Forigo e Breno Juliatti, companheiros no LAMIP.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Localização geográfica dos municípios fornecedores de amostras	11
Figura 2. Porcentagem de lotes com presença de <i>Sclerotinia sclerotinum</i> nos métodos utilizados no período de 2008 a 2012	20
Tabela 1. Total de amostras de soja e feijoeiro.....	12
Tabela 2. Técnica Rolo de Papel	15
Tabela 3 Técnica Rolo de Papel: Detecção do patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por cultivares em laudos de sementes de feijoeiro do LAMIP	16
Tabela 4. Técnica Neon-S 2: Detecção do patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por cultivares em laudos de soja do LAMIP	17
Tabela 5. Técnica Neon-S 2: Detecção do patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por cultivares em laudos de sementes de feijoeiro do LAMIP	19
Tabela 6. Variância em relação aos métodos de detecção <i>S. sclerotiorum</i> em lotes/amostras de sementes de feijoeiro e soja inoculadas naturalmente e artificialmente	21
Tabela 7. Porcentagem de detecção <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em diferentes lotes de feijoeiro e soja infectados naturalmente e artificialmente	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Descrição do Problema	03
2.1.1 A Cultura da Soja	03
2.1.2 A Cultura do Feijoeiro	04
2.2 A Doença do Mofo Branco	06
2.2.1 Características da <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	06
2.2.2 Sintomatologia	07
2.3 Métodos de Detecção de Patógenos em Sementes	08
2.3.1 Rolo de Papel	08
2.3.2 Neon – S	08
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Método NEON – S 2	12
3.2 Rolo de Papel	13
3.3 Método Neon – S	13
3.4 Análises Estatísticas	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Análise Estatística	21
5. CONCLUSÃO	23
6. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

SANTOS, Roberto R. Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em Meio Neon-S Modificado em Sementes de Soja e Feijão. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹, 2014. 26p.

O método de Neon-S tem sido utilizado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e feijão a partir da safra de 2010. Porém, esse método possibilita a leitura de falsos positivos devido ao aparecimento de fungos que também alteram o pH do meio. O objetivo deste trabalho foi verificar se o aumento do período de incubação pode contribuir para otimizar a confiabilidade do teste Neon-S em diferentes cultivares de soja e feijão. Foram avaliados nove tratamentos em delineamento de blocos casualizados no esquema fatorial 3x3, com três repetições, sendo três métodos de detecção: rolo de papel, Neon-S e Neon S2 e três cultivares: Feijão Pérola infectados naturalmente; soja cultivar BRS Valiosa RR infectadas naturalmente e soja cultivar Nidera 7255 RR inoculada artificialmente. Para a inoculação da soja Nidera 7255 RR, as sementes foram incubadas em meio de cultivo BDA por 72 h, após o cultivo do fungo por sete dias na temperatura de 25 °C. Os três métodos foram comparados, avaliando 400 sementes por repetição, meio Neon-S com incubação de sete dias, Neon-S2 com incubação de quinze dias e o rolo de papel por trinta dias, anotando-se a presença do fungo e a presença de escleródios aderidos às sementes. No meio Neon-S e Neon-S2 foram utilizadas 20 sementes por placa (20 placas por repetição). No rolo de papel foram usadas 50 sementes por rolo. As sementes foram incubadas 20 °C em BOD, no escuro. Realizou-se a análise de variância dos dados e teste de comparação de médias (Tukey 5%). A interação entre o método de detecção e a cultivar utilizada foi significativo a 1% de probabilidade, indicando que o melhor método depende da cultivar avaliada. Dentro das cultivares avaliadas, a soja infectada artificialmente foi a que apresentou os maiores índices de infecção pelo patógeno. Usando os resultados de lotes de sementes, comprovou-se a maior sensibilidade do Neon-S num montante de 637 lotes testados no período de 2008 a 2012. Durante esse período, o teste de rolo apresentou 21,88% de amostras positivas, enquanto que o Neon-S foi de 31,25%. Outro fator diferenciador em relação aos lotes analisados foi a porcentagem de sementes contaminadas e ou infectadas, que variou de uma (0,25%) a cinco (1,25%). Assim a detecção de *S. sclerotiorum* pelo método Neon-S2 pode ser otimizada com a incubação por 15 dias, considerando que, neste caso, a formação de escleródios próximos às sementes infectadas confirma a presença do patógeno e evita a leitura de falsos positivos. O método Neon-S2 aumentou a sensibilidade de detecção de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes analisadas quando comparado ao método de rolo, porém, quando comparado com o método Neon S, sua média foi maior, mas a diferença não foi significativa.

Palavras-chave:

Glycine max, *Phaseolus vulgaris*. Sanidade de sementes. Mofo branco. Rolo de papel.

¹Orientador: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti – UFU

ABSTRACT

SANTOS, Roberto R. **Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in Modified NEON-S Medium in Soybean and Common Beans Seeds.** Dissertation (Masters Degree in Agriculture/Plant Pathology) – University Federal de Uberlândia, Uberlândia¹, 2014. 26f.

The Neon-S method has been used for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and common beans since the agricultural year 2010. However, this method yields false positive readings due to other fungi that change medium pH. Thus, this study evaluated the contribution of increasing incubation period on the optimization of Neon-S reliability in different cultivars of soybeans and common beans. Nine treatments were evaluated in randomized blocks design, as a 3x3 factorial, with three replications. The factors were three detection methods (paper roll, Neon-S, and Neon S2) and three cultivars: naturally infected Pérola beans; naturally infected soybean cultivar BRS Valiosa RR, and artificially inoculated soybean cultivar Nidera 7255 RR). Inoculation of soybean Nidera 7255 RR was done by incubating the seeds for 72 h on PDA where the fungus was previously grown for seven days at 25 °C. The three methods were compared, evaluating 400 seeds per replication, after incubation for seven days in Neon-S, for 15 days in Neon-S2, and for 30 days in paper roll, determining the presence of the fungus, and that of sclerotia adhered to the seeds. Twenty seeds were used per plate for media Neon-S and Neon-S2 (20 plates per replication), and 50 seeds per roll for the paper roll. Seeds were incubated at 20 °C in BDO chamber in darkness. The data were submitted to the analysis of variance and the averages compared by the Tukey test at 5% probability. The interaction between detection method and cultivar was significant at 1% probability, indicating that the best method depends on the cultivar under study. Among the cultivars evaluated, artificially infected soybean presented the greatest indices of pathogen infection. A comparison of seed lots analyzed at the Plant Disease Clinic–LAMIP – proved greater sensibility of Neon-S in a total of 637 lots evaluated from 2008 to 2012. In that period, the paper roll test resulted in 21.88% positive samples, while in Neon-S 31.25% of them were positive. Another distinguishing factor among the lots analyzed was the percentage of infected and, or, contaminated seeds, which varied from one (0.25%) to five (1.25%). Therefore, detection of *S. sclerotiorum* by the Neon-S2 method can be optimized by incubation for 15 days, considering that, in this case, the formation of sclerotia near the infected seeds confirm the presence of the pathogen, avoiding false positive readings. Neon-S2 method increased detection sensibility of *S. sclerotiorum* in seed lots analyzed in comparison with the paper roll method; however, in comparison with Neon S method, despite its greater average, no significant differences were observed.

Keywords:

Glycine max, *Phaseolus vulgaris*. Seed health. White mold. Paper roll.

¹Supervisor: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti – UFU

1. INTRODUÇÃO

A semente é considerada o mais importante insumo agrícola, pois serve como multiplicador de plantas e a conseguinte comercialização da produção de grãos para consumo humano e animal. A qualidade das sementes é essencial para garantir um melhor padrão fisiológico e sanitário à lavoura, sendo um desafio para produção agrícola, pois é a causa principal da disseminação de doenças. A conquista de novos mercados implica em comercializar sementes de melhor qualidade sanitária e menor utilização de defensivos, portanto, com ganhos ambientais e econômicos.

A doença conhecida como mofo branco, agente causal, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, tem ocasionado perdas significativas em inúmeras culturas agrícolas de importância econômica no mundo. No Brasil, a sua detecção ocorreu, primeiramente, no ano de 1921 na cultura da batata. Os danos da doença variam de acordo com os níveis de susceptibilidade das culturas, com as condições climáticas e com o manejo empregado. A *S. sclerotiorum* ataca mais de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas; tendo sido relatado no Brasil o ataque às culturas do feijão, soja, girassol, algodão, canola, batata, tomate, alface, entre outras. Especialmente nessas culturas, a doença tem ocasionado perdas crescentes nas principais regiões produtoras do País (Sul, Sudeste e Centro-Oeste), que figuram como áreas das maiores produções agrícolas (JULIATTI; JULIATTI, 2010).

"Não existem variedades de plantas imunes ao patógeno e o controle químico da doença é realizado muitas vezes, sem o rigor técnico necessário, levando perdas ao agricultor e redução nos padrões de controle, dentro dos limites aceitáveis." (JULIATTI; JULIATTI, 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2011).

O uso de sementes de baixa qualidade auxilia a entender como o mofo branco é transmitido e como tem causado grandes perdas, pois estas podem estar infectadas com o micélio dormente do patógeno ou contaminadas concomitantemente com escleródios. O potencial de disseminação do patógeno a longa distância através das sementes é significativo.

De acordo com a Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o nível

de tolerância do fungo em lotes de sementes está baseado na ausência de escleródios associados às sementes (IBGE, 2013).

Os escleródios podem ser detectados em lotes de sementes, porém, sementes infectadas com o micélio dificilmente são detectadas sem a ajuda de um laboratório especializado. A fungigação via pivô central é uma prática que tem crescido muito nos últimos anos. Entretanto, a aplicação de uma quantidade excessiva de fungicidas para o controle de doenças gera riscos desnecessários, tanto no aspecto epidemiológico das próprias doenças como em relação ao meio ambiente. Assim, a detecção de patógeno em sementes é de grande importância, pois sementes com alta qualidade fitossanitária contribuem para um menor consumo de produtos químicos durante o ciclo das culturas e evita a introdução e/ou aumento de doença nas lavouras. Muitas vezes, a disseminação do mofo branco em uma lavoura é ocasionada pela própria semente infectada, uma vez que a semente pode apresentar o fungo, tanto interna como externamente. Além de transportar externamente outros fungos, que podem diminuir o vigor e a germinação das sementes. Tais patógenos tanto influenciam na emergência e vigor da planta como são uma fonte de inóculo primário, que podem gerar epidemias graves, se as condições climáticas forem favoráveis (VIEIRA et al., 2001).

Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes de modo geral seguem as mesmas regras adotadas pela *International Seed Testing Association* (ISTA) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzirem estruturas, ou metabólitos, que permitam a sua identificação. Para o fungo *S. sclerotiorum* a observação visual da presença de escleródios é feita pelas Regras de Análise de Sementes, onde se usa o teste de papel de filtro (*blotter test*) para culturas como: soja, girassol, algodão, feijão e ervilha (RAS, 2009).

Apesar das técnicas recomendadas diversos trabalhos têm sido desenvolvidos e/ou ajustados a fim de minimizar alguns problemas nos testes já estabelecidos como padrão. Como por exemplo, a redução do tempo de avaliação de amostras incubadas, custos das análises e diminuição de riscos aos operadores na manipulação dos produtos químicos como o 2,4D, no preparo de amostras. Métodos como o rolo de papel modificado, método Neon modificado e uso de técnicas moleculares têm se mostrado promissoras para o diagnóstico mais seguro e rápido do patógeno (BARROCAS, 2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição do Problema

2.1.1 A cultura da Soja

A produtividade de uma cultura é definida pela interação entre a planta, o ambiente de produção e o manejo de pragas e doenças. Altos rendimentos de soja só são obtidos quando as condições ambientais são favoráveis em todos os estádios de crescimento das plantas, adubação correta, boa origem da semente aliada à qualidade fisiológica (germinação e vigor), qualidade sanitária e controle fitossanitário bem planejado e executado. O potencial de rendimento da soja é de 100 sacos ha⁻¹. Porém para obter altos rendimentos é necessária a utilização de boas práticas de manejo. As principais práticas de manejo que devem ser consideradas são: semeadura na época recomendada para a região da produção; escolha dos cultivares mais adaptados à região; uso de espaçamentos e densidades adequados as cultivares; monitoramento e controle de plantas daninhas, pragas, doenças e redução das possíveis perdas de colheita (CRUZ, 2008).

A área plantada com a oleaginosa na safra 2012/13 apresentou um incremento de 10,7% em comparação com o verificado na safra 2011/12, alcançado 27,7 milhões de hectares. Em todos os estados da Federação o comportamento foi semelhante, com exceção do Distrito Federal que permaneceu com 55,0 mil hectares. Esse aumento está relacionado ao elevado nível das cotações da soja no mercado interno e externo e ao bom desempenho com relação à comercialização realizada de forma antecipada, atingindo níveis recordes (CONAB, 2013).

Na safra 2012/13 o atraso provocado pelo clima no início do plantio na Região Centro-Oeste, principalmente no Mato Grosso e Goiás e a ocorrência de chuvas coincidindo com a colheita, repercutiram nos níveis de produtividade da lavoura. O excesso de chuvas provocou perdas no enchimento de grão pela baixa luminosidade e na colheita, pela alta incidência de ferrugem asiática. Apesar disso, o desempenho nesta safra indica um comportamento de produtividade bem próximo da safra passada, graças ao bom desempenho observado no estado do Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. (CONAB, 2013).

Neste contexto, a Região Centro-Sul produziu 73,4 milhões de toneladas, um incremento de 26,2%. Esse aumento advém tanto do aumento de área (9,9%), quanto de

produtividade (14,8%). Vale destacar a repercussão do desempenho favorável do clima na produtividade em dois dos principais estados produtores da oleaginosa, Paraná e no Rio Grande do Sul, que apresentaram neste incremento de 36 e 74,5% respectivamente. Para Teles (2012):

Grande número de doenças fúngicas e bacterianas, além de viroses e nematóides, ataca a cultura da soja. Dentre estas, aquelas causadas por fungos são consideradas muito importantes, não somente por aparecerem em maior número, como pelos prejuízos causados em termos de rendimento e qualidade das sementes (TELES, 2012).

Inúmeros fungos já foram identificados em sementes de soja, porém são poucos os que merecem destaque por serem economicamente importantes, conforme relação a seguir: *Phomopsis spp.* (anamorfo de *Diaporthe spp.*) Saccardo & Roumeguère. *Colletotrichum truncatum*, (Schwein.) Andrus & W.D. Moore. *Fusarium spp.* Link (principalmente *F. semitectum*), *Berk. & Ravenel*. *Sclerotinia sclerotiorum* De Bary, *Cercospora kikuchii*, Hara. *Cercospora sojina* Hara. *Aspergillus spp.* (principalmente *A. flavus*), (Haller) P. Micheli. *Penicillium spp.*, Link, Magazin. *Alternaria spp.*, Nees. *Chaetomium sp.*, Kunze. *Cladosporium sp.*, Link. *Corynespora cassiicola*, (Berkeley & M.A. Curtis) C.T. Wei. *Curvularia sp.*, Boedijn. *Epicoccum sp.*, Link. *Macrophomina phaseolina*, (Tassi) Goidàñich. *Monilia sp.*, Bonorden. *Periconia sp.*, Tode. *Peronospora manshurica* (crosta de oosporos) (Naumov) Syd. *Rhizoctonia solani*, J.G. Kühn. *Rhizopus stolonifer*, (Ehrenb.) Vuillemin. *Septoria glycines*, Hemmi. *Sclerotiorum rolfsii*, Saccardo. *Stemphylium sp.* Wallroth. *Trichoderma sp.*

2.1.2 A Cultura do Feijoeiro

O feijoeiro é considerado a principal fonte de proteína na dieta alimentar da população de baixa renda, constituindo juntamente com o arroz, a base da alimentação da população brasileira. Dentre as culturas de inverno irrigadas por aspersão é a principal nas regiões sudeste, centro-oeste e algumas áreas da região nordeste. O cultivo na entressafra de verão, denominado feijão “de inverno”, cuja semeadura ocorre de maio a junho é mais tecnificado que os demais, utilizando, além da irrigação outros insumos devem ser, sementes de boa qualidade, fertilizantes, corretivos e defensivos o que possibilitam a obtenção de produções três a cinco vezes superiores às obtidas em outras épocas de plantio (BASSAN et al., 2001).

As regiões ideais para cultivo de feijoeiro devem possuir temperatura média, durante o ciclo, entre 20 e 22 °C, sendo temperatura ótima de 21°C. Temperatura média acima de 24 °C durante o florescimento e formação de legumes determinam efeitos negativos no rendimento de grãos. Assim, a temperatura média durante o mês mais quente do ciclo da cultura não deve ser superior a 24°C. Temperatura elevada no florescimento aliada à deficiência hídrica, causa redução do rendimento de grãos e aumento de variabilidade, sendo o efeito dependente da duração do aumento da temperatura. O enchimento de grãos também é prejudicado, já que a elevada temperatura, aumentando a respiração e reduzindo a fotossíntese líquida. O crescimento do feijoeiro é limitado também pela última geada da primavera e pela primeira geada do outono, que delimitam a estação de crescimento disponível (MALUF et al., 2001).

A área de feijoeiro cultivada está estimada em 1,12 milhão de hectares, para a safra 2012-2013, configurando um decréscimo de 9,5% em relação à safra passada. Todos estados produtores indicam plantios de áreas menores do que às cultivadas na safra anterior, com exceção de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Maranhão e Distrito Federal. As boas perspectivas de outras culturas como soja e milho que têm maior estabilidade e liquidez, a comercialização instável e os riscos climáticos aliados à cultura do feijoeiro têm inibido os produtores a manterem um crescimento estável para esta cultura (CONAB, 2013). A produção nacional para o feijão da safra foi estimada em 957,1 mil toneladas, representando uma redução de 22,5% (CONAB, 2013).

A exploração comercial do feijão cerca de 95% dos casos usualmente apresenta um elevado nível de problemas sanitários após o florescimento das plantas. Perdas de 7% a 10% do rendimento final de sementes e grãos são devidas ao amassamento e à queda de flores e de vagens pela ação mecânica de máquinas e implementos agrícolas empregados na aplicação de fungicidas (VIEIRA- JUNIOR et al., 1998).

A maior parte das culturas destinadas à produção de alimentos está sujeita à incidência de pragas e doenças, e a má qualidade das sementes representa uma das principais causas da baixa produtividade das lavouras de feijoeiro no Brasil. Por esse motivo, é crescente o interesse pelo tratamento químico das sementes, no qual se objetiva conferir-lhes proteção e às plântulas delas originadas, contra a ação de patógenos e insetos-pragas. Assim, proporciona-se a manutenção da qualidade sanitária e fisiológica da semente, contribuindo para a obtenção do estande inicial almejado; além disso, reduz-se drasticamente a disseminação desses organismos nocivos na área (BARROS et al., 2005).

2.2 A Doença Mofo Branco

2.2.1 Características da *Sclerotinia sclerotiorum*

O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causador da doença Mofo Branco que também é conhecida como: podridão branca da haste, a *Sclerotinia*, murcha de *Sclerotinia* e podridão da haste. *S. sclerotiorum* pode causar danos em mais de 400 espécies plantas dentre elas destacam-se várias plantas de interesse econômico, a soja e o feijoeiro (WEBER, 2012).

A ocorrência de epidemias causadas por *sclerotiorum* na cultura de soja, em regiões onde ocorrem condições climáticas amenas na safra de verão, principalmente nas chapadas dos cerrados em áreas acima de 800 m de altitude, tem deixado em alerta os produtores.

Este fitopatógeno pode sobreviver no solo de 3 a 10 anos, através de estruturas de resistência conhecidas como esclerócio ou escleródio. Estas estruturas apresentam formato irregular, variando de poucos milímetros de diâmetro e comprimento a alguns centímetros, a princípio apresentam coloração branca, e posteriormente tornam-se negros e duros. Os escleródios são formados por uma massa compacta e melanizada de micélio e, após a germinação são geralmente os responsáveis pela infecção iniciar da planta (SAGATA, 2010).

"O uso de sementes infectadas com micélio e/ou infestadas com escleródios são as principais causas da introdução *S. sclerotiorum* nas lavouras. Os escleródios podem germinar miceliogenicamente, carpogenicamente, produzindo apotécios que liberam ascósporos." (VIEIRA et al., 2001)

O patógeno pode ser disseminado pela semente aderido à sua superfície; infectando o seu interior; e/ou contaminando os lotes de sementes com restos de plantas infectadas ou partículas de solo contaminadas, ou ainda com as estruturas de resistência para aqueles patógenos que formam escleródios, como a *Sclerotinia sclerotiorum* (JULIATTI; JULIATTI, 2010).

A disseminação do fungo ocorre de duas formas: pela associação do escleródio com as sementes, restos vegetais contaminados na fase miceliogênica do fungo infectando internamente o embrião da semente respondendo pela contaminação a longa distância, e além disso se dissemina pelos apotécios que emergem ou brotam dos escleródios do solo, liberando aproximadamente mais de dois milhões de ascósporos

por dez a quinze dias, contudo na fase carpogênica a contaminação ocorre a curtas distâncias. A contaminação também pode ocorrer com o trânsito das máquinas agrícolas que saem das áreas contaminadas para sadias dentro das lavouras, movimentando o solo e restos vegetais contaminados (JULIATTI; JULIATTI, 2010).

A transmissão por semente pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) quanto por escleródios misturados às sementes. O fungo, devido à formação de estruturas de resistência (escleródios), é de difícil erradicação após introduzido numa área. No teste de sanidade de sementes usualmente realizado (papel de filtro/23°C/7 dias), dificilmente o fungo é detectado. Para a obtenção de melhores resultados, deve-se utilizar temperaturas entre 10-15°C e 28 dias de incubação. A identificação é feita com base na presença de micélio branco típico e formação de escleródios (GOULART, 1997).

O controle de mofo branco causado por *S. sclerotiorum* é muito difícil, devido à capacidade que o fungo tem de formar, os escleródios, que podem permanecer no solo por mais de cinco anos. O controle da doença é baseado no manejo cultural, de forma a reduzir o potencial de inóculo, uma vez que, por se tratar de um patógeno de solo, o uso de fungicidas químicos, além de dispendioso, não apresenta resultados satisfatórios (HECKLER et al., 2009).

O controle de qualidade de sementes vem sendo reconhecida, de forma crescente. Além dos aspectos de transmissão e suas consequências epidemiológicas, a presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento (TELES, 2012).

No controle de qualidade de sementes, a importância do aspecto sanitário vem sendo reconhecida de forma crescente. Considerando os expressivos avanços da área de patologia de semente, vem crescendo também a necessidade de implantação e credenciamento de laboratórios, para a realização de análises sanitárias (GOULART, 1997).

2.2.2 Sintomatologia

As doenças conhecidas como mofo branco ou podridão branca recebem esses nomes em função dos sintomas e sinais externos causados na planta: presença de lesões

encharcadas nos órgãos afetados, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco, de aspecto cotonoso, cobrindo porções dos tecidos. (CAMPOS LEITE, 2003).

Os primeiros sintomas são manchas de anasarca que evoluem para coloração castanho-claro e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. Em poucos dias, o micélio transforma-se em massa negra, rígida, o escleródio, que é a forma de resistência do fungo. Os escleródios variam em tamanho de poucos milímetros a alguns centímetros e são formados tanto na superfície como no interior da haste e das vagens infectadas (SAGATA, 2010).

2.3 Métodos de Detecção de Patógenos em Sementes

2.3.1 Rolo de Papel

A desvantagem desse método é a dificuldade para separar as sementes infectadas das sadias, podendo-se superestimar a incidência do patógeno *S. sclerotiorum* devido ao contato entre as sementes ao se realizar o rolo de papel para posterior incubação.

2.3.2 Neon – S

O método do Meio Neon foi descrito originalmente por Steadman et al. (1994) e Nasser et al. (1995) para detecção da viabilidade de escleródios do fungo *S. sclerotiorum*. Posteriormente, foi utilizado para detecção do patógeno em sementes de feijoeiro. O método consistia na utilização de meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com azul de bromofenol, um indicador de pH, obtendo um meio de coloração azul e que devido a liberação de ácido oxálico pelo fungo torna-se amarelo.

O método do Meio Neon foi modificado por Napoleão et al. (2006) e denominado Neon-S, pois era necessário o aperfeiçoamento para análise de rotina. Assim, foram testados indicadores, inibidores e antibióticos com ponto de fusão alto, não necessitando acrescentá-los após o meio BDA autoclavado. Ademais se faz necessário o ajuste do pH após o meio esterilizado, prática de difícil execução devido à alta temperatura do meio liquefeito e a rapidez do meio em solidificar-se.

O método do Meio Neon-S possui em sua composição, juntamente com o meio de cultura BDA, um antibiótico (cloranfenicol), o ácido diclorofenoxyacético (2,4-D) e o indicador de pH azul de bromofenol. O antibiótico inibe o crescimento de bactérias e o ácido 2,4-D inibe a germinação de sementes das dicotiledôneas. Sem a presença do

fungo, o meio mantém-se azul e, com a presença do micro-organismo, torna-se amarelo. Porém, alguns fungos como *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp produzem ácidos que mudam também a coloração do meio; assim, para a distinção destes fungos torna-se necessário o emprego de microscópico estereoscópico (NAPOLEÃO et al., 2006).

"Em alguns trabalhos foram utilizados meios de cultura semi seletivos, contendo o indicador de pH azul de bromofenol visando reduzir o tempo de detecção do patógeno." (NAPOLEÃO, 2006).

A simples indicação das percentagens de pureza e de germinação de um lote de sementes não é suficiente para caracterizar o seu verdadeiro estado fisiológico, pois, nesses testes, além da pureza física, apenas é avaliada a capacidade que a semente possui para formar plântulas normais sob condições ótimas à germinação. Na tentativa de melhor identificar os lotes de sementes de alta qualidade fisiológica, a concepção de vigor vem recebendo grande atenção como mais um parâmetro utilizado para indicar o futuro desempenho dessas sementes no campo. Experiências têm demonstrado que a consideração apenas desses atributos para se atestar a qualidade de sementes tem sido insuficiente, principalmente na atual política agrícola brasileira, onde se exige uma agricultura mais econômica e rentável, assumindo a semente papel decisivo na diminuição de riscos. Nesse contexto, a sanidade de sementes apresenta-se com significativa importância, uma vez que determinados microrganismos, associados a elas, podem constituir-se em fator altamente negativo no estabelecimento inicial de uma lavoura (GOULART, 1997).

Dessa forma, torna-se evidente que para se atestar a verdadeira qualidade de um lote de sementes, deve-se obrigatoriamente considerar o somatório dos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas – LAMIP da Universidade Federal de Uberlândia, no período de 2008 a 2013.

Foram avaliadas 637 amostras/lotes de sementes de soja e de feijão, provenientes do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (Figura 1, Tabela 1). Os laudos foram separados por ano e arquivados de forma digital, foram feitas anotações a respeito dos patógenos. As amostras foram recebidas em sacos de aproximadamente 1kg. Estas passaram por testes de sanidade, capazes de identificar o fungo *S. sclerotiorum*.

Para comparar a eficiência entre os métodos Neon S, Neon S2 e rolo de papel foi realizado um experimento entre os meses de maio e junho de 2013. Foram avaliados nove tratamentos, utilizando o delineamento em blocos casualizados no esquema fatorial 3x3 com três repetições. Dentre os tratamentos foram utilizadas as cultivares: feijão pérola infectadas naturalmente, soja cultivar BRS Valiosa RR infectadas naturalmente e soja cultivar Nidera 7255 RR inoculada artificialmente, sendo avaliadas dentro dos três métodos de detecção. As amostras dessas cultivares são provenientes das plantações de agricultores da região de Uberlândia, que foram armazenadas em câmara fria até a realização dos testes. A cultivar Nidera 7255 RR teve as suas sementes expostas à infecção em placas de petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) e micélio do patógeno, após o cultivo do fungo por sete dias na temperatura de 25° C. A exposição das sementes ao patógeno ocorreu por 72 horas de incubação, utilizando quatro placas de petri com 100 sementes cada. As 400 sementes inoculadas foram utilizadas para o teste de validação, comparando com os lotes infectados naturalmente. Os métodos de detecção estão detalhados a seguir.

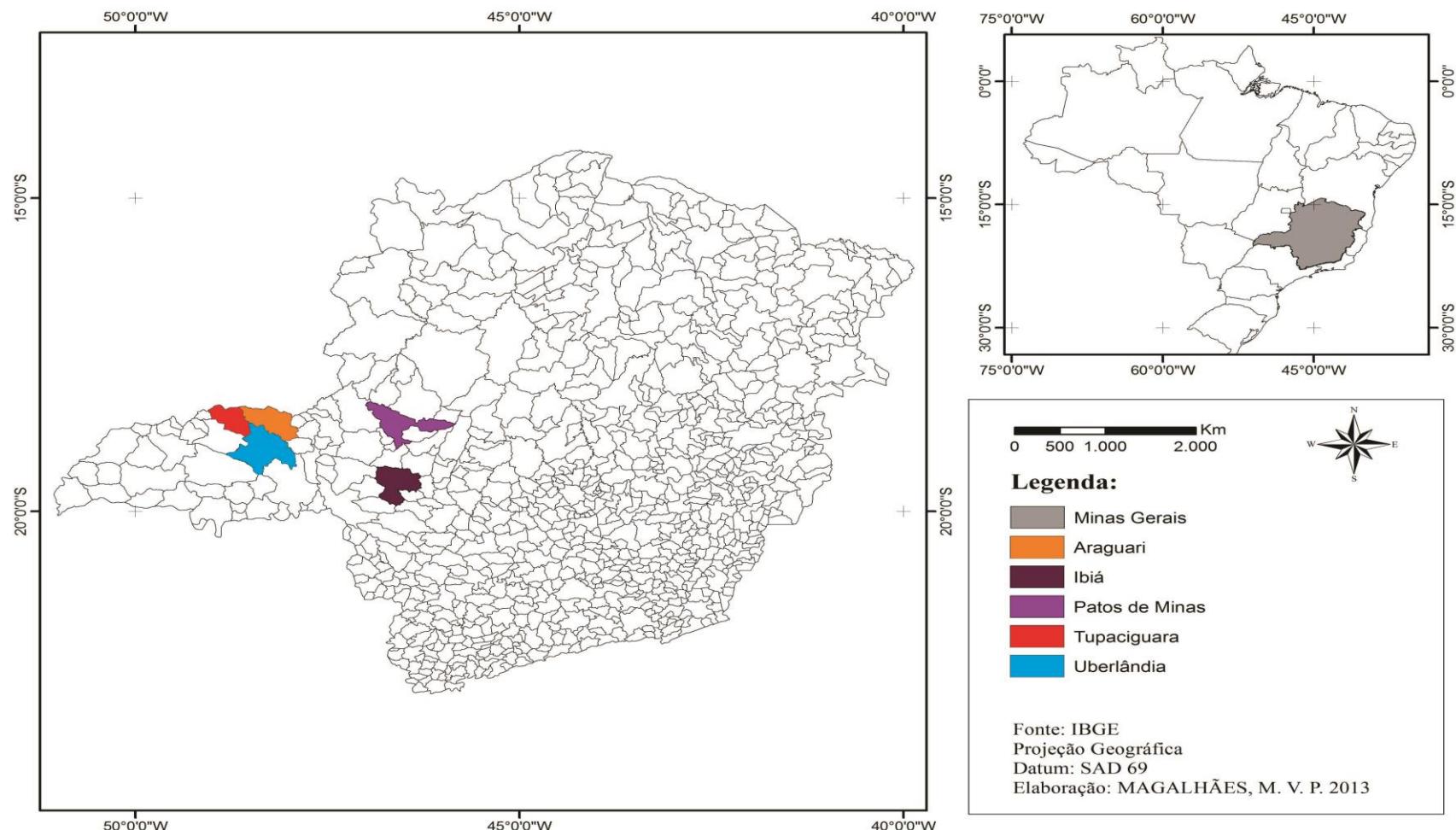


FIGURA 1. Localização geográfica dos municípios fornecedores de amostras.

TABELA 1. Total de amostras de soja e feijoeiro analisadas no LAMIP – UFU, 2008 a 2013.

Município	Número de Amostras	
	Feijoeiro	Soja
Araguari	-	06
Ibiá	15	-
Patos de Minas	-	395
Uberlândia	-	194
Tupaciguara	-	42
Total	637	

3.1 Método Neon-S 2

O método Neon-S2 é uma modificação do Neon-S, nele o tempo de leitura é alterado de sete dias para quinze dias. Essa modificação propiciou uma melhor confiabilidade dos resultados.

Para a análise das amostras, primeiramente, houve um congelamento prévio das sementes por 12 horas, optou-se por esse método devido às limitações ambientais e preocupações com a saúde do manipulador, usando o 2,4D. Foram utilizados os seguintes reagentes: 1000 ml de BDA (200g batata – 1000 ml de água destilada, 20g de dextrose e 15 g de Agar bacteriológico) 50 mg de azul de bromofenol, autoclavado a 120 °C por 15 min, após o resfriamento de aproximadamente 50 °C acrescentou-se 50 mg de cloranfenicol, o meio foi vertido em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Foram utilizadas 400 sementes por repetição de cada cultivar, sendo distribuídas de forma aleatórias vinte sementes em cada placa, utilizando vinte placas de Petri por repetição. As amostras permaneceram durante quinze dias em incubadora BOD com ausência de luz a 20 °C. Para a detecção do fungo, foi observada a formação de halo amarelo em torno da semente, devido à presença de ácido oxálico que altera a coloração do azul de bromofenol para a cor amarela, além da formação de escleródios, quando se prolonga o tempo de incubação. A nova forma de interpretação permite que sejam eliminados os resultados falsos positivos.

3.2 Rolo de Papel

O método utiliza o rolo de papel de germinação Germitest (duas folhas de papel), adicionando a água destilada esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. As amostras foram incubadas em estufa BOD com ausência de luz a 20°C por trinta dias.

Para a detecção do fungo, observou-se também a formação de escleródios nas sementes. Para cada repetição foram utilizadas 400 sementes, distribuídas de forma aleatórias em cinco rolos de papel contendo 50 sementes cada. O tempo de incubação por trinta dias para realizar a leitura transforma-se no fator limitante dessa técnica.

3.3 Método Neon-S

O procedimento deste método foi o mesmo descrito no Neon-S 2, porém, o tempo de leitura foi de sete dias após a incubação.

3.4 Análises Estatísticas

A estatística do teste de Tukey é dada pela seguinte fórmula:

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QMRes}{r}}$$

em que:

q é a amplitude total studentizada tabelada. QMRes é o quadrado médio do resíduo, e r é o numero de repetições.

Após a leitura do teste comparativo entre lotes de sementes de feijoeiro e soja infectados naturalmente e artificialmente realizou-se a análise de variância dos dados e teste de comparação de médias (Tukey 5%) utizando o software SASM – Agri desenvolvido por Canteri et all 2001. Os dados das três épocas de avaliação (sete, 15 e 30 dias) foram transformados para arcseno $\sqrt{x/100}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2008, ao utilizar a técnica do rolo de papel não foi constatada a presença de Mofo Branco nas sementes de soja, assim todos os lotes/cultivares apresentaram isenção do patógeno (Tabela 2). Contudo, nos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012 a presença do fungo foi detectada (Tabelas 2 e 4) em sementes de soja. A partir do ano de 2010, e nos anos de 2011 e 2012 em plantas de feijão ao usar a técnica de Neon-S modificado e Neon S2, houve um aumento de amostras com presença positiva do patógeno (Figuras 2). Durante o período citado, o teste de rolo apresentou 21,88% de amostras positivas, enquanto que o Neon-S2 foi de 31,25% (Figura 2). Outro fator diferenciador em relação aos lotes analisados foi a porcentagem de sementes contaminadas e/ou infectadas de cada lote, que variou de 0,25% a 1,25% (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Grabicoski (2012), com o objetivo de comparar métodos detecção de *S. sclerotiorum* analisou três amostras de sementes de soja provenientes de áreas com histórico da incidência de Mofo Branco no Paraná, através de Blotter Test, Rolo de Papel e Neon-S. Na amostra I, foram detectadas dez sementes infectadas no método de Rolo de Papel. Nos demais métodos, não foi detectada a presença do patógeno. Na amostra II, observou-se apenas uma (01) semente com o patógeno pelo teste de Blotter Test e Rolo de Papel e três pelo método Neon – S. Enquanto que na amostra III, houve uma quantidade maior de sementes infectadas. Foi encontrado 45 sementes com o fungo pelo método Blotter Test, 112 no método Rolo de Papel, e 15 no método Neon –S. Percebe-se que no método Rolo de Papel constatou-se a presença do patógeno em todas as amostras/lotes.

TABELA 2. Técnica Rolo de Papel: Detecção do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* por cultivares de soja em laudos do LAMIP – UFU, 2008 e 2009.

Cultivar	Total	de	Lotes	Número de Lotes	Incidência	(%)	sementes	Equivalente	em	Número
	Testados			Positivos			2008	Sementes	2009	
	2008	2009			2008	2009				
BR 850 RR	-	6,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
BRS 750	4,00	11,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
BRS 811	-	1,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
BRS MG 810C	-	1,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
CD 237 RR	-	2,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
Conquista	-	4,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
Favorita	5,00	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
L8307 RR	41,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	0,00	-	
MS 6101	13,00	5,00	0,00	1,00	0,00	3,50	0,00	0,00	14,00	
MS 7211 RR	-	15,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
MS 7908 RR	12,00	17,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00	0,00	2,00	
MS 8001	-	-	-	1,00	-	0,25	-	-	1,00	
		23,00		1,00		0,25			1,00	
				1,00		1,25			5,00	
MS 8200	2,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
MS 9350	1,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	-	
NA 7255 RR	-	1,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
NA 8015 RR	-	1,00	-	0,00	-	0,00	-	-	0,00	
Nk 7074	-	4,00	-	1,00	-	9,50	-	-	38,00	
Pionner P984511	1,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	0,00	-	
RBL 8307 RR	-	75,00	-	1,00	-	0,25	-	-	1,00	
Sambaiba	-	2,00	-	1,00	-	1,25	-	-	5,00	
Valiosa	24,00	22,00	0,00	1,00	0,00	1,25	0,00	0,00	5,00	
Vencedora	4,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Total	107,00	212,00	0,00	9,00	-	-	0,00	0,00	72,00	

(%) – porcentagem

TABELA 3. Técnica Rolo de Papel: Detecção do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* por cultivares em laudos de sementes de feijoeiro do LAMIP UFU, 2009.

Cultivar	Total Lotes Testados	Número de Lotes Positivos	Incidência (%) sementes infectadas	Equivalente em Número Sementes
Perola	10,0	0,0	0,0	0,0
Total	10,0	0,0	-	0,0

(%) – porcentagem

TABELA 4. Técnica Neon-S e Neon-S 2: Detecção do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* por cultivares em laudos de soja do LAMIP – UFU, 2010, 2011 e 2012.

Cultivar	Total de Lotes Testados			Número de Lotes Positivos			Incidência (%) sementes infectadas			Equivalente em Número Sementes		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012
AN 7337 RR	2,00	-	-	1,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-	-
ANTA	5,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
BRS 810	-	5,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-
BRS 810C	7,00	-	-	2,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-	-
BRS MG 810C	-	4,00	-	-	2,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-
					1,00			0,50			2,00	
Conquista	1,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
Favorita	8,00	-		1,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-	-
				1,00			0,75			3,00		
L8307 RR	136,00	-	-	2,00	-	-	1,25	-	-	1,00	-	-
				3,00			0,75			2,00		
				5,00			1,00			3,00		
				10,00			0,50			4,00		
				34,00			0,25			5,00		
MS 7211 RR	9,00	-	-	1,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-	-
				1,00			0,25			1,00		
				1,00			1,00			4,00		
MS 7639 RR	3,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
MS 7908 RR	7,00	-	-	1,00	-	-	0,50	-	-	1,00	-	-
				3,00			0,25			2,00		
MS 7908 RR	-	7,00	5,00	-	0,00	1,00	-	0,00	0,25	-	0,00	1,00
MS 8200	4,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
N 7255 Floema	-	5,00	-	-	1,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-
NA 7255	3,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
NA 7255 RR	-	-	1,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00

...continua

...continuação

NA 8500	3,00	9,00	-	1,00	1,00	-	0,25	0,25	-	1,00	1,00	-
					1,00			0,50			2,00	
Nideira 7100 RR	-	-	2,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00
NS 8290	-	-	2,00	-	-	1,00	-	-	5,75	-	-	23,00
NT 12	-	03,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-
NT 7001	-	01,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-
RBR NT 12	6,00	-	-	2,00	-	-	0,25	-	-	1,00	-	-
Valiosa	23,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-
Valiosa RR	-	10,00	-	-	2,00	-	-	0,50	-	-	2,00	-
					3,00			0,75			3,00	
Total	217,00	44,00	10,00	69,00	11,00	2,00	-	-	-	32,00	12,00	24,00

(%) – porcentagem

TABELA 5. Técnica Neon-S e Neon-S 2: Detecção do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* por cultivares em laudos de sementes de feijoeiro do LAMIP –UFU, 2010, 2011 e 2012.

Cultivar	Total de Lotes Testados			Número de Lotes Positivos			Incidência infectadas	(%)	sementes	Equivalente em Sementes	Número	
	2010	2011	2012	2010	2011	2012						
Estilo	-	-	4,00	-	-	1,00	-	-	5,00	-	-	20,00
Perola	5,00	10,00	18,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,25	0,50	0	5,00	2,00
					1,00	1,00		14,00	1,25		56,00	5,00
						2,00			3,75			15,00
						1,00			4,50			18,00
						1,00			11,75			47,00
Total	5,00	10,00	22,00	0,00	2,00	8,00	-	-	-	0,00	61,00	137,00

(%) – porcentagem

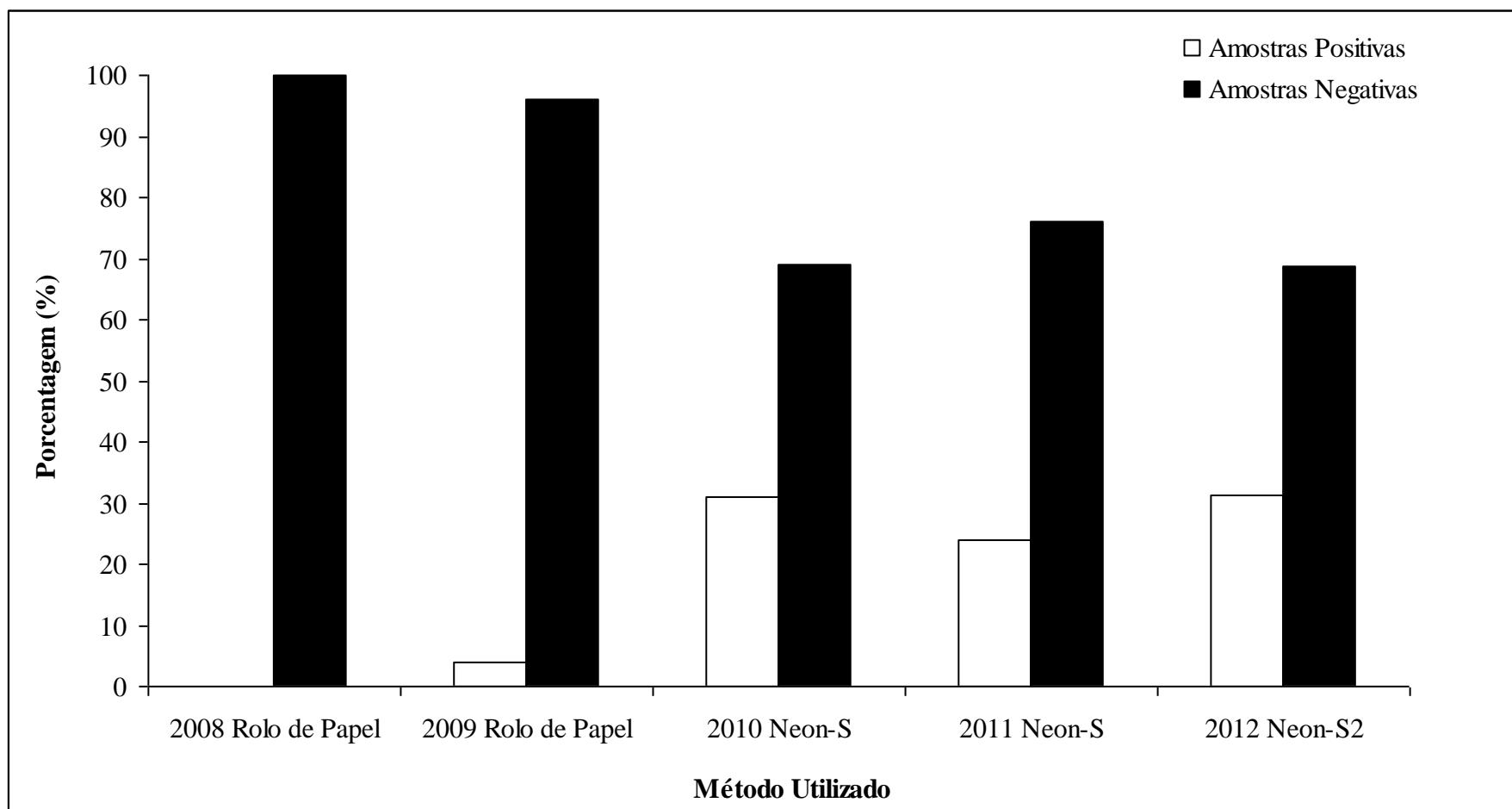


FIGURA 2. Porcentagem de lotes com a presença de *Sclerotinia sclerotiorum* nos métodos utilizados no período de 2008 a 2012.

4.1 Análise Estatística

Na tabela 6 são apresentados os resultados do teste F a 1% de probabilidade, na qual se observa que a interação da cultivar utilizada e o método de detecção do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* são significativos. Este resultado indica que o melhor método de detecção, depende do tipo de cultivar e do tipo de infecção, ou seja, se a semente é de soja ou de feijão, e no caso da soja, se a semente foi infectada naturalmente ou se foi realizada a inoculação artificial.

TABELA 6. Análise de variância da incidência (%) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (infectada naturalmente e artificialmente) e feijão (infectada naturalmente) em três métodos de detecção (rolo de papel, neon S e neon S2 modificado).

FV	GL	SQ	QM	F
Bloco	2	12,108	6,054	0,849 ns
Método	2	190,636	95,318	14,068 **
Cultivar	2	1.582,117	791,058	116,754 **
Método * Cultivar	4	295,209	73,802	10,893 **
Resíduo	16	108,407	6,775	
CV = 39,15				

ns, não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

As médias de incidência do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* para todos os tratamentos estão apresentados na tabela 7. Em relação ao método de detecção só foi observada diferença significativa pelo teste de tukey a 0,05 de probabilidade o tratamento com a soja inoculada quando se utilizou o método do rolo de papel, sendo que este resultado foi inferior aos outros dois métodos, os quais mostraram uma maior incidência do fungo em estudo, e apesar do método S e S2 não terem apresentado diferenças significativas, o método S2 apresentou uma maior média de incidência, indicando que o aumento de quinze dias na leitura dos dados pode ter dado uma maior confiabilidade aos resultados. Para as médias de infecção do fungo nos métodos S e S2, a soja inoculada apresentou os maiores valores quando comparado à soja e ao feijão positivo, este resultado pode ser explicado devido à inoculação ter ocorrido em todas as sementes e, portanto, aumentando a probabilidade de ocorrência da doença em uma maior quantidade de sementes. Quando se observa os resultados do rolo de papel, a maior média também foi apresentada pela soja inoculada, porém, não diferiu estatisticamente da soja positiva.

TABELA 7. Médias de incidência (%) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e feijão em três métodos de detecção.

Cultivar ¹	Método		
	S	S2	Rolo de Papel
Feijão Positiva	0,00 aB	0,17 aB	0,00 aB
Soja Positiva	0,00 aB	0,33 aB	0,25 aAB
Soja Inoculada	12,83 aA	17,00 aA	1,92 bA
DMScultivar= 5,487	DMSmétodo = 5,487		

¹ médias seguidas por letras distintas minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Henneberg e colaboradores (2012), com o objetivo de avaliar a eficiência dos métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja, realizou uma pesquisa comparando cinco métodos: método do papel de filtro (“blotter test”), com três temperaturas diferentes (7, 14 e 20°C); rolo de papel; e meio agar-bromofenol (Neon-S).

Não houve relação entre a percentagem da incidência na amostra e a sua detecção na semente, independentemente do método que foi utilizado. Além disso, na medida em que se aumentou a incidência da amostra, foi verificado um acréscimo no número de sementes detectadas com *S. sclerotiorum*. Quando foi analisado a repetibilidade dos resultados, foi observado que os métodos foram eficientes na detecção do fungo *S. sclerotiorum* em sementes contaminadas artificialmente. Os métodos não diferiram significativamente quanto à capacidade de detectar *S. sclerotiorum* em sementes provenientes de áreas com incidência conhecida da doença, não havendo relação entre a incidência do fungo no campo e a sua detecção na semente.

"Além disso, existem evidências que indicam que o método proposto pode superestimar a incidência do fungo, caso ele se dissemine das sementes infectadas para as vizinhas por contato." (PARISI et al. 2006)

5. CONCLUSÃO

1 – A modificação do método Neon S para Neon S2, aumentando o tempo de incubação, contribuiu para uma melhor confiabilidade na interpretação da leitura, verificando a formação de escleródios.

2 – O método permitiu aumentar a confiabilidade na detecção do patógeno o que tornou ao Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas referência na área atendida pelo mesmo (Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba - MG).

6. REFERÊNCIAS

BARROCAS, E.N. **Métodos de detecção de *Sclerotinia Sclerotiorum* em sementes.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, Universidade Federal de Lavras: UFLA, 2011.

BARROS, C.F. **Ocorrência de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2001 a 2008.** (Dissertação em Mestrado Instituto de Ciências Agrárias), Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

BARROS, R.G; BARRIGOSSI. J. A. F.; COSTA, J. L. S. **Efeito do armazenamento na compatibilidade de fungicidas e inseticidas, associados ou não a um polímero no tratamento de sementes de feijão.** Bragantia, Campinas, v.64, 2005.

BASSAN, D.A.Z.; ORIVALDO, A.R.F.; BUZETTI, S., CARVALHO, M.A.C.; SANTOS, N.L.B.; SÁ, M.E. **Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes.** Revista Brasileira de Sementes, vol.23, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual de análise sanitária de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa. Brasília, 2009.

CAMPOS LEITE, R.M. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.** Embrapa Soja: Londrina, PR, 2003.

CANTERI, M.G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J.S., GIGLIOTTI, E.A., GODOI, C.V., SASM-AGRI: **Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas pelos Métodos Scott – Knott, Tukey e Duncan.** Revista Brasileira de Agrocomputação, V. 1, n.2, p.18 – 24, 2001.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira, Grãos – Junho, 2013.**

CRUZ, V.F.S. **Flexibilização Espacial e Populacional em Cultivares de Soja de Diferentes grupos de Maturação no Distrito Federal *Glycine Max (L.) Merrill.*** Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

DOEDERLEIN, N. **Projeto proíbe uso de 2,4-D em Agrotóxico.** Agência Câmara Notícias, 2002.

GOULART, A.C.P. **Fungos em Sementes de Soja:** Detecção e Importância. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste, 1997.

GRABICOSKI, E. M.G. **Caracterização Morfológica e Patogênica de Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary e Detecção em Sementes de Soja.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ponta Grossa, Setor de Ciências Agrarias e de Tecnologia, 2012.

HECKLER, L. I. SILVA, G. B. P.; SANTOS, R. F.; SCHEEREN, L. E.; FÍNGER, G.; BLUME, E.. **Produtos Biológicos no Controle de Mofo Branco em Diversas Culturas.** Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2009.

HENNEBERG, L.; JACCOUD FILHO, D. S.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; PANOBIANCO, M. **Importância da Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em Sementes de Soja.** Informativo ABRATES, 2011.

HENNEBERG, L.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; JACCOUD FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M.. **Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em Sementes de Soja e Sensibilidade dos Testes de Detecção.** Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 2012.

HENNING, A.A. **Patologia e Tratamento de Sementes:** Noções Gerais. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Notícia: Safra de 2012 bate recorde e chega a 162,1 milhões de toneladas,** 2013.

JACCOUD-FILHO, D.S.M ; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; VRISMAN, C. M.; PIERRE, M. L. C.; SARTORI, F. F.; CANTELE, M. **Importância do Mofo Branco para a Agricultura Brasileira.** XI Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, 2011.

JULIATTI, F.C.; JULIATTI, F.C. **Podridão Branca da Haste de Soja:** Manejo e Uso de Fungicidas em busca da Sustentabilidade nos Sistemas de Produção. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2010.

MALUF, J.R.T. CUNHA; G. R.; MATZENAUER, R; PASINA, A.; PIMENTEL, M. B. M.; CAIAFFO, M. R. **Zoneamento de riscos climáticos para a cultura de feijão no Rio Grande do Sul.** Rev. Bras. Agrometeorologia, 2001.

NAPOLEÃO, R. FILHO, A. C. C.; NASSER, L. C. B.; LOPES, C. A.; SILVA, H. R.. **Intensidade do Mofo-Branco do Feijoeiro em Plantio Convencional e Direto sob Diferentes Lâminas d'Água.** Fitopatologia Bras., 2005.

NAPOLEÃO, R.; NASSERII, L.; LOPES, C.; FILHO, A. C.. **Neon –S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes.** Summa Phytopathol, Botucatu, 2006.

NASSER, L.C.B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R.A. **Mofo branco: Cuidado com a semente.** Revista Cultivar Grandes Culturas, Artigos Técnicos, 1999.

PARISI, J. J. D.; PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, S. H. F.. **Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão.** Summa Phytopathol, Botucatu, SP, 2006.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M. A. B.; CARNEIRO, J. E. S.; ZAMBOLIM, L. **Manejo do mofo-branco do feijoeiro.** Belo Horizonte: Epamig, MG, 2008.

SAGATA, E. **Métodos de Inoculação e Avaliação da Resistência de Genótipos de Soja à *Sclerotinia sclerotiorum*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2010.

SILVA, G. C. ; GOMES, D. P.; KRONKA; A. Z.; MORAES, M. H. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR, 2008.

STEADMAN, J.R.; Marcinkowska, J.; Rutledge, S. **A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*.** Canadian Journal of Plant Pathology, Ottawa, v.16, n.2 ,p.68-70, 1994.

TELES, HÉRIA DE FREITAS. **Qualidade de sementes de soja e incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary em função do beneficiamento e armazenamento.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás, 2012.

VIEIRA, R.F., PAULA JUNIOR, T. J.; PERES, Â. P.; MACHADO, J. C. **Fungicidas Aplicados Via Água de Irrigação no Controle do Mofo Branco no Feijoeiro e Incidência do Patógeno na Semente.** Fitopatologia Brasileira, 2001.

VIEIRA-JUNIOR, P.A.; DOURADO-NETO, D.; SMIDERLE, O. J.; CICERO, S. M.. **Efeitos de métodos de irrigação sobre a produção e a qualidade de sementes de feijão.** Revista Brasileira de Sementes, vol. 20, 1998.

WEBER, A.R.H. **Programação Genética, Redes Neurais Artificiais e técnicas de Balanceamento na Modelagem de dados Agrícolas: Estudo da Doença de Mofo Branco.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2012.