

FESURV - UNIVERSIDADE DE RIO VERDE
FACULDADE DE AGRONOMIA
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*

GELIANE CARDOSO RIBEIRO
Magister Scientiae

RIO VERDE
GOIÁS – BRASIL
2012

GELIANE CARDOSO RIBEIRO

**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Fesurv – Universidade de
Rio Verde, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

**RIO VERDE
GOIÁS - BRASIL**

2012

GELIANE CARDOSO RIBEIRO

**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Fesurv – Universidade de Rio Verde, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 27 de fevereiro de 2012

Prof. Dr. Hercules Diniz Campos
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Alberto Leão de Lemos Barroso
Membro – FA/FESURV

Prof. Dr. Gustavo André Simon
Membro – FA/FESURV

Dr. Maurício Conrado Meyer
Membro – Embrapa Soja - Goiânia

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Abilio Ribeiro Sobrinho e Iraci Cardoso Ribeiro.

Aos meus irmãos, Cairo, Geaine, Estevan e Karla.

Aos meus sobrinhos, Mariana, Gabriel, Vinicius, Rafael, Maria Eduarda, Paulo Fernando e Felipe.

As minhas amigas: Kátia, Elisângela, Eliane e Lucélia.

E a todos que sempre me apoiaram e me deram forças, acreditando na minha capacidade.

Dedico com apreço a todos vocês!

AGRADECIMENTO

A Deus, por me conceder mais esta conquista.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade de Rio Verde – Fesurv.

Ao orientador e Prof. Dr. Hercules Diniz Campos, pela paciência, amizade e ensinamentos que foram essenciais para a conclusão deste.

Aos colegas e as amigadas construídas no decorrer do curso, Lilianne Martins Ribeiro, José Carlos e Afonso Celso.

À secretária Rizzia, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Ms. Luís Henrique Carregal P. da Silva, pela amizade e os conselhos.

À Rita de Cássia e aos estagiários do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde, pela amizade e contribuição.

À Universidade de Rio Verde, pela oportunidade cedida através do programa, em podermos aprimorar ainda mais nossos conhecimentos.

A Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Prof. Dauri José Tessmann, e aos alunos Danilo Lima, Cleilton, Tatiane e Monica, pela ajuda e orientação no desenvolvimento das atividades concluídas na UEM.

À CAPES pelo fomento da pesquisa realizada por meio do Procad.

Ao Dr. Gustavo André Simon e Dr. Alberto Leão de Lemos Barroso, pelo aceite de participação na banca de defesa.

Ao Pesquisador Maurício Conrado Meyer, pela colaboração na banca de defesa e auxílio ao ceder-nos alguns isolados utilizados no trabalho.

Agradeço a todos, muito obrigada!

“Todas as coisas são possíveis para aquele que crê” (Marcos, 9, 23)

“Nada poderá me abalar,
Nada poderá me derrotar,
Pois minha força e vitória
Tem um nome
E é Jesus”

(Eliana Ribeiro)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	Vi
LISTA DE FIGURAS.....	Viii
RESUMO GERAL.....	Ix
GENERAL ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Taxonomia.....	3
2.2 Aspectos biológicos.....	4
2.2.1 Produção de escleródios.....	4
2.2.2 Germinação dos escleródios.....	5
2.3 Ciclo de vida e epidemiologia.....	6
2.4 Mecanismo de patogenicidade.....	8
2.4.1 Produção de ácido oxálico.....	10
2.5 Variabilidade do patógeno.....	11
2.6 Fungicidas para o controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13
2.7 Caracterização molecular.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1. Sensibilidade de isolados de <i>sclerotinia sclerotiorum</i> provenientes de soja a fungicidas.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Obtenção dos isolados.....	27
2.2 Preparo do inóculo.....	28
2.3 Instalação do experimento.....	28
2.4 Avaliações.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4. CONCLUSÕES.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

CAPÍTULO 2. Caracterização molecular de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> provenientes da região Central do Brasil.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Obtenção dos isolados.....	51
2.2 Multiplicação e preparo do inóculo.....	52
2.3 Extração do DNA.....	53
2.4 Identificação da espécie.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4 CONCLUSÕES.....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Ingrediente ativo (i.a.), produto comercial (p.c.), concentração (g i.a.L ⁻¹ ou kg ⁻¹ do produto comercial) e doses (mg i.a.mL ⁻¹ de meio de cultura) utilizadas no ensaio <i>in vitro</i> para diferentes isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	27
TABELA 2	Identificação dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> provenientes de soja.....	28
TABELA 3	Número em dias para o crescimento máximo (preenchimento completo do espaço na placa contendo meio BDA) de cada isolado avaliado.....	30
TABELA 4	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado do município de Água Fria – GO.....	32
TABELA 5	Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Água Fria – GO, aos 21dias em meio de cultura contendo fungicidas.....	34
TABELA 6	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado do município de Jataí – GO.....	34
TABELA 7.	Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Jataí – GO, aos 21dias em meio de cultura contendo fungicidas.....	36
TABELA 8.	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado proveniente do município de Goianápolis – GO.....	36
TABELA 9.	Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Goianápolis – GO, aos 21dias em meio de cultura contendo fungicidas.....	37
TABELA 10	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Mauá da Serra – PR.....	38
TABELA 11	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Montividiu – GO.....	39
TABELA 12	Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Montividiu – GO, aos 21dias em meio de cultura contendo fungicidas.....	40

TABELA 13	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Roda Velha – BA.....	41
TABELA 14	Número e peso de escleródios produzidos aos 21dias pelo isolado proveniente do município de Roda Velha – BA.....	42
TABELA 15	Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Rosário – BA...	43
TABELA 16	Número e peso de escleródios produzidos aos 21dias do isolado da região de Rosário – BA.....	44
TABELA 17	Identificação dos isolados utilizados no estudo de caracterização molecular.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Área abaixo da curva de progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para cada isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em meio de cultura contendo ou não os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiram.....	31
FIGURA 2	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) com o isolado de Água Fria – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A); pentiopirade (B) e fluopiran (C), em funções das doses utilizadas.....	33
FIGURA 3	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) como o isolado de Jataí – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A); pentiopirade (B) e fluopiran (C), em funções das doses utilizadas.....	35
FIGURA 4	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) como o isolado de Goianápolis – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A) e fluopiran (B), em funções das doses utilizadas.....	37
FIGURA 5	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) como o isolado de Mauá da Serra – PR, para os tratamentos contendo fungicidas pentiopirade (A) e fluopiran (B), em funções das doses utilizadas.....	39
FIGURA 6	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) como o isolado de Montividiu – GO, para os tratamentos contendo fungicidas fluopiran, em funções das doses utilizadas.....	40
FIGURA 7	Índice de velocidade de crescimento miceliano (IVCM) para os tratamentos contendo o fungicida boscalida, em funções das doses utilizadas.....	41
FIGURA 8	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado proveniente do município de Rosário – BA, para o tratamento contendo o fungicida fluopiram, em função das doses utilizadas.....	43
FIGURA 9	Gel de agarose da reação da polimerase em cadeia (PCR) demonstrando a amplificação específica, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS4/ITS5 para os 19 isolados analisados.....	55

FIGURA 10 Árvore filogenética consenso inferida pelo método de agrupamento de vizinhos, a partir de sequências de DNA das regiões ITS4 e ITS5 do rDNA de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. Os números sobre as ramificações indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual, as repetições foram observadas (1.000 repetições)..... 57

RESUMO GERAL

RIBEIRO, Geliane Cardoso. FESURV - Universidade de Rio Verde, fevereiro de 2012. **Sensibilidade a fungicidas e caracterização molecular de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. Orientador: Dr. Hercules Diniz Campos. Co-orientador: Dauri José Tessmann

O mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é conhecido pelos danos causados às culturas na maioria dos Estados produtores do País, tornando necessário conhecer ação de fungicidas em seu desenvolvimento, bem como a possível existência de variabilidade genética. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: primeiro, avaliar o efeito de fungicidas sobre o crescimento miceliano de diferentes isolados de *S. sclerotiorum*, proveniente de plantas de soja infectadas dos municípios de Jataí – GO; Montividiu – GO; Goianápolis – GO; Água Fria – GO; Mauá da Serra – PR; Roda Velha – BA e Rosário – BA; segundo, caracterizar molecularmente 19 isolados de *S. sclerotiorum* provenientes das culturas da soja, algodão, feijão e girassol obtidos de diferentes locais e regiões geográficas da região Central do Brasil. O experimento com fungicidas foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde-GO. O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos por dez fungicidas, em três doses: fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol; carbendazim; tiofanato-metílico; fluazinam; boscalida; procimidona; fluazinam + tiofanato metílico; pentiopirade; fluopirran; fluodioxonil + metalaxil e uma testemunha sem fungicida. Os mesmos foram adicionados em meio BDA e vertidos em placas de petri de 80 mm de diâmetro. Em seguida, discos de 5 mm contendo micélio foram acondicionados no centro da placa e incubadas a 24°C na ausência de luz. O crescimento miceliano, em diâmetro da colônia, foi avaliado a cada 24 horas. Após, determinou-se a área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano e o índice de velocidade do crescimento miceliano. A produção de escleródios (peso e número) foi avaliada aos 21 dias de incubação. Para o experimento de caracterização molecular empregou-se a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos *primers* universais para amplificação da região ITS4/ITS5. Após o sequenciamento genético das populações, essas foram analisadas com o auxílio do programa Bioedit. Em seguida, os sequenciamentos foram submetidos à consulta de similaridade de nucleotídeos de *Sclerotinia* depositadas na base de dados NCBI, com o auxílio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A partir dos alinhamentos, foi desenvolvida a árvore filogenética, utilizando-se o programa PAUP*4.0. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos contendo os fungicidas fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol, carbendazim, procimidona, tiofanato-metílico, fluazinam, fluazinam + tiofanato-metílico e fluodioxonil + metalaxil não permitiram o crescimento miceliano dos isolados de *S. sclerotiorum* utilizados. Os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopirran proporcionaram o crescimento miceliano de todos os isolados de *S. sclerotiorum*. Os fungicidas boscalida e pentiopirade, independente da dose, proporcionaram, exceto para o isolado Mauá da Serra, produção de escleródios em todos os isolados testados. O tratamento contendo fluopirran proporcionou a formação de escleródios apenas nos isolados de Montividiu – GO, independente da dose e Rosário – BA, na maior dose avaliada. Para a caracterização molecular, evidenciou-se que os 19 isolados utilizados apresentaram máxima identidade com a espécie *S. sclerotiorum*, ou seja, 99 a 100% das bases foram idênticas às depositadas no Genbank. Houve a formação de dois grupos distintos, separando 3 isolados dos demais. Os resultados evidenciaram a ocorrência apenas

da espécie *S. sclerotiorum* entre os isolados, o que corrobora para a existência de apenas uma espécie nas regiões de origem dos mesmos.

Palavras-chave: Mofo branco, controle químico, *Glycine max*, variabilidade genética, PCR, região ITS4/ITS5.

GENERAL ABSTRACT

RIBEIRO, Geliane Cardoso. FESURV-University of Rio Verde, february 2012. **Sensitivity the fungicides and molecular characterisation of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*.** Adviser: Dr. Hercules Diniz Campos. Co-adviser: Dauri José Tessamann

The white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is known for damage to crops in most States producers in the country, making it necessary to know in its development action fungicides as well as the possible existence of genetic variability. The present work had as objectives: first, to assess the effect of fungicides on the micelyal growth of different isolated from *S. sclerotiorum* from soybean plants infected of rigions of Jataí-GO; Montividiu-GO; Goianapolis – GO; Água Fria – GO; Mauá da Serra – PR; Roda Velha – BA and Rosario – BA; Second, bind molecularly characterize 19 *S. sclerotiorum* isolates from soybean crops, cotton, beans and sunflower obtained from different locations and geographical regions in the Central region of Brazil. The experiment with fungicides was conducted in the laboratory of plant pathology at the University of Rio Verde-GO. The experimental design was entirely at random, with 11 treatments and 4 repetitions. The treatments were composed of ten fungicides, in three doses: mefenoxan + fludioxonil + thiabendazole; carbendazim; thiophanate methyl; fluazinam; boscalid; procymidone; fluazinam + thiophanate methyl; penthiopyrad; fluopyran; fluodioxonil + metalaxyl and a witness without fungicide. They were added in the middle in pouring and BDA petri dishes of 80 mm in diameter. Then 5 mm discs containing mycelium was wrapped in the center of the plate and incubated at 24° C in the absence of light. Mycelium growth in diameter of the colony, was assessed at each 24 hours. After determined the area under the curve of growth progress of mycelium of index growth speed of production of sclerotium (weight and number) was obtained on 21 days of incubation. For the molecular identification experiment employed the technique of polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotides universal primers for amplification of the region Briefly/ITS5. After the sequencing of these populations were analyzed with the aid of Bioedit program. The sequencing were referred to the nucleotide similarity query of *Sclerotinia* deposited in NCBI, database, with the aid of the tool BLAST (Basic Local Aligment Search Tool). From alignments, phylogenetic tree was developed using the program PAUP * 4.0. The results obtained showed that treatments containing fungicides fludioxonil + mefenoxan + thiabendazole, procymidone, carbendazim, thiophanate methyl, fluazinam, fluazinam + thiophanate methyl and fluodioxonil + metalaxyl allowed the mycelium growth of *S. sclerotiorum* isolates used. The fungicides boscalid, penthiopyrad and fluopyran provided the micelium growth of all isolates of *S. sclerotiorum*. The fungicides boscalid and penthiopyrad, regardless of the dose provided, except for the isolated Mauá da Serra, production of sclerotium in all tested isolates. The treatment gave the formation of fluopyran containing sclerotium only in isolated Montividiu – GO, regardless of dose and Rosario – BA, in higher doses evaluated. For molecular characterization showed that isolated 19 used maximum identity with the species have *S. sclerotiorum*, i.e. 100% of 99 the bases were the same as those deposited in Genbank. There was the formation of two distinct groups, separating 3 isolated from others. The results showed the only occurrence of the species *s. sclerotiorum* between isolates, which corroborates the existence of only one species in the regions of origin.

Keywords: White mold, chemical control, *Glycine max*, genetic variability, PCR, Briefly region/ITS5.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está se consolidando com uma produção agropecuária entre as mais prósperas do planeta e já é considerado um dos principais fornecedores de proteínas no mercado internacional de alimentos.

A safra 2010/2011 levou o País a um recorde na produção de grãos estimada em 162,958 milhões de toneladas, resultado que foi 8,2% acima da safra anterior, com variação positiva de 3,8% na área plantada e de 4,2% na produtividade. Tal desempenho coloca o Brasil entre os mais competitivos do mundo, com capacidade de atender ao aumento da demanda por alimentos. Tudo isso foi possível, em boa parte, pela conjuntura econômica favorável, bem como a crescente incorporação de novas tecnologias pelos produtores. A expectativa para a safra 2011/2012 é a de que ocorra uma redução de 2,4% em relação a última safra (Conab, 2012). Essa estimativa depende de fatores que interferem na produtividade e ocorrem durante todo o ciclo das culturas. Os dados serão consolidados à medida que fatores climáticos negativos e sanitários perdem à interferência, sendo esses os que mais influenciam.

Levando em considerações os problemas sanitários, as doenças têm importante papel. Sendo assim, nos últimos anos, algumas doenças tiveram relevância devido aos prejuízos consideráveis na produtividade, ocasionando maior preocupação com a necessidade e disponibilidade de tecnologias para seu manejo.

Na região Central do Brasil, o mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, ganhou destaque no cenário pela sua capacidade de colonizar a maioria das culturas. Contudo, uma característica marcante desse fungo é a capacidade de, a cada ciclo da doença, formar grande quantidade de estruturas de resistência que permanecem viáveis por vários anos.

As medidas de controle podem funcionar bem quando empregadas em conjunto e com o diagnóstico correto da doença, sendo que variedades resistentes ainda não estão disponíveis no mercado, portanto o tratamento de sementes, palhadas com objetivo de proteger o solo, dificultando a germinação dos escleródios, adubação adequada com base na necessidade real para a cultura, microrganismos antagonistas, e o uso racional de fungicidas são as mais empregadas. No entanto, sabendo-se que sua reprodução ocorre de forma assexuada e sexuada, aumenta as possibilidades de ocorrência de mutação genética no patógeno, tornando ainda mais difícil o seu manejo. Portanto, este trabalho teve como objetivos gerais avaliar a

sensibilidade a fungicidas e a caracterização molecular de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes de diferentes regiões.

2. REVISÃO LITERATURA

O mofo branco causado por *S. sclerotiorum* (Lib.), de Bary, é conhecido e estudado desde 1837 (Bolton et al., 2006). No Brasil o primeiro relato da doença ocorreu em 1921, por Saccá, que diagnosticou o fungo em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.), no Estado de São Paulo. Nos anos seguintes, o patógeno foi verificado em diferentes hospedeiros em outros estados do País (Chaves, 1964).

Com a expansão da fronteira agrícola na região dos cerrados, e com a agricultura praticada no período frio do ano e sob sistemas irrigados, essa doença se destacou na cultura do feijão e da ervilha, pois o patógeno encontrou temperaturas amenas e umidade alta (Café-Filho, 1985).

Na cultura da soja, a doença só foi constatada no Brasil em 1975, no Estado do Paraná, causando perdas de até 70% de plantas infectadas em lavouras destinadas à produção de sementes (Ferreira et. al., 1981). Nesse período, as perdas da produção de soja devido à incidência da doença em lavouras comerciais nos municípios de Castro, Ponta Grossa, Palmeira e Guarapuava, no estado do Paraná, variaram de 70 a 92 % no rendimento de grãos, com incidência (percentual de plantas infectadas) variando de 20 a 90%, respectivamente (Homechin, 1982).

No início da década de 1980, foram registradas perdas de até 30% em lavouras de soja dos municípios de São Gotardo, Rio Parnaíba, e Carmo do Parnaíba, em Minas Gerais devido à grande ocorrência de *S. sclerotiorum* (Nasser et. al., 1984). Em Goiás, o mofo branco aumentou consideravelmente, afetando cerca de 45% da área cultivada na safra de 2009/2010 (Campos et al, 2010). Campos et. al (2005) já relataram, que em áreas de 100 a 300 hectares, com incidência da doença superior a 50%, ou seja, a cada 100 plantas avaliadas, 50 apresentavam sintomas e sinais do patógeno, as perdas ultrapassaram a 60% do rendimento de grãos.

No município de Jataí – GO, os primeiros relatos da doença aconteceram na safra de 2001/02. Na safra de 2005/2006, algumas lavouras apresentaram altas incidências, chegando a

ocorrer perdas de até 33%, na safra de 2007/2008, foi observada presença da doença em quase todas as áreas de cultivo da leguminosa (Görgen, 2009). De modo geral, nas regiões sudoeste, leste de Goiás e entorno do Distrito Federal, as perdas já alcançaram 60% nas produtividades (Nunes, Jr., 2009). No estado de Minas Gerais, a doença que proporcionou principal atenção na safra de 2007/08 foi o mofo branco, devido a sua alta incidência nas áreas acima de 900m de altitude (Zanettii, 2009). Na região de Chapadão do Sul (MS), o cultivo do girassol safrinha causou grande disseminação da doença comprometendo outras espécies susceptíveis, entre elas a soja (Pitol, 2009).

A espécie *S. sclerotiorum* é um patógeno cosmopolita e inespecífico, podendo infectar mais de 408 espécies de plantas, entre elas, monocotiledôneas e dicotiledôneas (Boland; Hall, 1994), destacando-se: a soja, o girassol, a canola, a ervilha, o feijão, a alfafa, o fumo, o tomate e a batata (Leite, 2005), plantas infestantes como: carrapicho, mentrasto, caruru, picão, mostarda, botão-do-ouro, marselha, serralha e vassourinha já foram comprovadas suscetíveis a *S. sclerotiorum* (Vieira, 1988).

2.1. Taxonomia

Pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Helotiales, Família Sclerotiniaceae, Gênero *Sclerotinia*, são conhecida principais espécies como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *S. borealis*, *S. babulbarium*, *S. glacidis*, *S. homeocarpa*, *S. nivalis*, *S. pirolae*, *S. spermophila*, *S. subarctica*, *S. tetraspora*, *S. trifoliorum*, *S. veratri* (NCBI, 2011). A característica mais marcante da Ordem Helotiales é a formação de escleródios bem desenvolvidos; já a família Sclerotiniaceae caracteriza-se pela produção de apotécios com estipe a partir da germinação dos escleródios (fase sexual). O micélio desse grupo de fungos é constituído por hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas (Bolton et al., 2006).

O filo *Ascomycotina* constitui o grupo mais numeroso de fungos. Sua característica básica é a formação, após a meiose, de esporos sexuais, os ascósporos, dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco (Krugner; Bacchi, 1995).

2.2. Aspectos biológicos

2.2.1. Produção de escleródios

As hifas vegetativas, inicialmente se desenvolvem de forma distanciada umas das outras. À medida que diminui a disponibilidade de nutrientes, ocorre a atração e fusão de hifas, dando início à formação de escleródios, processo que envolve mudanças celulares, mobilização e deposição de muitas substâncias. Alguns isolados perdem a habilidade de produzir escleródios após repicagens consecutivas em meio de cultura, isto pode ser devido à incapacidade do fungo sintetizar compostos específicos exigidos para a sua formação (Letorneau, 1979).

Os estágios de formação de escleródios podem ser caracterizados em três fases: iniciação, que é a agregação de hifas para formar uma massa branca chamada de escleródio inicial; desenvolvimento, caracterizada pelo crescimento das hifas e agregação para aumentar de tamanho; e a maturação, delimitação da superfície, depósito de melanina e consolidação interna (Bolton et. al. 2006). Os escleródios são compostos por três camadas distintas: uma parede externa grossa rica em melanina, responsável pela coloração negra; uma parede fina (córtex) e a medula branca, que nada mais é do que o micélio dormente do fungo. Metabólitos presente em *Sclerotinia* spp., conhecido como “sclerin”, em combinação com outros compostos, como fenóis, estão envolvidos na melanogênese e na formação de agregados de hifas (Letorneau, 1979), a melanina confere resistência dos escleródios às condições adversas do solo fazendo com que esses permaneçam viáveis por vários anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (Rocha, 2007).

O fungo produz β -caroteno em baixo e alto níveis durante o estágio de não-diferenciação e diferenciação, respectivamente. Em isolados que formam escleródios, a produção de β -caroteno depende das condições de luz durante os estágios de desenvolvimento, enquanto que, em isolados que não formam escleródios, a produção de β -caroteno é muito baixa e independe de luz e do período de crescimento (Georgiou et al., 2001).

São considerados como estrutura de resistência, de consistência firme que desempenha papel importante na sobrevivência do fungo, durante a entressafra, conservando intacto seu poder patogênico. Esse processo se dá pela constituição física dura, devido à presença da proteção exterior negra formada pela concentração de melanina, altamente resistente à

degradação microbiana, envolvendo a parte interna formada pelo micélio do fungo, composto por uma matriz fibrosa composta de carboidratos, quitina e β -glucanos (Letorneau, 1979).

Segundo Huang (1983), o fungo também pode produzir escleródios diferenciados em plantas de girassol. O primeiro relato foi em Manitoba, nos anos de 1977/79. Foram determinados escleródios anormais aqueles que apresentaram a superfície enrugada diferentemente dos escleródios normais que apresentaram superfície lisa. Os escleródios anormais perderam a viabilidade mais rápido, comparados com os normais, e a redução na longevidade foi proporcional ao grau da má formação. A viabilidade dos escleródios diminuiu com o aumento da temperatura de 0,5°C a 30°C e, para cada temperatura, a taxa de viabilidade reduziu com o aumento do período de armazenamento e grau de anomalia (Huang; Kozub, 1994).

2.2.2. Germinação dos escleródios

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica, em que ocorre a produção de micélio hialino e septado (Purdy, 1979), ou carpogênica, formando os apotécios (Schwartz, Steadman, 1989).

Vários fatores podem determinar o tipo de germinação, entre eles, as condições ambientais e as concentrações de nutrientes disponíveis no escleródio. Venette (1998) observou que, em situações de limitações de nutrientes, pode ser desencadeada a germinação carpogênica, já com a disponibilidade de nutrientes, os escleródios podem germinar formando um novo micélio.

A germinação carpogênica se inicia com a ativação do desenvolvimento do fungo na região do córtex esclerodial ou medular, assim as células fúngicas crescem formando primórdios que rompem a capa do escleródio e continuam o crescimento como ramificações em forma de tubo, denominadas estipes (Bolton et. al., 2006). Esse processo ocorre sob condições de alta umidade, temperatura amena (18 a 22°C) e luminosidade moderada (Boland, 1987). Essas estipes, sob o efeito da luz, especialmente a ultravioleta (< 390 nm), diferenciam-se dos apotécios, ou seja, a ponta da estipe expande para formar uma superfície superior (himênio), dando origem ao aparecimento do apotécio, uma estrutura em forma de taça (Bolton et al., 2006). Dentro dos apotécios, formam-se as ascas que contêm os ascósporos (esporos sexuais) que são a principal fonte de inóculo de *S. sclerotiorum* (Boland, 1987). Cada apotécio produz centenas de ascos de forma cilíndrica, nos quais ocorre a

recombinação sexual, produzindo os ascósporos perfeitamente alinhados. Nos ascos são produzidos oito ascósporos ou múltiplos de 8, que são ovóides e apresentam de 4 a 10mm de largura e 9 a 16 mm de comprimento, hialinos, elipsóides e binucleados (Schwartz; Steadman, 1989).

O apotécio pode liberar ascósporos continuamente por 5 a 11 dias, com uma média de 9 dias. A produção máxima de ascósporos ocorre num intervalo de 2 a 3 dias entre o quarto e nono dia de vida ativa do apotécio, o total de ascósporo produzidos por um apotécio atinge ao redor de 2 milhões (Steadman, 1983).

A influência do tamanho dos escleródios na germinação carpogênica apresentou resultados contraditórios. Para Budge, Whipps (1991), maior produção de apotécios foi obtida com escleródios com peso menor que 10mg e 2mm de diâmetro. Dillard et al. (1995) observaram que quanto maiores os escleródios maior, a porcentagem de escleródios germinados e maior o número de apotécios produzidos. Para Bidi (1963), escleródios maiores produziram maior número de apotécios, sendo que um escleródio de 13mm x 5mm, deu origem a 15 apotécios.

Compostos voláteis produzidos pela decomposição de restos de culturas podem estimular os escleródios a germinarem e infectar os tecidos dos hospedeiros. Aminoácidos de ácidos orgânicos do ciclo de Krebs, composto orgânico e inorgânico são boas fontes de nitrogênio para a formação dos escleródios. A relação carbono/nitrogênio (C/N) e a forma do nitrogênio com relação ao C/N podem afetar a produção de escleródios. As espécies de *Sclerotinia* utilizam como fonte de carbono muitos compostos orgânicos, tais como: açúcares, alcoóis e ácidos orgânicos, para o crescimento e produção de escleródios. A inabilidade de usar as fontes de carbono endógenas, normalmente presentes no escleródio para o crescimento miceliano, pode ser parte de um mecanismo de controle relativo à germinação carpogênica e miceliogênica (Wong; Willets, 1974).

2.3. Ciclo de vida e epidemiologia

Os escleródios produzidos em plantas infectadas vão retornar ao solo após a colheita agregados aos resíduos das culturas, podendo então garantir a perpetuação do fungo nos próximos cultivos (Schwartz, Steadman, 1978).

Steadman (1983) relata que somente os escleródios localizados na superfície do solo e aqueles até 5 cm de profundidade podem produzir apotécios. Embora Cook et. al. (1975)

relataram que alguns escleródios localizados até 10 cm de profundidade também podem produzir apotécios. Segundo Schwartz; Steadman, (1989), o apotécio tem 3 mm de diâmetro e pode elevar-se de 3 a 6 mm da superfície do solo. Quando ocorre estresse hídrico, logo após o início da germinação dos escleródios, pode ocasionar um retardamento na formação dos apotécios (Abawi; Grogan, 1975).

Quando os ascósporos estão maduros dentro dos ascos, um ligeiro decréscimo da umidade relativa do ar provoca a liberação por ejeção (Natti, 1971). No apotécio também são formadas numerosas ascas estéreis, denominadas de paráfise, que podem servir como estruturas de suporte. Dentro das ascas, um vacúolo que é responsável pelo aumento da pressão hidrostática forma-se abaixo dos ascósporos. E à medida que a pressão aumenta, a asca se expande, porém a sua pressão lateral é limitada pela paráfise, e ascas vizinhas, com a expansão continua relativamente além da paráfise e em algum momento, a pressão excedente torna-se insuportável pela parede esticada, as ascas explodem e liberam os ascósporos para o ambiente (Venette, 1998).

Uma substância mucilaginosa é liberada junto com os ascósporos, o que auxilia na sua adesão aos tecidos dos hospedeiros ou a outros obstáculos encontrado durante o seu percurso aéreo. A maioria dos ascósporos ficam retidos dentro do dossel das plantas, possibilitando alto potencial de infecção local. Os ascósporos que sobrepõem às plantas são facilmente disseminados pelo vento e podem infectar plantas em um raio de 50 a 100m da fonte produtora (Abawi; Grogan, 1979).

A liberação dos ascósporos ocorre tanto durante o dia quanto à noite. No entanto a duração entre cada liberação pode variar de 36 a 168 horas, havendo declínio quando a umidade relativa do ar atinge valores entre 65 a 75% (Clarkson et. al., 2003).

A germinação constante de escleródios e a liberação contínua dos ascósporos de cada apotécio asseguram adequado potencial de infecção superior a 2 semanas (Vieira, 1994). Os ascósporos liberados pelos apotécios constituem a fonte primária de infecção de plantas (Abawi; Grogan, 1979). Tecidos vegetais jovens e, principalmente flores e fragmentos de flores, órgãos que possuem altas concentrações de α -celulose são a base nutritiva para o início da colonização do fungo (Sutton; Deverall, 1983). Se os mesmos forem liberados antes da fase de floração das plantas, eles serão incapazes de causar a doença sem o estímulo da α -celulose contida nas flores senescentes, havendo umidade existe a possibilidade deles sobreviverem por até duas semanas na superfície da planta ou do solo. Uma vez colonizadas as flores, o micélio pode permanecer viável por até 30 dias (Steadman, 1983).

Após os ascósporos serem depositados sobre os tecidos florais senescentes, germinam, infectam e formam o micélio que invade também outros tecidos saudáveis do hospedeiro (Lu, 2003). Essa colonização também poderá ocorrer por escleródios que germinam na forma miceliogênica no solo, produzindo hifas e colonizando diretamente a matéria orgânica em decomposição, formando um micélio que em contato com a planta hospedeira causa a infecção. No entanto, isso ocorre devido a produção de alguns compostos voláteis produzidos pela decomposição, estimulando a germinação dos escleródios (Purja, 1985).

O fungo não produz esporos a partir do micélio, mas pode produzir microescleródios no micélio ou no himênio do apotécio (Kohn, 1979), porém esses microescleródios não germinam e sua função na biologia ainda é desconhecida (Bolton et. al., 2006).

2.4. Mecanismo de patogenicidade

A patogenicidade pode ser facilitada em seus hospedeiros pela produção de uma ampla gama de enzimas degradantes da parede celular, que incluem: pectinases, β -1,3-glucanases, glicosidases, celulasas, xilanases e cutinase, dando grande flexibilidade ao patógeno para a penetração e colonização do hospedeiro (Bolton et. al., 2006).

Entre as várias enzimas secretadas, *S. sclerotiorum* sintetiza um grupo conhecido como Poligalacturonases (PGs), que é composto por isoformas que atuam em conjunto, cujo alvo são as ligações endo e exo dos polímeros de ácido poligalacturônico da pectina presente na parede celular da planta, e o resultado final é a maceração do tecido, lesões em haste e morte do hospedeiro (Fraissinet-Tachet; Fevre, 1996). Uma isoforma de Endopoligalacturonase foi descrita também como indutora de morte celular programada no hospedeiro, favorecendo o ataque necrotrófico do fungo *S. sclerotinia* (Zuppini et al. 2005).

Entre as isoformas de Poligalacturonases existentes em *S. sclerotiorum* na fase inicial do processo de infecção, são mais expressivas pelos genes *sspg1*, *sspg2* e *sspg3* (Cotton et al. 2002) essas enzimas apresentam uma alta identidade da sequência de aminoácidos, entre 95% e 97% (Kasza et al. 2004). A análise da cinética de expressão gênica das Poligalacturonases *in vivo* em *S. sclerotiorum* revela um padrão de transcrição sequencial, em que PG1, PG2 e PG3 são secretadas durante a fase de colonização do tecido vegetal saudável, PG5 é secretada durante a fase de maceração do tecido, já o PG6 e PG7 exibem uma secreção constante na cinética a partir da vigésima quarta hora após a infecção no hospedeiro (Kasza et al. 2004).

As células vegetais possuem em sua composição uma complexa rede de microfibrilas

de celulose, moléculas de hemicelulose e pectina. Esta última é um carboidrato formado por polímeros de ácido poligalacturônico, que, juntamente com os polissacarídeos que compõem a hemicelulose e celulose, são responsáveis pela rigidez da parede celular (Vries; Visser. 2001), formando uma verdadeira barreira física. Esses componentes funcionam como verdadeiros elicitores ao entrar em contato com estruturas infectantes de *S. sclerotiorum*, principalmente os monômeros de pectina, que, sofrendo despolimerização, proporcionam uma rica fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo (Fraissinet-Tached et al. 1995).

A decomposição dos componentes da parede celular dos tecidos vegetais, durante o processo de patogenicidade de *S. sclerotiorum*, envolve um sistema complexo de ativação enzimática, com o objetivo final de extrair compostos essenciais a sua sobrevivência, pela ação de proteases, pectinases e outras enzimas hidrolíticas sobre o hospedeiro (Hancock, 1966).

Com o início do processo de invasão, a planta ativa a formação de uma barreira tóxica contra o patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o ânion super-óxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rezende et al. 2003), que buscam eliminar a fonte agressora, seja pelo efeito tóxico direto das EROs ou pela ativação de genes de defesa da planta, a exemplo dos Inibidores de Poligalacturonases, PGIs (Cessna et al. 2000).

A capacidade de sintetizar o ácido oxálico tem sido considerada um fator determinante para a patogenicidade. Quando se trataram plantas de feijão e girassol com ácido oxálico sintético e um filtrado de *S. sclerotiorum*, obtiveram resultados dos mesmos sintomas exibidos por plantas naturalmente infectadas em campo (Noyes; Hancock, 1981). Outro estudo realizado por Godoy et al, (1990), no qual se inoculou micélio de *S. sclerotiorum* silvestre (OA^+) e mutantes deficientes da biosíntese de ácido oxálico (OA^-) em plantas de girassol, os resultados foram de menor patogenicidade pelo isolado mutante, apresentando um crescimento de 19 a 28 % inferior ao OA^+ e a incapacidade de formar escleródios.

A síntese e a secreção de oxalato têm como determinante o pH do meio (Cotton et al. 2003), via um fator de transcrição conhecido como *PacC* (Rollins et al. 2001). Pesquisas relacionadas ao fator *PacC* demonstraram a sua importância no desenvolvimento e maturação de escleródios, além do envolvimento na virulência de *S. sclerotiorum* (Rollins 2003) e na expressão de genes relacionados à virulência de outros fungos, como exemplo o *Fusarium oxysporum* (Caracuel et al. 2003), *Candida albicans* (El Barkani et al. 2000) e *Ustilago maydis* (Arechiga-Carvajal et al. 2005), ou seja, mudanças biológicas específicas ocorreram frente as mudanças do pH, como a secreção de enzimas específicas e produção de metabólitos secundários diferenciados, sendo esses um importante mecanismo de sobrevivência.

As proteínas RAS são importantes componentes de sinalização em muitos microrganismos, envolvidas com a sensibilidade aos vários tipos de estresse, e sua ativação resulta em alterações no crescimento e virulência dos mesmos. De uma forma geral, as RAS estão vinculadas à moléculas de Guanosina Tri-Fosfato (GTP), que possuem a função de servir de substrato para a síntese de Ácido Ribonucléico (RNA), induzindo a mitogênese através da cascata da adenosina monofosfato (AMPc) que é um conhecido mensageiro celular intracitoplasmático e medidor de ações biológicas. Desse modo, as proteínas RAS estão ligadas a alterações na morfogênese de uma variedade de fungos. Em *S. sclerotiorum*, a herança no envolvimento dessas proteínas na ativação da esclerogênese via RAS-MAPK, que possui como um alvo nesta linha, o gene *smk1* e sua respectiva proteína Smk1. Sabe-se que o pH do meio também tem uma influência neste processo, isto é, a acidificação provocada pelo excesso de ácido oxálico secretado pelo fungo e a diminuição dos nutrientes no tecido do hospedeiro disparam a expressão do gene *smk1*, desviando a via de patogenicidade para a via de resistência esclerogênica. A concentração de AMPc elevada inibe a ativação da cascata da MAPK e de *smk1*, essenciais para a iniciação e maturação dos escleródios, sugerindo mais uma vez a importância dos níveis de Adenosina 5'- Monofosfato Cíclico dentro dos fatores de virulência deste fitopatógeno (Chen et al. 2004). Isolados mutantes de *S. sclerotiorum* com deleção de Adenilato Ciclase mostraram alterações tanto morfológicas quanto de patogenicidade (Jurick II et al. 2007).

Deficiências na via Proteína G – Adenilato Ciclase – AMPc – PKA reduzem drasticamente a patogenicidade e a virulência em diversos microrganismos. Uma análise interessante do envolvimento do AMPc na patogenicidade de *S. sclerotiorum* é a que relaciona esta molécula à síntese de um grupo de proteases, denominadas de Aspartil Proteases, entre elas a Aspartil Protease 1 (Acp1), que é produzida pelo fungo nos estágios iniciais de infecção na planta (Girard et al. 2004). Entretanto, o estudo do envolvimento direto dos níveis de AMPc com a síntese de Poligalacturonases em *S. sclerotiorum* ainda não está bem definido.

2.4.1. Produção de ácido oxálico

O ácido oxálico é um composto que pode ser encontrado na forma de ácido livre, em forma solúvel, como oxalato de sódio e potássio e, insolúvel, como oxalato de cálcio, que é frequentemente associado a desordens metabólicas e a doenças infecciosas (Guimarães; Stolz,

2004). Um grande número de fungos fitopatogenicos secreta o ácido oxálico incluindo as espécies *S. sclerotiorum* e *S. minor*.

É produzido por *S. sclerotiorum*, no tecido do hospedeiro e em meio de cultura, contribuindo com o decréscimo do pH de substratos alcalinos, espécies de *Sclerotinia* podem tolerar uma ampla faixa de pH, mas podem adaptar-se melhor ao substrato ácido (Willetts; Wong, 1980).

O ácido oxálico e as enzimas pectinolíticas estão associadas com o desenvolvimento da podridão branca causada por *S. sclerotioru.*, Ele penetra no tecido ao redor da lesão, reduzindo o pH de, aproximadamente, 6,8 para 4,0, fornecendo pH ótimo para a ação da enzima (Echandi; Walker, 1957). As diferenças na tolerância ao ácido e/ou a sua difusão no tecido do hospedeiro podem resultar em regiões de encharcamento variáveis ao redor das lesões (Tu; Beversdorf, 1982).

A produção do ácido durante a infecção altera o funcionamento da célula guarda, causando a abertura dos estômatos e avanço das hifas no tecido infectado (Guimaraes; Stolz, 2004).

O ciclo da monofosfatase de adenosina ciclíca (cAMP) tem fundamental importância na transição entre o crescimento micelial e o desenvolvimento do escleródio. Um incremento nos níveis endógenos e exógenos de (cAMP) inibe o desenvolvimento do escleródio, mas por outro lado, eleva o acúmulo de ácido oxálico produzido pela *S. sclerotiorum* no tecido da plantas.

2.5. Variabilidade do patógeno

A predição de estratégias sustentáveis de manejo de doenças é claramente dependente da compreensão do patógeno e da sua dinâmica populacional (Cook; Lees, 2004), pois estes fatores podem prever como as populações irão desenvolver respostas a diferentes estratégias de controle (Alfonso et al; 2000). Patógenos com maior potencial evolutivo impõem um maior risco de sobrepor os efeitos de genes de resistência do hospedeiro ou a desenvolvimento de resistência a fungicidas (McDonald et. al.; 2002).

O fungo *S. sclerotiorum* foi estudado por mais de 150 anos e muitas informações já foram geradas sobre sua biologia, sintomatologia, patogenicidade e morfologia. Entretanto, ainda se sabe pouco sobre seus aspectos genéticos (Arbaqui; Kraic; Huszár, 2008). Assim, a variabilidade quanto à agressividade entre isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja tem

sido muito demandada em estudos de melhoramento visando a resistência ao patógeno. (Kull; Pedersen, 2004). Contudo, o sucesso evolutivo dos fitopatógenos pode ser atribuído a vários fatores entre eles a alta capacidade em gerar diversidade permitindo uma vantagem seletiva imediata dentro de populações (Hammond-Kosack, 2000).

A estrutura genética pode ser usada para inferir o impacto relativo de diferentes forças que influenciam a evolução da população de patógenos. O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional dos fitopatógenos. Uma grande quantidade de diversidade genética distribuída sobre uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação por um patógeno a mudanças ambientais, novos genes de resistência no hospedeiro ou a fungicidas. Um alto grau de similaridade genética entre populações coletadas de região geográfica amplamente separada sugere ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico (McDonald et. al.; 1999).

No estudo de variabilidade genética dos fitopatógenos, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados como ferramentas auxiliares, proporcionando o complemento do estudo de diversidade e ampliando o conhecimento de outros aspectos que não envolvam somente a patogenicidade. O polimorfismo do DNA tem sido utilizado com sucesso na diferenciação de espécies e raças de vários fitopatógenos e, entre as vantagens apresentadas, destacam-se a rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (Goodwin et al., 2003).

Atualmente, não estão disponíveis cultivares de soja resistentes ao mofo branco, porém existem características morfológicas e fisiológicas da planta que ajudam a reduzir a incidência da mesma, como: arquitetura ereta, plantas precoces, resistentes ao acamamento, entre outros (Campos et al, 2010). A resistência genética da soja a mofo branco tem caráter poligênica (Castaño et al., 1993). Como o patógeno pode atacar todas as partes da planta, um genótipo que apresenta resistência a uma forma de ataque à planta pode apresentar suscetibilidade a outro mecanismo de ataque (Tourvielle; Vear, 1990). No entanto, o controle dessa doença envolve a adoção de medidas integradas, entre elas, está o controle químico, uma vez que alguns autores já relataram a sensibilidade de isolados de *S. sclerotiorum* a determinados fungicidas (Gindrat, 1993; Mueller et al., 2002).

2.6. Fungicidas para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

O uso de fungicidas pode ser necessário principalmente associado a outras medidas de controle. Hoje, o mofo branco na cultura da soja tem sido manejado com a associação de estratégias possíveis de minimizar os danos nas plantas por essa doença, denominado de manejo integrado (Campos et al, 2010). Entretanto, na prática, o controle químico para essa doença tem sido extremamente difícil, seja pela ausência de informações ou pela própria natureza do fungo, que pode sobreviver até 11 anos no solo (Farias Neto, 2011).

Campos et al. (2008) demonstraram que a eficácia do controle químico depende do princípio ativo utilizado, do número de aplicações, do momento da aplicação e da tecnologia utilizada. De acordo com os resultados de pesquisa já obtidos, melhor controle da doença tem sido verificado com fungicidas pertencentes aos grupos químicos dicarboximidas, benzimidazóis e fenilpirimidinamida.

Contudo, vale chamar a atenção para o manejo de resistência de fungos a fungicidas, pois a *Sclerotinia* sp é um fungo altamente adaptável, e a utilização de um manejo inadequado dos ingredientes ativos no controle da doença poderá induzir a seleção de isolados para a resistência a esses produtos. Para isso, aconselha-se a associação de medida de controle como, por exemplo: cultural, químico e biológico concomitantemente, além de realizar um rodízio entre os ingredientes ativos utilizados (Fundação Bahia, 2011).

Os organismos vivos possuem a capacidade de se adaptarem às condições do meio ambiente. Assim, a adaptabilidade dos fungos a certas moléculas de fungicidas pode ocorrer em função das condições impostas pelo próprio homem como, por exemplo, o uso de subdoses, uso do mesmo ingrediente ativo em aplicações contínuas, ou seja a falta de rotação das moléculas (Dekker, 1977).

O surgimento de fungos resistentes a fungicidas, que inicialmente eram eficientes no controle de algumas doenças, vem se tornando um sério problema. Até 1970, os casos de resistência a fungicidas, em condições de campo, limitavam-se a menos de 10 gênero de fungos, no entanto, a partir de 1977, com o uso mais frequente dos fungicidas sistêmicos, 64 gêneros de fungos resistentes a fungicidas já foram relatados (Delp, 1980).

A resistência de fungos aos benzimidazóis já foi detectada em muitas espécies fúngicas e é resultante da mutação do gene da β tubulina causando alteração na sequência de aminoácidos que determina ou não a resistência ao fungicida. (Mckay; CookK, 1997; Mckay et al., 1998). Porém, a resistência também pode ocorrer para outros grupos químicos, como os

triazóis, que já perderam a eficiência, de forma gradual, para o controle de alguns patógenos como *Sclerotinia homeocarpa* (Dollar Spot) (Golembiewski, 1993) e *Erysiphe graminis tritici* (Waard et al., 1986), entre outros. Segundo Sartori (2007), os fungicidas do grupo dos triazóis são considerados de moderado risco de resistência, ou seja, a velocidade de mudança de um organismo sensível se tornar resistente é determinada pela epidemiologia do próprio patógeno e a frequência ou duração da pressão de seleção aplicada.

Para *S. sclerotiorum* ainda são escassos os trabalhos, evidencia-se a perda de sensibilidade aos fungicidas comumente utilizados no seu controle em diferentes cultivos.

2.7. Caracterização molecular

Fungos fitopatogênicos são causadores de sérias doenças em plantas e são caracterizados pela sua maior complexidade e diversidade em relação a outros patógenos microbianos. Essa diversidade é salientada pela extraordinária gama de hospedeiros observada em alguns patógenos e a extrema especificidade de outros (Baker et al., 1997).

Estimar a diversidade genética de populações de patógenos em uma região é importante para compreender a epidemiologia da doença e estabelecer as estratégias usadas para o seu controle com fungicidas ou cultivares resistentes.

A análise da estrutura e dinâmica das populações de *S. sclerotiorum* representa uma parte essencial para o entendimento de como os mecanismos subjacentes estão envolvidos na história desse patógeno e em sua distribuição ao longo de diferentes áreas geográficas e plantas hospedeiras. Estudos sobre *S. sclerotiorum* revelaram um modo predominante de reprodução clonal (Kohn et al., 1991; Kohli et al. 1995; Cubeta et al., 1997; Carbone et al. 1999; Al Auclair et al. 2004). No entanto a troca genética ou recombinação é ocasional nas populações desse patógeno em culturas de canola (Sexton e Howlett, 2004; Sexton et al., 2006; Mert-Türk et al., 2007), soja (Kull et al., 2004) e alface (Malvárez et al., 2007), entre outras.

Devido à precisão, sensibilidade, praticidade e versatilidade, algumas técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas satisfatoriamente com a finalidade de detecção de patógenos, destacando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização de ácidos nucléicos (Jorge; Michereff, 2001).

A técnica de PCR foi descrita em meados da década de 80, e permite obter “in vitro” várias cópias de um determinado segmento de DNA. A utilização da PCR na detecção de fitopatógenos exige que sequências do genoma de vários isolados da mesma espécie e de

espécies relacionadas sejam conhecidas (Mullis; Faloona, 1987). A disponibilidade dessas sequências definirá as bases dos *primers* que serão utilizados. De um modo geral, deseja-se encontrar uma região do genoma que esteja conservada (região com alta homologia) em todos os isolados de uma dada espécie e que esteja ausente em espécies relacionadas. Em geral, *primers* específicos têm de 18 a 28 bases (Jorge; Michereff, 2001).

A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos filogeneticamente mais distantes. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, desse modo, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueados por segmentos conservados e relativamente curtos (500 a 800pb) e por aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (Fungaro 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUCLAIR J, BOLAND GJ, KOHN LM, RAJCAN I. Genetic interactions between Glycine max and Sclerotinia sclerotiorum using a straw inoculation method. **Plant Disease**, v. 88, p.891-895, 2004.

ALFONSO, C.R; RAPOSO, R.E; MELGAREJO, P. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouse in south eastern. Spain, **Plant pathology**, v. 49, p. 243-251, 2000.

ARBAOUI M, KRAIC J, HUSZAR J. Genetic variation of Sclerotinia sclerotiorum isolates from different conditions. **Pol'nohospodárstvo**, v. 54, p.36-39, 2008.

ARÉCHIGA-CARVAJAL, E. T.; HERRERA, J.R. The *RIM101/pacC* Homologue from the Basidiomycete *Ustilago maydis* Is Functional in Multiple pH-Sensitive Phenomena. **Eukaryotic Cell**, p. 999–1008, june 2005.

BAKER, S.N., OLIVIER, E., LEMON R.N. Task dependent coherent oscillations recorded in monkey motor cortex and hand muscle EMG. **Journal Physiol**, v. 501, p.225–241. 1997.

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

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

BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant Disease**. Saint Paul. v.71, p.934-936. 1987.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Lancaster. v. 11, n.7, p.1-16, 2006.

BROACH, J. R. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. **Trends Genet**. v. 7, p. 28–33, 1991.

BUDGE, S.P.; WHIPPS, J.M. Effect of sucrose concentration on sclerotia production and subsequent apothecial formation by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n.2, p. 195-198. 1991.

CAFÉ-FILHO, A.C. Alerta aos produtores de ervilha: Podridão de *Sclerotinia*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.3, p.57, 1985.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C. Manejo das principais doenças fúngicas da soja. **Atualidades Agrícolas**, São Bernardo dos Campos, v.5, n.2, p.20-28, ago.2005.

CAMPOS, H. D. ; SILVA, L.H.C.P. ; SILVA, J.R.C. ; MONTEIRO, F. . Effect of fungicides in the development of *Colletotrichum truncatum* in controlled conditions. In: **4 Top Ciência**, 2008, Heideberg - Germany. Top Ciência Basf. São Paulo : BASF The Chemical Company, v. 5. p. 1-2, 2008.

CARACUEL, Z., RONCERO, M.I.G, ESPESO,E.A, GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I., GARCÍAMACEIRA, F.I. and DI PIETRO, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*, **Molecular Microbiology** , v. 48, n.3, p. 765–779, 2003.

CARBONE, I. & KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous *ascomycetes*. **Mycologia**, v. 91, p.553-556, 1999.

CASTAÑO, F, V.F & TOUR, V. D. Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. **Euphytica**, v. 68, p. 85-98, 1993.

CESSNA, S.G., SEARS, V.E., DICKMAN, M.B., and LOW, P.S. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant, **The Plant Cell**, v. 12, p. 2191–2199, November 2000.

CHAVES, G.M. Estudos sobre *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experientiae**, Viçosa, v.4, n.2, p. 69-133, 1964.

CHEN, C., HAREL, A., GOROVOITS, R., YARDEN, O. and DICKMAN, M.B. MAPK Regulation of Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum* Is Linked with pH and cAMP Sensing, **MPMI**, v. 17, n. 4, p. 404–413, 2004.

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

CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos (safra 20010/2011)**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conaweb/safra/3graos-10.11.pdf>> Acesso em: 21 jan. 2012.

COTTON, P., KASZA, Z., BRUEL, C., RASCLE, C. and FÈVRE, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 163-169, 2003.

COOK, D.E.L & LEES, A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. **Plant pathology**, v.53, p. 692-704, 2004.

COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Wetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. **Phytopathology**. Saint Paul, v.65, n. 3, p. 250-255, 1975

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

DELP, C.J. Coping with resistance to plant disease control agent. **Plant Disease**, v. 64, p.652-657, 1980.

DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W.(ed). **Systemic fungicides**, 2 ed , London, Logeman, p. 176-197, 1977.

DILLARD, H.R.; LUDWIG, J.W.; HUNTER, J.E. Conditioning sclerotia os *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 79, v.4, p.411-415, 1995.

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

EL BARKANI, A., KURZAI, O., FONZI, W.A., RAMON, A., PORTA, A., FROSCH, M., and MÜHLSCHLEGEL, F.A. Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. **Molecular Celular Biology**., v. 20, p. 4635–4647, 2000.

FARIAS NETO, A.L. **Embrapa estuda manejo para controle do mofo branco**. Disponível em: <<http://www.reporternews.com.br/noticia.php?cod=268553>> Acesso em: maio de 2011.

FERREIRA, L.P; LEHMAN, P.S; ALMEIDA, A.M.R. Moléstias e seu controle. In: MIYASAKA, S.J; MEDINA, J.C. (eds.) **A soja no Brasil**. p.603-639, 1981.

FRAISSINET-TACHET, L., REYMOND-COTTON, R., FEVRE, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96–100, 1995.

FRAISSINET-TACHET, L.; FEVRE, M. (1996) Regulation by galacturônico acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**. V. 33, p. 49-53, 1996.

FUNGARO, M. H. P.; PRC na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 14, p. 12-16, 2000.

FUNDAÇÃO BAHIA. **Mofo branco e seu manejo no oeste Baiano**. Disponível em: <<http://www.fundacaoba.com.br/index.php?p=mofo-branco>>. Acesso em: maio de 2011.

GINDRAT, D. La sclérotiniose: sensibilité du *Sclerotinia sclerotiorum* au carbendazime et à la vinclozoline. *Revue Suisse D'Agriculture*, v.25, p.115-119, 1993.

GIORGIOU, C.D.; TAIRIS, N.; POLYCRATIS, A. Production of B-caroteno by *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in sclerotium differentiation. **Mycological Resease**. Cambridge, v.9, n.105, p 1110-1115, 2001.

GIRARD, V., FÈVRE, M., BRUEL, C. Involvement of cyclic AMP in the production of the acid protease Acp1 by *Sclerotinia sclerotiorum*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 227–233, 2004.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 37, p. 179-191, 1990.

GOLEMBIESKI, R.C.; VARGAS, J.M.; JONES, A.L. & DETWEILER, A.R.. Resistance of *Sclerotinia homeocarpa* to demethylation inhibitor fungicides. **Phytopathology**, v.83, p.1371, 1993.

GOODWIN, D.H., SCHÖNE, B.R., DETTMAN, D.L. Resolution and fidelity of oxygen isotopes as paleotemperature proxies in bivalve mollusk shells: models and observations. **Palaios** 18 (2), 110–125, 2003.

GÖRGEN, C.A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* '1306'**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, 2009.

GUIMARÃES, R.L. & STOTZ, H.U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**. v. 136, p. 3703-3711. 2004.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W., JONES, R. (Ed.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 21, p. 1102-1157.

HANCOCK, J. G. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. **Phytopathology**, v. 56, p. 975-979, 1966.

HOMECHIN, M. **Antagonismo do fungo *Trichoderma* sp., sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, "IN VITRO"**. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa de soja 1981/82. Londrina, 1982. p.213-215.

HUANG, H.C & KOZUB, G.C. Longevity of normal and abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.12, p. 1164-1166, 1994.

HUANG, H.C; Morphologically abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.28, p87-91, 1983.

JORGE, S.; MICHEREFF, R.B. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p..

JURICK II, W.M. & ROLLINS, J.A. Deletion of the adenylate cyclase (*sac1*) gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 521–530, 2007.

KASZA, Z., VAGVÖLGYI, C., FÉVRE, M., COTTON P. Molecular Characterization and in planta Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* Endopolygalacturonase Genes. **Current Microbiology**, v. 48, p.208-213, 2004.

KOHN, L.M. A monographic of the genus *Sclerotinia*. **Mycotaxon**. v. 9, p. 365-444. 1979.

KOHN, L.M., STASOVISKI, E.; CARBONE, F.; ROYER, J.; Mycelial incompatibility and molecular marker identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v. 81, p. 480-485, 1991.

KOHLI, Y.; BRUNNER, L.J.; YOELL, H.; MILGROON, M.G. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology**. v. 4, p. 69-77, 1995.

KRUGNER, T. L.; BACHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A. ; KIMATI, H. ; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. Cap.19, p. 46-95.

KULL, L.S.; PEDERSON, W.L.; PALMQUIST, D.; HARTMAN, G.L. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v.88, p. 325-332, 2004.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Lancaster. 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, 2005. 3p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 76).

LU, G. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, n. 12, p. 509-516. 2003.

MALVÁREZ M, CARBONE I, GRÜNWALD NJ, SUBBARAO KV, SCHAFER M and KOHN LM. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology**, v. 97, p.470-483, 2007.

Mc DONALD, B.A; LIND, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, p.163-180, 2002.

Mc DONALD, B.A; ZHAN, J.; BURDON, J.J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**. v. 89, p.639-645, 1999.

McKAY, G.J. & COOK, L.R. A PCR – based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, v.152, p. 371-378, 1997.

McKAY, G.J.; EGAN, D.; MORRIS, E. & BROWN, A.E. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotrium dendroides* using PCR based method. **Mycological Research**, v.102, n.6, p.671-676, 1998.

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

MERT-TÜRK, F.; IPEK, M.; MERMER, D.; NICHOLSON, P. Microsatellite and morphological marker reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. **Journal Phytopathol.** v. 155, p. 182-187, 2007.

NASSER, L.C.B.; ANJOS, J.R.N.; PERES, J.R.R.; MEDEIROS, A.C.S.; SPEHAR, C.R.; UIBEN FILHO, G.; SOUSA, P.I.M. **Fungicidas para tratamento de sementes de soja**. Planaltina; Embrapa cerrados, 1984, 6p. (comunicado técnico 40).

NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION, **The NCBI Taxonomy Homepage**. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>. Acesso dia 25 de novembro de 2011.

NATTI, J.J. Epidemiology and control of bean white mold. **Phytopathology**. Saint Paul. V.61, p-669-674, 1978.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual **Review of Phytopathology**. v. 23, p. 97-127. 1985.

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

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** , v. 28, p. 123-130, 2003.

ROCHA, R.P. **Manejo da podridão de sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007

ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*; identification of a pacC/RIM1 homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 67, p. 75-81. 2001.

ROLLINS, J.A. The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. **MPMI**, v. 16, n. 9, p. 785–795. 2003.

SARTORI, J.E. **Avaliação da sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas**. 2007. 59f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007.

SEXTON, A.C. & HOWLETT, B.J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Curr Genet**, v. 46, p. 357–365, 2004.

SEXTON, A. C.; WHITTEN, A.R.; HOWLETT, B. J. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in na Australian canola Field at flowering and Stern-infection stages of the didisease cycle. **Genome**. v. 49, p. 1408-1415, 2006

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

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. White Mold. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORSALES, M.A. (ed.). Bean production problems in the tropics. 2. ed. Cali: CIAT, 736 p. 1989.

SUTTON, D.C.; DEVERAL, B.J. Studies on enfection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**. Oxford, v.32, p. 251-261, 1983.

STEADMAN, J.R. White mold – a serius yield-limiting desease of bean. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 67, n.4, p. 346-350, 1983.

TOURVIEILLE D, VEAR F. Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers. III: Study of reaction to artificial infections of roots and cotyledons. **Agronomie**. v. 10, p. 323-330, 1990.

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

VIEIRA, R. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFU, p. 231, 1988.

VIEIRA, R. O mofo branco do feijoeiro – Feijão no inverno. **Informe Agropecuario**. Belo Horizonte, v. 17, n. 178. P. 54-63, 1994.

VENETTE, J. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. IN: **Proceedings of the sclerotinia. Workshop**. North Dakota State University. 21 de janeiro de 1998. Fargo North Dakota. USA, 1998.

VRIES, R.P. and VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, p. 497–522, December 2001.

WAARD, M.A.de; KIPP, E.M.C.; HORN, N.M. & NISTELROOY, J.G.M.van. Variation in sensitivity to fungicides wich inhibit ergosterol biosynthesis in wheat powdery mildew. **Neth. J. Plant Pathol.**, v.92, p.21-23, 1986.

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

WONG, J.A.L.; WILLETTS, H.J. Polycrylamide-gel electrophoresis of enzymes during morphogenesis of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of General Microbiology**. London, v. 81, p.101-109, 1974.

ZUPPINI, A., NAVAIZIO, L., SELLA, L., CASTIGLIONI, C., FAVARON, F., and MARIANI, P. An Endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* Induces Calcium-Mediated Signaling and Programmed Cell Death in Soybean Cells, **MPMI**, v. 18, n. 8, 2005, p. 849–855, 2005.

CAPÍTULO I

SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* PROVENIENTES DE SOJA

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito de fungicidas sobre o crescimento miceliano de diferentes isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, proveniente de plantas de soja infectadas nos municípios de Jataí – GO; Montividiu – GO; Goianapolis – GO; Água Fria – GO; Mauá da Serra – PR; Roda Velha – BA e Rosário - BA, um experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde-GO. O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos por dez fungicidas, em três doses: fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol; carbendazim; tiofanato-metílico; fluazinam; boscalida; procimidona; fluazinam + tiofanato metílico; pentiopirade; fluopiran; fluodioxonil + metalaxil e uma testemunha sem fungicida. Os fungicidas foram adicionados em meio BDA e vertidos em placas de petri de 80 mm de diâmetro. Em seguida, discos de 5 mm contendo micélio foram acondicionados no centro da placa e incubadas a 24°C na ausência de luz. O crescimento miceliano (diâmetro da colônia) foi avaliado a cada 24 horas. A partir desses dados, foram calculados a áreas abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano e a velocidade de crescimento miceliano. A produção de escleródios (peso e número) foi avaliada aos 21 dias de incubação. Os tratamentos contendo os fungicidas fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol, carbendazim, procimidona, tiofanato-metílico, fluazinam, fluazinam + tiofanato-metílico e fluodioxonil + metalaxil não permitiram o crescimento miceliano dos isolados de *S. sclerotiorum* utilizados. Os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran proporcionaram o crescimento miceliano de todos os isolados de *S. sclerotiorum*. Os fungicidas boscalida e pentiopirade, independente da dose proporcionaram, exceto para o isolado Mauá da Serra, produção de escleródios em todos os isolados testados. O tratamento contendo fluopiran proporcionou a formação de escleródios apenas nos isolados de Montividiu – GO, independente da dose e Rosário – BA, na maior dose avaliada.

Palavras-chave: Mofo branco; *Glycine max*; controle químico

SENSITIVITY OF *Sclerotinia sclerotiorum* ISOLATES THE FUNGICIDES

ABSTRACT

Targeting study the effect of fungicides on the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* from different isolated from soybean plants infected of regions of Jataí-GO; Montividiu-GO; Goianapolis – GO; Água Fria – GO; Mauá da Serra – PR; Roda Velha – BA and Rosario-BA, an experiment was conducted in the laboratory of plant pathology at the University of Rio Verde-GO. The experimental design was entirely random, with 11 treatments and four repetitions. The treatments were composed of ten fungicides, in three doses: mefenoxan + decision + thiabendazole; carbendazim; thiophanate methyl; fluazinam; boscalid; procymidone; fluazinam + thiophanate methyl; penthiopyrad; fluopyran; fluodioxonil + metalaxyl and a witness without fungicide. They were added in the middle in pouring and BDA petri dishes of 80 mm in diameter. Then 5 mm discs containing mycelium was wrapped in the center of the plate and incubated at 24° C in the absence of light. Mycelial growth in diameter of the colony, was assessed at each 12:0 am. After determined the area under the curve of growth progress and mycelial of index growth speed of production mycelial sclerotium (weight and number) was obtained on 21 days of incubation. Treatments containing fungicides decision + mefenoxan + thiabendazole, procymidone, carbendazim, thiophanate methyl, fluazinam, fluazinam + thiophanate methyl and fluodioxonil + metalaxyl allowed the mycelial growth of *S. sclerotiorum* isolates used. The fungicides boscalid, penthiopyrad and fluopyran provided the mycelial growth of all isolates of *S. sclerotiorum*. The fungicides boscalid and penthiopyrad, regardless of the dose provided, except for the isolated Mauá da Serra, production of sclerotium in all tested isolates. The treatment gave the formation of fluopyran containing sclerotium only in isolated Montividiu - GO, regardless of dose and Rosario – BA, in higher doses evaluated.

Keywords: White mold; *Glycine max*; chemical control

1. INTRODUÇÃO

Em função dos danos proporcionados, o mofo branco ou podridão branca da haste causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary tem se destacado nas principais regiões produtora nos estados de GO, MS, MG, BA, SP, PR, SC, RS e MT. No entanto, as perdas nas áreas de Cerrado têm variado a cada safra. No início da década de 90, sob condições climáticas favoráveis à doença, as perdas chegavam a 20% na cultura (Cardoso, 1994). No final da mesma década, essas perdas já atingiam 30% (Nasser et al., 1999; Nasser & Spehar, 2001). A partir da safra 2004/2005, em lavouras do Sudoeste de Goiás, com alta pressão de inóculo (escleródios) e associada às condições climáticas favoráveis, as perdas na produção de grãos ultrapassaram a 40% (Campos et al., 2008; Meyer & Campos, 2009).

Atualmente, não há disponibilidade de cultivares de soja resistente a *S. sclerotiorum*, com isso, a maioria das medidas são preventivas, devendo adotar sementes certificadas, rotação de culturas com gramíneas, espaçamento e população de plantas adequadas, uso de fungicidas em tratamentos de semente e parte aérea. O uso de fungicida em parte aérea deve ser associado a outras estratégias de manejo e tem sido necessário em áreas já com a presença do inóculo, ou seja, com histórico na doença.

Até o momento, apenas os fungicidas tiofanato metílico, fluazinam, procimidona e fluazinam + tiofanato metílico apresentam registrado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (<http://www.agricultura.gov.br/>), para o controle do mofo branco na cultura da soja. Essa limitação de produtos pode impossibilitar a recomendação de programa de aplicação mais efetivo, além de proporcionar riscos da perda de sensibilidade do fungo ao fungicida. Sendo que esses princípios ativos já eram recomendados em outras culturas visando ao controle do mesmo patógeno (Vieira, 1994; Reis et al., 2010). No entanto, em outros países, menor sensibilidade de *S. sclerotiorum* a diferentes fungicidas já foi evidenciada, conforme demonstrado para os fungicidas carbendazim e boscalida (Hui-Xia et al., 2010), iprodione (Liu et al., 2009) e benomyl (Attanayake et al., 2009).

Nas últimas safras de soja no Brasil, há relatos em regiões que alguns princípios ativos utilizados têm apresentado menor eficácia de controle da doença, sendo que, em anos anteriores, essa eficácia era satisfatória. Assim, o presente experimento teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* a fungicidas, através do crescimento miceliano e produção de escleródios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde, no período de Outubro de 2010 a Outubro de 2011. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em quatro repetições. No período, o ensaio foi repetido duas vezes. Os tratamentos utilizados foram 10 ingredientes ativos de fungicidas em três doses distintas e uma testemunha sem fungicida. (Tabela 1).

Tabela 1. Ingrediente ativo (i.a.), produto comercial (p.c.), concentração (g i.a.L⁻¹ ou Kg⁻¹ do produto comercial) e doses (mg i.a.mL⁻¹ de meio de cultura) utilizadas no ensaio *in vitro* para diferentes isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamentos (i.a)	Produto Comercial	Concentração	Dose 1	Dose 2	Dose 3
1- Testemunha	---	---	0,000	0,000	0,000
2- fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol	Maxim Advanced	25+10+150	0,139	0,092	0,046
3- carbendazim	Bendazol	500	2,500	1,562	0,625
4- tiofanato metílico	Cercobin	500	2,500	1,562	0,625
5- fluazinam	Forwcide	500	2,000	1,250	0,500
6- boscalida	Cantus	500	2,500	1,562	0,625
7- procimidona	Sumilex	500	2,500	1,562	0,625
8- fluazinam + tiofanato metílico	Frowncide + Cercobin	500+500	7,500	4,700	1,875
9- pentiopirade	LEM-17	500	0,500	0,310	0,130
10- fluopiran	Verango	200	2,500	1,562	0,625
11- fludioxonil + metalaxil	Maxin XL	25+10	0,017	0,012	0,007

2.1. Obtenção dos isolados

Foram utilizados sete isolados de soja provenientes dos municípios de Montividiu – GO, Água Fria – GO, Goianápolis – GO, Jataí – GO, Rosário – BA, Roda Velha – BA e Mauá da Serra – PR (tabela 2). Como inóculo inicial, amostras de escleródios foram obtidas, aleatoriamente, de plantas colonizadas pelo patógeno em lavouras de soja infestadas naturalmente. Em seguida, os escleródios foram acondicionados em recipientes de vidro, lacrados, identificados e acondicionados em temperatura de 26°C.

Tabela 2. Identificação dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes de soja

Isolados	Estado	Município	Safra	Altitude	Coordenadas
1	GO	Montividiu	2010/2011	921	S 17°25'28,0" W51°40'0,95"
2	GO	Água Fria	2010/2011	891	S14°57'54,8" W47°46'08,1"
3	GO	Goianápolis	2010/2011	973	S 16°27'52,3" W49°00'37,70"
4	GO	Jataí	2009/2010	741	S17°53'49,01" W51°42'57,61"
5	BA	Rosário	2010/2011	477	S10°11'02,30" W38°59'02,34"
6	BA	Roda Velha	2008/2009	744	S12°41'36,51" W45°49'23,55"
7	PR	Mauá da Serra	2009/2011	1091	S23°54'26,52" W51°11'29,09"

2.2. Preparo do inóculo

Os escleródios foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto, lavados em água destilada esterilizada por três vezes em sequência e secados em papel esterilizado. Em seguida, com o auxílio de bisturi, os escleródios foram seccionados longitudinalmente e transferidos para placas de Petri de 80 mm de diâmetro (Ø), contendo meio BDA (batata, dextrose e agar, contendo antibiótico). As placas contendo partes de escleródios foram mantidas em câmara do tipo BOD com temperatura de 24°C e na ausência de luz. Após a germinação, miceliogênica dos escleródios, discos de 5 mm Ø contendo micélio foram retirados da borda da colônia e transferidos para meio de cultura BDA e mantidos por um período de até 5 dias, em função da velocidade de crescimento de cada isolado.

2.3. Instalação do experimento

Para instalação do experimento, de cada isolado, foram utilizadas placas de Petri de 80 mm Ø. Após adicionar o meio de cultura BDA, já com a dose do ingrediente ativo do fungicida (Tabela 1), um disco de 5 mm Ø de meio contendo micélio foi depositado no centro da placa. Em seguida as placas foram mantidas em câmara tipo BOD a 24°C e na ausência de luz.

2.4. Avaliações

Decorridas as 24 horas de incubação das placas, foi realizada a primeira avaliação, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos para obter-se a média do crescimento miceliano diária. As demais avaliações foram realizadas no mesmo intervalo de tempo,

totalizando 8 avaliações. Logo após calculou-se, a área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACPCM), o índice de velocidade do crescimento miceliano (IVCM) e a produção de escleródios.

Para o cálculo da AACPCM, utilizou-se a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977) e adaptada por Sartorato (2006), sendo utilizada a seguinte equação:

$$AACCM = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

Onde, Y_i é o diâmetro da colônia (valor em cm) na i ésima observação; X_i é o tempo (horas ou dias) na i ésima observação e n é o número total de observações.

O cálculo do índice de velocidade do crescimento miceliano (IVCM) foi realizado com base na fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$IVCM = \Sigma [(D - D_a)/N]$$

Sendo: D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de horas ou dias após a inoculação.

Para avaliar a capacidade de produção de escleródios, os tratamentos que proporcionaram o crescimento miceliano foram mantidos em incubação nas mesmas condições por 21 dias, então os escleródios produzidos em cada tratamento foram quantificados e pesados.

Para a interpretação dos dados, foram realizadas análises de variância e o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para diferenciação das médias, com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Os tratamentos que apresentaram significância estatística entre doses foram submetidos à análise de regressão, visando obter melhor interpretação do efeito de doses, com auxílio do programa Sigmaplot (Sigmaplot, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as avaliações de crescimento miceliano, os resultados evidenciaram crescimento de todos os isolados de forma homogênea no meio sem fungicida, havendo, no entanto, diferenças no número de dias necessários para o preenchimento completo da placa com o micélio do fungo. Os isolados de Jataí – GO, Mauá da Serra – PR e Roda Velha – BA

apresentaram crescimento máximo no terceiro dia após a instalação do ensaio, consequentemente, maiores IVCm. Os isolados de Água Fria – GO e Montividiu – GO, no quarto dia; o isolado de Goianópolis – GO, no quinto dia e o isolado de Rosário – BA, no sexto dia após a instalação do ensaio, apresentando menores IVCm (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo (dias) para o crescimento miceliano máximo na placa contendo meio BDA e índice de velocidade do crescimento miceliano – IVCm (cm.dia^{-1}) para os isolados avaliados

Nº do Isolado	Município	Estado	Tempo (dias)	IVCM
1	Água Fria	Goiás	quatro	2,00
2	Jataí	Goiás	três	2,67
3	Mauá da Serra	Paraná	três	2,67
4	Montividiu	Goiás	quatro	2,00
5	Roda Velha	Bahia	três	2,67
6	Rosário	Bahia	seis	1,33
7	Goianópolis	Goias	cinco	1,60
CV				

Mueller et al. (2002), Garcia et al. (2010) e Campos (2011) evidenciaram a colonização total de placas contendo apenas meio BDA, num período de 72 horas, utilizando isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Ao avaliar o efeito dos fungicidas sobre o crescimento miceliano em cada isolado utilizado e com base na AACPCM, observou-se que, os tratamentos contiam os fungicidas fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol; carbendazim; tiofanato metílico; fluazinam; procimidona; fluazinam + tiofanato metílico e fludioxonil + metalaxil, inibiram completamente o crescimento de todos os isolados de *S. sclerotiorum*. No entanto, os tratamentos com boscalida, pentiopirade e fluopiran proporcionaram crescimento miceliano do patógeno (Figura 1).

Campos (2011) ao utilizar os fungicidas fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol, carbendazim, tiofanato-metílico, fluazinam, fluazinam + tiofanato-metílico e fludioxonil + metalaxil, também constatou que os mesmos não permitiram o crescimento miceliano de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Já Garcia et al. (2010) observaram inibição do crescimento miceliano utilizando o fluazinam em doses a partir de $0,1 \mu\text{g i.a. mL}^{-1}$, enquanto que os fungicidas procimidona e

carbendazim nas doses a partir de $1,0 \mu\text{g i.a. mL}^{-1}$, e tiofanato metílico na dose a partir de $10 \mu\text{g i.a. mL}^{-1}$.

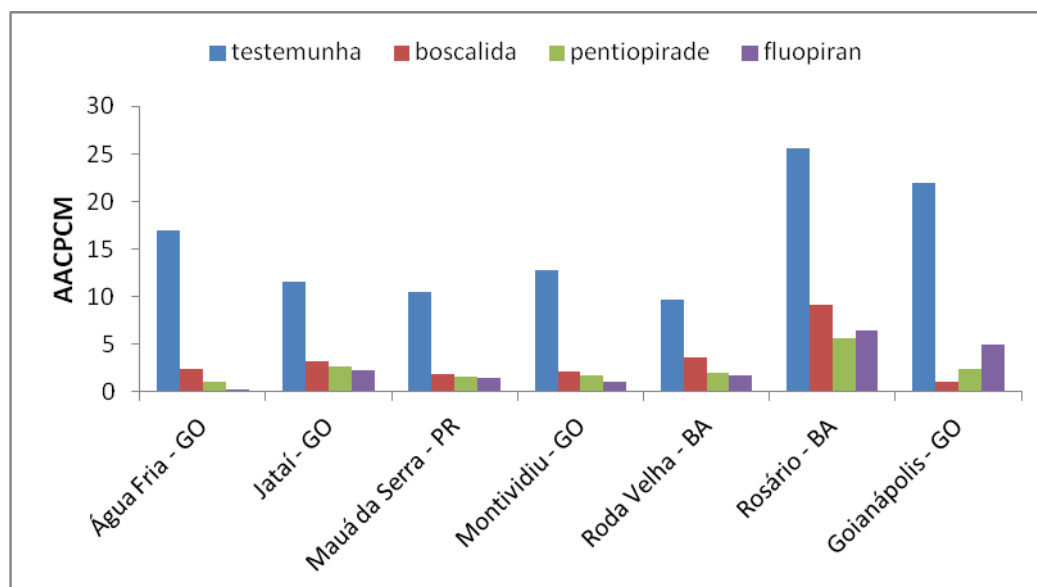


Figura 1. Área abaixo da curva de progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para cada isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, em meio de cultura contendo ou não os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopirán.

Iqbal et al. (2003), ao testarem diferentes fungicidas, observaram inibição completamente do crescimento e da germinação dos escleródios nas doses de 50 e 100 ppm, dos fungicidas comerciais benomil, metalaxil + mancozebe, thiabendazol, tiofanato metílico.

Considerando os tratamentos contendo os fungicidas que proporcionaram o crescimento miceliano e com base na AACPCM, após análise individual de cada isolado de *S. sclerotiorum*, verificaram-se diferenças significativas entre as doses dos fungicidas pentiopirade e fluopirán para o isolado de Água Fria – GO (Tabela 4). Embora o fungicida boscalida tenha proporcionado maior AACPCM na dose intermediária (dose 2), não foi caracterizado como efeito de dose. Para pentiopirade na menor dose (dose 3), houve maior crescimento miceliano. O fungicida fluopirán na dose intermediária (dose 2) e menor (dose 3) proporcionou maiores valores de AACPCM em relação à dose recomendada (dose 1).

Tabela 4. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado do município de Água Fria – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
Testemunha	16,9a	16,9a	16,9a	12,50*
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
Carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
Boscalida	1,73a	3,18a	2,23a	
Fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
Procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
Pentiopirade	0,00a	1,13b	2,01c	
Fluopiran	0,00a	0,48b	0,46b	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

Através da análise de regressão para o IVCm, os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran mostraram redução significativas do crescimento miceliano com o aumento da dose do fungicida, sendo assim, foram ajustadas as equações quadráticas com coeficiente de determinação de 76,62%, 85,65% e 86,37% para os fungicidas boscalida (Figura 2A), pentiopirade (Figura 2B) e fluopiran (Figura 2C), respectivamente.

Em relação à produção de escleródios, apenas os tratamentos que contiam os fungicidas boscalida e pentiopirade proporcionaram formação de escleródios (Tabela 5). O maior número e peso de escleródios foi verificado com a dose intermediária de boscalida (dose 2) e menor dose de pentiopirade (dose 3). O fungicida fluopiran não proporcionou a formação de escleródios até o final do período de avaliação, 21 dias (Tabela 5).

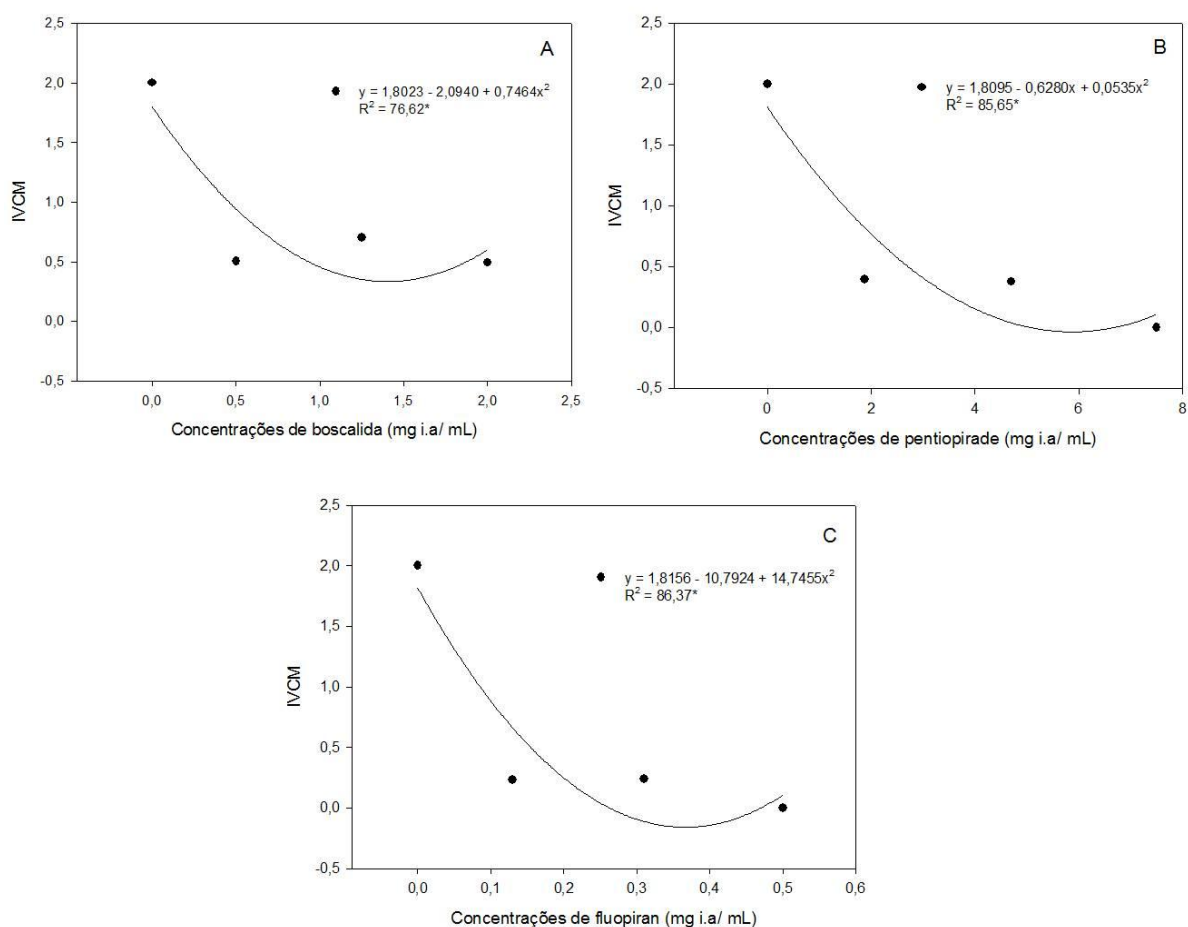


Figura 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia⁻¹) com o isolado de Água Fria – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A); pentiopirade (B) e fluopiran (C), em funções das doses utilizadas.

Tabela 5. Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Água Fria – GO, aos 21 dias em meio de cultura contendo fungicidas

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	26,00a	26,00a	26,00a		0,48a	0,48a	0,48a	
fludioxonil+mefenoxan	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
+tiabendazol								
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	8,75a	18,00b	10,50a		0,12a	0,18a	0,13a	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	74,30	0,00a	0,00a	0,00a	50,69
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	13,25a	14,50ab	20,25c		0,19 ^a	0,19a	0,22a	
fluopiran	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fluazinam+tiofanato	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
metílico								
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Para o isolado de Jataí – GO, houve diferenças significativas entre as doses dos fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran (tabela 6). Os fungicidas boscalida e pentiopirade proporcionaram maior AACPCM na menor dose (dose 3). Já o fungicida fluopiran na menor dose (dose 3) proporcionou menor valor de AACPCM em relação a dose intermediária (dose 2) e a recomendada (dose 1).

Tabela 6. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado do município de Jataí – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
Testemunha	11,63a	11,63a	11,63a	9,87
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	2,50a	3,12b	3,88c	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	2,41a	2,46a	3,24b	
fluopiran	2,64b	2,47b	1,90a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

Pela análise de regressão, utilizando o IVCm, observou-se aumento do crescimento miceliano do isolado proveniente de Jataí com a redução de doses dos fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran. Sendo ajustados às equações quadráticas com coeficiente de determinação de 90,06%, 93,00% e 83,26% para os fungicidas boscalida (Figura 3A), pentiopirade (Figura 3B), e fluopiran (Figura 3C), respectivamente.

Os tratamentos contendo os fungicidas boscalida e pentiopirade proporcionaram formação de escleródios (Tabela 7). Maior número e peso de escleródios foi verificado com a dose intermediária de boscalida (dose 2) e menor dose de pentiopirade (dose 3). O fungicida fluopiran não proporcionou a formação de escleródios até o final do período de avaliação, 21 dias (Tabela 7).

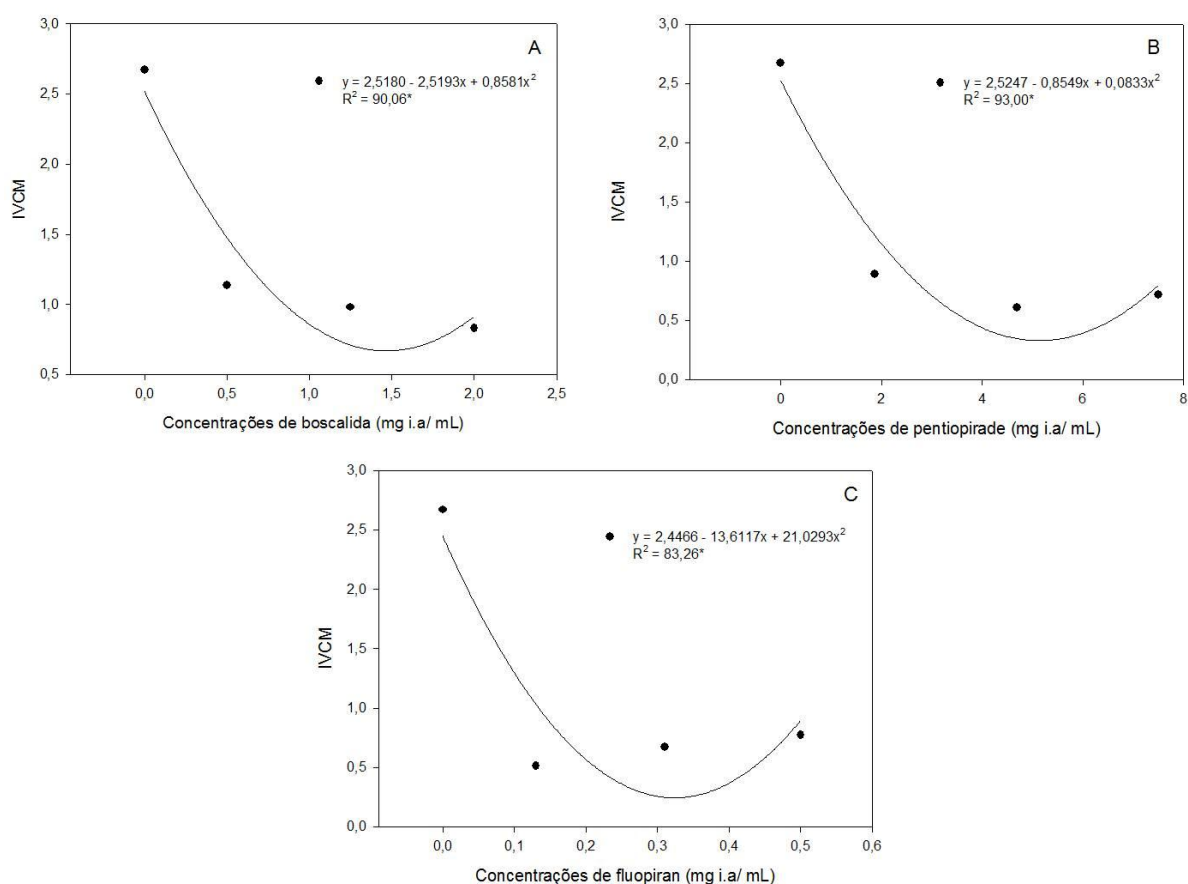


Figura 3. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia) como o isolado de Jataí – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A); pentioprade (B) e fluopiran (C), em funções das doses utilizadas.

Tabela 7. Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Jataí – GO, aos 21 dias em meio de cultura contendo fungicidas

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	28,5a	28,5 ^a	28,5a		0,50a	0,50a	0,50a	
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	3,75a	11,75b	5,25a	61,45	0,03a	0,10b	0,04a	2,50*
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
pentioprade	10,00ab	9,00a	14,00b		0,12a	0,10a	0,19b	
fluopiran	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

Para o isolado de Goianópolis – GO, houve aumentos significativos da AACPCM com a redução de doses do fungicida boscalida. Os fungicidas pentiopirade e fluopiran não apresentaram incrementos de crescimento miceliano com redução de doses (tabela 8). Em relação ao IVCm, verificou-se, pela análise de regressão, redução de crescimento miceliano através do aumento da dose dos fungicidas boscalida e fluopiran (Figuras 4A e 4B), sendo os valores ajustados pelas equações quadráticas com coeficiente de determinação de 71,94 e 91,68% para os fungicidas boscalida e fluopiran, respectivamente. O fungicida pentiopirade não apresentou diferenças significativas para IVCm, entre as doses avaliadas.

Tabela 8. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) para o isolado proveniente do município de Goianópolis – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
Testemunha	21,96a	21,96a	21,96a	14,81*
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	0,00a	1,16a	2,05b	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	1,95a	2,03a	3,04a	
fluopiran	4,90a	4,91a	5,23a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

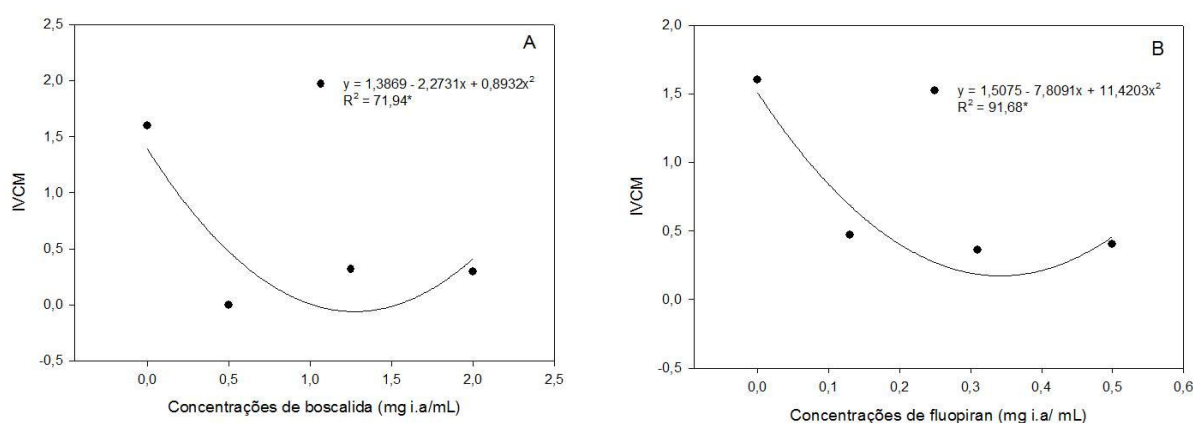


Figura 4. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia) como o isolado de Goianópolis – GO, para os tratamentos contendo fungicidas boscalida (A) e fluopiran (B), em funções das doses utilizadas.

Os fungicidas boscalida e fluopiran não proporcionaram a produção de escleródios até aos 21 dias pelo fungo. Já o fungicida pentiopirade, independente da dose, proporcionou formação de escleródios, porém não foi evidenciado aumento no número ou peso de escleródios com a redução de doses (Tabela 9).

Tabela 9. Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Goianapolis – GO, aos 21 dias em meio de cultura contendo fungicidas

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	20,50a	20,50a	20,50a		0,45a	0,45a	0,45a	
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	0,00a	0,00a	0,00a	45,43	0,00a	0,00a	0,00a	42,28
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	5,75b	3,7a	6,50b		0,06a	0,08a	0,06a	
fluopiran	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

Para o isolado de Mauá da Serra – PR, apenas o fungicida pentiopirade na menor dose proporcionou aumento significativo da AACPD, ou seja, crescimento miceliano com a redução de dose (Tabela 10). Para os demais fungicidas, não houve alterações significativas no crescimento miceliano desse isolado de *S. sclerotiorum*, embora o fungicida boscalida tenha apresentado maior AACPD com a dose intermediária, não pode ser evidenciado efeito de dose no crescimento miceliano do fungo.

Tabela 10. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Mauá da Serra – PR

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
testemunha	10,43a	10,43a	10,43a	17,68
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	1,81ab	2,22b	1,70a	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	1,61a	1,38a	1,91b	
fluopiran	1,46a	1,66a	1,30a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

Em relação ao IVCN, verificou se, pela análise de regressão, redução significativa do crescimento miceliano através do aumento da dose do fungicida pentiopirade (figura 5A). Já o fluopiram apresentou menor crescimento miceliano com a menor dose, embora tenha sido significativo pela análise de regressão, a equação quadrática se ajustou em 85,48% ao efeito de dose (Figura 5B). O fungicida boscalida não apresentou diferenças significativas para IVCN, entre as doses avaliadas.

Quanto a produção de escleródios, verificou-se que o isolado proveniente do município de Mauá da Serra – PR, não apresentou formação dos mesmos em nenhum tratamento contendo fungicida.

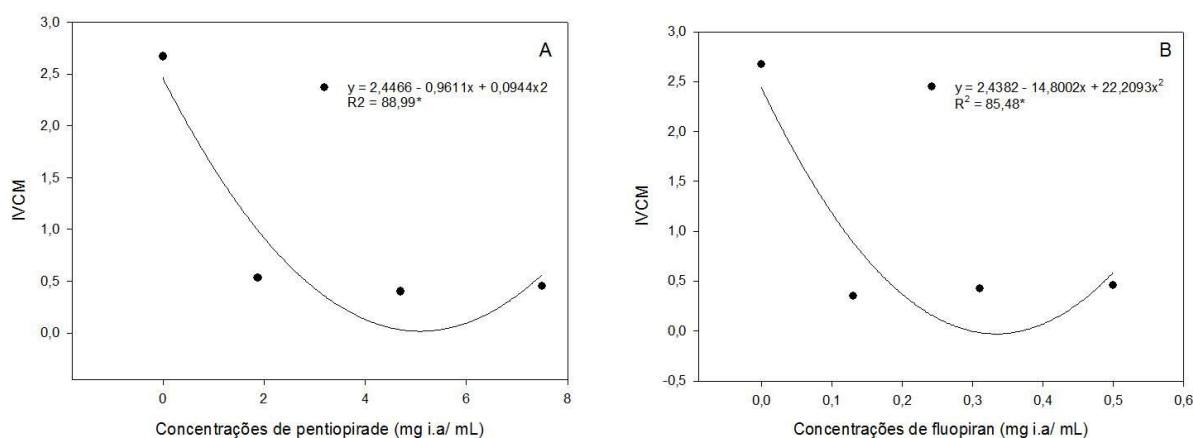


Figura 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia) como o isolado de Mauá da Serra – PR, para os tratamentos contendo fungicidas pentiopirade (A) e fluopiran (B), em funções das doses utilizadas

Para o isolado de Montividiu – GO, o fungicida boscalida na dose intermediária proporcionou maior crescimento miceliano, expresso pela AACPCM, diferindo da dose 1 e 3 que se mostraram iguais estatisticamente (Tabela 11). No entanto, pentiopirade e fluopiran proporcionaram maior crescimento miceliano na menor dose. Ao avaliar o IVCm, verificou-se que apenas o tratamento contendo o fungicida fluopiran apresentou significativamente maior índice com a redução de dose e se ajustou à equação quadrática em 92,93% (Figura 6).

Tabela 11. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Montividiu – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
testemunha	12,73a	12,73a	12,73a	28,11
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	1,40a	3,35b	1,73a	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	0,76a	1,81b	2,55c	
fluopiran	0,43a	0,70a	2,15b	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

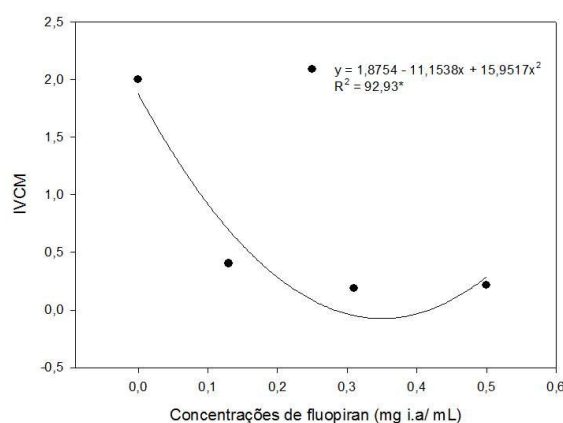


Figura 6. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia) como o isolado de Montividiu – GO, para os tratamentos contendo fungicidas fluopiran, em funções das doses utilizadas.

Quanto à produção de escleródios do isolado *S. sclerotiorum*, provenientes do município de Montividiu, verificou-se que os fungicidas boscalida e fluopiran proporcionaram maior número de escleródios na menor dose. Para pentiopirade foram evidenciadas tendências

de indiferenças na quantidade de escleródios com a redução de doses (Tabela 12). Não houve incrementos no peso de escleródios com a redução de doses dos fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran (Tabela 12).

Tabela 12. Número e peso de escleródios produzidos pelo isolado proveniente do município de Montividiu – GO, aos 21dias em meio de cultura contendo fungicidas

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	41,75a	41,75a	41,75a		0,42a	0,42a	0,42a	
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	10,50a	16,00ab	21,00b	34,69*	0,21a	0,24a	0,22a	4,20*
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	16,50ab	24,50b	16,25a		0,20a	0,29b	0,22a	
fluopiran	13,20a	13,91 ^a	23,46b		0,03a	0,03a	0,05a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

Para o isolado de Roda Velha – BA, a maior dose (dose 1) do tratamento contendo boscalida proporcionou menor crescimento miceliano expressado pela AACPCM em relação as menores doses (tabela 13). Os fungicidas pentiopirade e fluopiran proporcionaram menor AACPCM nas maiores doses, entretanto, este fato, não condiz com a realidade de ação dos fungicidas, assim os fungicidas pentiopirade e fluopiran não devem apresentar efeito de doses sobre o crescimento miceliano deste isolado.

Ao avaliar o IVCm para o isolado proveniente de Roda Velha, verificou-se que o fungicida boscalida apresentou redução significativa com a menor dose, sendo ajustadas pela equação quadrática em 81,12% (Figura 7). Os demais fungicidas que proporcionaram o crescimento miceliano do isolado não apresentaram efeitos significativos no IVCm pela redução de dose.

Tabela 13. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Roda Velha – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
testemunha	9,70a	9,70a	9,70a	6,66*
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	2,65a	4,10b	4,20b	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
penthiopirade	2,12b	2,27b	1,63a	
fluopiran	1,90b	2,18b	1,15a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

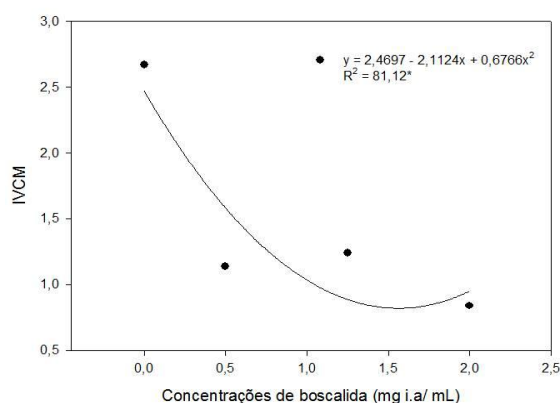


Figura 7. Índice de velocidade de crescimento miceliano (IVCM – cm/dia) para os tratamentos contendo o fungicida boscalida, em funções das doses utilizadas.

Ao avaliar a produção de escleródios, verificou-se que o fungicida boscalida proporcionou formação de escleródios, expressados pelo número e peso de escleródios, apenas com as menores doses (Tabela 14), contudo houve inibição total de escleródios na maior dose (dose 1). O tratamento com o fungicida penthiopirade, independente da dose, proporcionou a produção de escleródios. Para esse isolado, o ingrediente ativo fluopiran inibiu completamente a produção de escleródios, fato não ocorrido em isolados anteriores.

Tabela 14. Número e peso de escleródios produzidos aos 21dias pelo isolado proveniente do município de Roda Velha – BA

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	43,75a	43,75a	43,75a		0,24a	0,24a	0,24a	
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
boscalida	0,00a	2,50a	9,00b		0,00a	0,13b	0,10b	
fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	30,22*	0,00a	0,00a	0,00a	4.05*
procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
pentiopirade	11,25b	12,25b	0,00a		0,09b	0,10b	0,00a	
fluopiran	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. *Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

Quanto ao isolado proveniente do município de Rosário – BA, os tratamentos contendo os fungicidas boscalida e pentiopirade, embora tenha proporcionado o crescimento miceliano, não se verificou diferenças significativas para AACPCM entre as doses utilizadas (tabela 15). Já o tratamento contendo fluopiran a menor dose (dose 3) permitiu significativamente maior crescimento miceliano em relação às demais, expressa pela AACPCM.

Em relação à velocidade de crescimento miceliano do isolado proveniente do município de Rosário, verificou-se que os fungicidas pentiopirade e fluopiran não proporcionaram diferenças significativas entre as doses utilizadas ao avaliar o IVCm. No entanto, boscalida apresentou significativamente maior IVCm na menor dose (Figura 8).

Tabela 15. Área abaixo da curva do progresso do crescimento miceliano (AACPCM) do isolado proveniente do município de Rosário – GO

Tratamentos	AACPCM			CV (%)
	dose 1	dose 2	dose 3	
Testemunha	25,57a	25,57a	25,57a	66,70
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a	
Carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
Boscalida	8,94a	8,83a	9,61a	
Fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	
Procimidona	0,00a	0,00a	0,00a	
Penthiopirade	6,10a	6,64a	4,14a	
Fluopiran	5,39ab	4,13a	9,65b	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 0,05% de probabilidade.

*Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

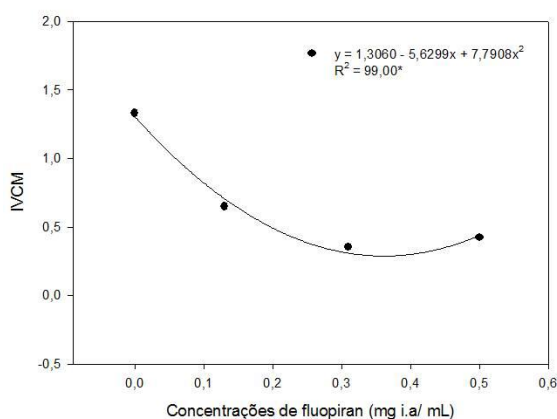


Figura 8. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM – cm/dia) do isolado proveniente do município de Rosário – BA, para o tratamento contendo o fungicida fluopiram, em função das doses utilizadas.

Para a produção de escleródios, o fungicida boscalida, independente da dose, não permitiu formação de estruturas de resistência, expressa pelo número e peso de escleródios (Tabela 16). Entretanto, os fungicidas penthiopirade e fluopiran permitiram de forma significativa a produção de escleródios (número e peso) em doses maiores, não havendo portanto, formação de escleródios com a menor dose dos mesmos. Possivelmente, este fato pode estar relacionado ao mecanismo de escape deste isolado de *S. sclerotiorum*, ou seja, sob condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento o obriga a produzir estruturas de resistência para sua permanência.

Tabela 16. Número e peso de escleródios produzidos aos 21 dias do isolamento da região de Rosário – BA

Tratamentos	Número de escleródios produzidos				Peso de escleródios produzidos (g)			
	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)	dose 1	dose 2	dose 3	CV (%)
Testemunha	32,00a	32,00a	32,00a		0,38a	0,38a	0,38a	
fludioxonil+mefenoxan+tiabendazol	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
Carbendazim	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
tiofanto metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
Boscalida	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
Fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	44,31*	0,00a	0,00a	0,00a	3,10*
Procimidona	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
Penthiopirade	12,75b	9,75b	0,00a		0,12b	0,12b	0,00a	
Fluopiran	4,25b	0,00a	0,00a		0,05b	0,00a	0,00a	
fluazinam+tiofanato metílico	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	
fludioxonil+metalaxil	0,00a	0,00a	0,00a		0,00a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey à 0,05% de probabilidade.

*Dados transformados em raiz quadrada de Y + 0,5.

Estudos “in vitro” tem sido utilizados para identificar a taxa da atividade e especificidade dos fungicidas contra *S.sclerotiorum*. Nesse estudo, os fungicidas utilizados independente de dose dos tratamentos contendo boscalida, penthiopirade e fluopiran, se comparados com a testemunha, mostraram-se eficientes em conter o crescimento. Na análise evidenciando o efeito entre doses para esses fungicidas é possível verificar uma contradição para alguns isolados que evidenciaram um crescimento miceliano menor quando utilizado uma subdose, isso aconteceu para os isolados provenientes de Jataí – GO, quando se utilizou o fungicida fluopiran e Roda Velha – BA, com os tratamentos penthiopirade e fluopiran.

Para isolados de Água Fria – GO, Jataí –GO, Mauá da Serra –PR e Montividiu – GO, foi possível observar, através da AACPCM, que a dose 1 (recomendada) do fungicida penthiopirade foi eficaz em conter o crescimento miceliano, isso também aconteceu para os isolados de Água Fria – GO e Montividiu – GO quando se utilizou o fungicida fluopiran. Já para o fungicida boscalida, os resultados satisfatórios com a dose 1 ocorreram para os isolados de Jataí – GO, Goianópolis – GO e Roda Velha – BA, os demais isolados não mostraram diferenças significativas entre doses. Campos (2011) verificou que os fungicidas boscalida (isoladamente) e fluopiran também não mostraram efeito significativo entre as doses, sendo que o aumento da dose não influenciou para a diminuição do crescimento miceliano do fungo. Já para o penthiopirade, houve efeito significativo no crescimento miceliano em função das doses utilizadas

Garcia et al (2010) demonstrou em seu trabalho que nos tratamentos contendo boscalida e fluopiran avaliando 5 isolados, houve efeito significativo entre as doses utilizadas, isto é, houve inibição do crescimento miceliano com o aumento da dose do fungicida.

Em outros estudos, já foi constatado eficiência limitada de diferentes fungicidas no controle do crescimento miceliano de *S.sclerotiorum*, em que se detectou variação na taxa de crescimento em 91 isolados variando de 18 a 93%, quando se utilizou o princípio ativo tiofanato metílico, isso indica que existe um potencial de resistência do patógeno (Mueller, 2002), o que já havia mostrado em anteriormente por Hawthorne; Jarvis (1973) uma taxa de redução de 80 a 90% de redução no crescimento de *S. sclerotiorum*.

Quanto ao efeito dos fungicidas, ressaltamos que o boscalida, fluopiran e pentiopirade mesmo não inibindo o crescimento miceliano no ensaio “in vitro”, não pode ser comparado com resultados “in vivo”, sendo que Meyer et. al. (2011) e Campos et. al. (2011) observaram redução significativa da incidência e na produção de escleródios, como também incrementos na produtividade, utilizando os fungicidas fluopiran, e as misturas dimoxystrobina+boscalida e picoxystrobina+pentopirade em diferentes áreas experimentais no estado de Goiás.

Para a produção de escleródios, o fungicida boscalida, mesmo proporcionando o crescimento miceliano, inibiu a produção de escleródios nos isolados dos municípios de Goianápolis – GO, Mauá da Serra – PR e Rosário – BA, ainda para os isolados de Montividiu – GO e Roda Velha – BA, houve efeito de doses sendo que a dose 1(recomendada) proporcionou menor produção. Para o pentiopirade, o efeito de dose ocorreu para o isolado de Água Fria – GO, destacando os isolados de Rosário – BA, Roda Velha – BA e Montividiu – GO, onde a menor produção de escleródios ocorreu na subdose (2 ou 3) utilizada. Para o isolado de Mauá da Serra, houve a inibição na produção de escleródios. O tratamento contendo fluopiran se destacou na inibição de produção de escleródios já que isso foi observado para os isolados de Água Fria – GO, Jataí – GO, Goianápolis – GO, Mauá da Serra – PR e Roda Velha - BA. Campos (2011), utilizando diferentes fungicidas, observou que boscalida e pentiopirade permitiram a produção de escleródios em um isolados do município de Araguari -MG.

4. CONCLUSÃO

Os fungicidas fludioxonil + mefenoxan + tiabendazol, carbendazim, tiofanato-metilico, fluazinam, fluazinam + tiofanato-metilico e fluodioxonil + metalaxil e procimidona não permitiram o crescimento miceliano de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os fungicidas boscalida, pentiopirade e fluopiran permitiram o crescimento miceliano de *Sclerotinia sclerotiorum*.

O fungicida boscalida inibiu a produção de escleródios nos isolados de Goianapolis-GO, Mauá da Serra- PR e Rosário.

O fungicida pentiopirade inibiu a produção de escleródios no isolado de Mauá da Serra – PR.

O fungicida fluopiran inibiu a produção de escleródios nos isolados de Água Fria – GO, Jataí – GO, Goianapolis – GO, Mauá da Serra – PR e Roda Velha – BA.

5. REFERÊNCIAS

CAMPOS, Bárbara Arantes. **Efeito de fungicidas no crescimento miceliano de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2011. 33f. Monografia (Graduação em Agronomia)- Fesurv- Universidade de Rio Verde, 2011

CAMPOS, H.D; SILVA, L.H.C.P; CABRAL, D.A.C; SILVA, J.R.C; RIBEIRO, G.C; SILVA, R.S. **Eficácia de fungicidas para controle do mofo branco na cultura da soja na safra 2010/2011, Montividiu – GO**. XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - São Pedro, SP, 2011.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.225-258.

GARCIA, R.A.;SANTOS, R.C.; LOBO JÚNIOR, M.; MEYER, M.C.; OLIVEIRA, M.; CUNHA, M.G. Sensibilidade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* à fungicidas. Resumos do XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Resumos... Brasília, 2010.

HAWTHORNE, B. T., JARVIS, W. R. **Differential activity of fungicides on various stages in the life cycle of *Sclerotinia* spp.** N.Z.J. Agric. Res. V. 16, p. 551-557, 1973

IQBAL, Z., M. S. AKHTAR, Z. SINDHU, M. N. KHAN, A. JABBAR. Herbal dewormers in livestock—A traditional therapy. **Int. J. Agri. Biol**, v. 5, n. 4, p.199-206, 2003.

MEYER, M.C; NUNES JUNIOR, J; PIMENTA , C.B; SEIL, A.H; NUNES SOBRINHO, J.B; COSTA , N.B; GUARNIERI, S.F. Eficiência de fungicidas no controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja , no Estado de Goiás. **XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil** - São Pedro, SP, 2011.

MUELLER, D.S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R. C.; OZKAN E., KURLE, J. E., GRAU, C. R., GASKA, J. M.; HARTMAN,G. L.; BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, W. L. Efficacy of Fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and Their Potential for Control of *Sclerotinia* Stem Rot on Soybean. **Plant Disease** v. 86 n. 1, 2002.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.).** 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade).

SARTORATO, A. Sensibilidade “in vitro” de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n. 3, p. 211-213, 2006.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SIGMAPLOT. 2004. **For windows, version 9.01.** Systat Software, 2004.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* PROVENIENTES DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL.

RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pode causar danos econômicos a uma grande variedade de culturas, podendo infectar mais de 400 espécies. Apesar do diagnóstico através dos sintomas ser de fácil execução, técnicas moleculares têm sido utilizadas para facilitar a identificação entre grupos de isolados de diferentes regiões e culturas. Com o objetivo de realizar a identificação molecular de 19 isolados de *S. sclerotiorum* provenientes das culturas da soja, algodão, feijão e girassol obtidos de diferentes locais e regiões geográficas do Brasil Central, empregou-se a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos *primers* universais para amplificação da região ITS4/ITS5. Após o sequenciamento das populações, essas foram analisadas com o auxílio do programa Bioedit. Em seguida, os sequenciamentos foram submetidos à consulta de similaridade de nucleotídeos de *Sclerotinia* depositadas na base de dados NCBI, com o auxílio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A partir dos alinhamentos, foi desenvolvida a árvore filogenética utilizando o programa PAUP*4.0. Os resultados obtidos evidenciaram que os 19 isolados utilizados apresentaram máxima identidade com a espécie *S. sclerotiorum*, ou seja, 99 a 100% das bases foram idênticas às depositadas no Genbank. Houve a formação de dois grupos distintos, separando 3 isolados dos demais. Os resultados evidenciaram a ocorrência apenas da espécie *S. sclerotiorum* entre os isolados, o que corrobora para a existência de apenas uma espécie nas regiões de origem dos mesmos.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Phaseolus vulgaris*, *Gossypium hirsutum*, mofo branco, PCR, região ITS4/ITS5.

MOLECULAR CHARACTERISATION OF ISOLATES *Sclerotinia sclerotiorum* FROM CENTRAL REGION BRAZIL

ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary may cause economic damage to wide variety of cultures and can infect more than 400 species. Despite the diagnosis by symptoms be easy implementation, molecular techniques have been used to facilitate the identification between isolated groups from different cultures and regions. With the goal of the order perform molecular identification of 19 isolates of *S. sclerotiorum* from soybean, cotton, beans and sunflower crops obtained from different locations and geographical regions in the Central region of Brazil, employed the technique of polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotides universal primers for amplification of the region ITS4/ITS5. After the sequencing of these populations were analyzed with the aid of Bioedit program. Then the sequencements were referred to the nucleotide similarity query of *Sclerotinia* deposited in NCBI, database, with the aid of the tool BLAST (Basic Local Aligment Search Tool). From alignments, phylogenetic tree was developed using the program PAUP * 4.0. The results obtained showed that isolated used maximum 19 submitted with the species identity *S. sclerotiorum*, this is 99 to 100% of the bases were the same as those deposited in Genbank. There was the formation of two distinct groups, separating 3 isolated from others. The results showed the only occurrence of the species *S. sclerotiorum* between isolates, which corroborates the existence of only one species in the regions of origin.

Keywords: *Glycine max*, *Helianthus annus*; *Phaseolus vulgaris*, *Gossypium hirsitum*; *Sclerotinia sclerotiorum*; white mold, PCR, region ITS4/ITS5.

1. INTRODUÇÃO

O mofo branco também conhecido por murcha ou podridão aquosa, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary (Vieira, 1988), ocorre na maioria dos países produtores de regiões de clima temperado e subtropical (Bianchini et al., 2005). É um dos patógenos de plantas mais importantes, portanto é considerada, atualmente, a doença mais destrutiva em diferentes culturas no Brasil, entre elas: soja; feijão; algodão; girassol (Bianchini, et al., 2005; Paula Junior; Zambolim, 2006).

Na cultura da soja, levantamento realizado durante a safra 2008/2009 evidenciou mais de 1 milhão de hectares com a presença da doença, correspondendo mais de 45% da área cultivada com a soja no estado de Goiás (Campos et al., 2009). Assim, o aumento da ocorrência associado aos níveis de danos causados à cultura nas áreas mais altas do cerrado, tem proporcionado perdas significativas a cada safra (Leite, 2005; Campos et al., 2008). Segundo Nasser et al. (1999) e Nasser; Spehar (2001), as perdas ocasionadas por esse fungo na região do Cerrado podem chegar a 30% na cultura da soja. Entretanto, dependendo da pressão do inóculo inicial e das condições climáticas, essas perdas podem ultrapassar 40% (Meyer; Campos, 2009). A doença já foi constatada causando danos de até 60% na produtividade em regiões de altitude elevada, tanto em áreas experimentais quanto em lavouras comerciais (Campos, et al., 2005). Em casos mais drásticos de perdas, pode levar o agricultor ao abandono das áreas infestadas (Miranda; Lobo Junior, 2011). Outro fator que pode estar relacionado com as perdas causadas pelo mofo branco nas culturas hospedeiras em regiões produtoras do Brasil é a diversidade genética. Segundo Peres; Regnaultt (1993) isolados obtidos entre hospedeiros apresentaram diferenças quanto à virulência, conferindo diferentes níveis de severidades às espécies de plantas.

Estudos visando ao reconhecimento inicial de isolados de *S. sclerotiorum* de uma região do estado de São Paulo utilizando marcadores de microssatélite foi conduzido por Meinhardt et al. (2002) para avaliar a variabilidade genética e serem comparados a outros isolados de Minas Gerais. Segundo os autores, 23 isolados de *S. sclerotiorum* analisados apresentaram variabilidade genética limitada, sendo que, dos três oligonucleotídeos de microssatélites testados, apenas um produziu padrão de bandas polimórfico em cinco isolados.

Segundo Silva (2002), ao avaliar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes áreas geográficas do Distrito Federal por meio da

técnica RFLP-PCR e sequenciamento direto da região correspondente ao ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA nuclear foi evidenciado, pela análise filogenética dentro e entre populações de *S. sclerotiorum*, a existência de variabilidade genética nas populações dessa região geográfica, não sendo, dessa forma, populações clonais e, de acordo com a análise de sequências dentro de cada população nos respectivos pivôs, os patógenos se distribuíram aleatoriamente e não apresentaram correlação entre similaridade genética e sua localização geográfica.

Considerando a variabilidade do nível de perdas causadas pelo mofo branco nas culturas da região central do Brasil, é possível que ocorra variação genética entre isolados, o que pode dificultar e proporcionar limitações para se estabelecer estratégias de controle efetivas. O presente trabalho visou estudar a similaridade genética, através da caracterização molecular, de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados

Para obtenção do inóculo inicial, amostras de escleródios foram recolhidas de plantas infectadas em lavouras de: soja, algodão, feijão e girassol. Em seguida, os escleródios foram caracterizados como isolados (Tabela 17) e acondicionados em recipientes de vidro lacrados, devidamente identificados e armazenados em ambiente com temperatura controlada $\pm 24^{\circ}\text{C}$.

2.2. Multiplicação e preparo do inóculo

Escleródios de cada isolado foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto, lavados em água destilada esterilizada numa sequência de três repetições e secos em papel esterilizado. Com o auxílio de bisturi realizou-se cortes para fragmentá-los e expor a medula. Em seguida, os fragmentos de escleródios foram transferidos para placas de petri contendo meio BDA (batata, dextrose e agar) com adição de antibiótico. As placas foram mantidas em câmara tipo BOD, sob temperatura de 24°C e ausência de luz. Assim que os escleródios iniciaram a germinação miceliogênica, discos contendo micélio foram retirados da borda da colônia e transferidos para meio de cultura (BDA com adição de antibiótico) e

mantidas nas mesmas condições por um período de até 5 dias. Nesse momento, disco do meio contendo micélio novamente foram retirados da borda da colônia e repicado para frascos Erlenmeyer contendo meio líquido BD (batata e dextrose) e mantidos em câmara tipo BOD, sob temperatura de 24°C e ausência de luz.

Tabela 17. Identificação dos isolados utilizados no estudo de caracterização molecular.

Nº	Estado	Município	Cultura	Safra	Coordenadas	Altitude
1	Goiás	Montividiu	Girassol	2011	S17°23'2765"W51°26'2157"	934
2	Goiás	Montividiu	Girassol	2010	S 17°25'28,0" W51°40'0,95"	921
3	Goiás	Rio Verde	Girassol	2009	S17°54'3098"W51°26'2157"	673
4	Goiás	Rio Verde	Feijão	2010	S17°54'3098"W51°26'2157"	673
5	Goiás	Rio Verde	Feijão	2010	S17°42'3021"W51°21'5993"	877
6	Goiás	Rio Verde	Feijão	2010	S17°42'0996"W51°21'2284"	869
7	Goiás	Montividiu	Feijão	2011	S17°23'1524"W51°26'3624"	941
8	Goiás	Montividiu	Algodão	2009/2010	S 17°21'40" W51°40'36,63"	1000
9	Bahia	Roda Velha	Algodão	2010/2011	S12°41'36.51" W45°49'23.55"	744
10	Goiás	Montividiu	Soja	2008/2009	S 17°25'28,0" W51°40'0,95"	921
11	Goiás	Montividiu	Soja	2010/2011	S 17°25'28,0" W51°40'0,95"	921
12	Bahia	Roda Velha	Soja	2008/2009	S12°41'36.51" W45°49'23.55"	744
13	Bahia	Rosário	Soja	2010/2011	S10°11'02,30" W38°59'02,34"	477
14	Bahia	Luis Ed. Magalhães	Soja	2010/2011	S12°10'1709"W45°49'1203"	735
15	Goiás	Jataí	Soja	2009/2010	S17°53'49,01" W51°42'57,61"	741
16	Paraná	Mauá da Serra	Soja	2009/2010	S23°54'26,52" W51°11'29,09"	1091
17	Goiás	Goianapolis	Soja	2010/2011	S 16°27'52,3" W49°00'37,70"	973
18	Goiás	Água Fria	Soja	2010/2011	S14°57'54,8"W47°46'08,1"	891
19	Goiás	Silvania	Soja	2010/2011	S16°28'0,7"W49°00'26,8	1021

2.3. Extração do DNA

Após 5 dias de crescimento em meio líquido BD sob temperatura de 25 °C, a massa de micélio foi separada com auxílio de espátula e água destilada e esterilizada estéril. Após separação, a massa de micélio foi filtrada em papel de filtro esterilizado e transferida para microtubos de 1,5 mL, os quais foram armazenados a -4°C. Todo o processo, para cada isolado, foi realizado em câmara de fluxo laminar tomando os devidos cuidados para que não houvesse nenhum tipo de contaminação.

O DNA genômico dos isolados foi extraído com base na metodologia proposta por Koenig et al. (1997). Para isso, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido, com pistilo e almofariz e transferido para microtubos de 1,5 mL, no qual foi adicionado tampão de extração na proporção de 700 µL para cada 300 µL de micélio macerado. O tampão de extração consistiu de uma mistura de tampão de lise nuclear (0,3 M sorbitol, 0,1 M Tris, e 20 mM EDTA com pH 7,5), tampão de isolamento de DNA (0,2 M Tris com pH 7,5, 50 mM EDTA e 0,2 Mm cetyltrimethylammonium bromide) e Sarkosyl 5% na proporção de 1:1:0,4. Após a homogeneização, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por uma hora, seguido da extração com solvente orgânico, adicionando, em cada tubo, 500 µL da mistura clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1.

Após, foi realizado a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e tratados com 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg.mL⁻¹ de RNase e incubados em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionou-se em cada tubo 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg.mL⁻¹ de proteinase K e incubados por 20 minutos a 37°C. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol na proporção 2:3 da solução aquosa em cada amostra. Após centrifugação, por 5 minutos a 10.000 rpm, o “pellet” foi lavado com etanol 70% por três vezes. Com o auxílio de papel absorvente esterilizado retirou o excesso de etanol da parede interna do microtubo, em seguida, o “pellet” foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl com pH 7,5 e 0,1 mM EDTA). A qualidade do DNA das amostras foi avaliada através de corrida em gel de agarose 1% e, a quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro.

As amostras foram estocadas em freezer, para serem usados nas reações de PCR.

2.4. Identificação da espécie

Para a amplificação das regiões ITS4 e ITS5 do DNA ribossômico (DNAr), foram utilizados os oligonucleotídeos universais para região ribossômica ITS4 e ITS5. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador personal Whatman Biometra, foi executada com um volume total das reações de amplificação de 25 µL contendo DNA genômico, 10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1mM de cada *primer*. Todas as reações foram baseadas em 35 ciclos sendo que cada ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, as fitas do DNA são separadas devido ao aumento da temperatura (92 °C a 95 °C).

Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida (35 a 60 °C). Em seguida, a temperatura é elevada para 72 °C, para que a enzima realize a extensão (adição de nucleotídeos) do *primer*, de acordo com a sequência codificada pela fita molde. Como a quantidade de sequência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue em progressão geométrica de maneira que, após 20 ciclos, são produzidas mais de um milhão de sequências alvo.

Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos amplificados foram purificados e depois quantificados, seguidos para sequenciamento.

A purificação dos produtos de PCR é uma fase essencial a ser realizada antes do sequenciamento. A purificação foi efetuada, empregando-se o kit ExoSap-IT (GE Health Care). Este Kit funciona a partir da utilização de duas enzimas a Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase, a primeira degrada o excesso de *primers* e DNA fita simples estranhos, a segunda degrada o excesso de nucleotídeos provenientes da reação de PCR (dNTPs).

Com base no protocolo descrito pelo fabricante, foi usado 2 µL da ExoSAP-IT para cada 5 µL de produto de PCR. Em seguida, os produtos foram colocados no termociclador por 15 minutos a 37 °C e, seguido de 80 °C por 15min (temperatura de inativação da ExoSAP-IT). Após purificação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo - USP.

Para a identificação da espécie das amostras, as sequências de nucleotídeos obtidas por PCR foram analisadas com o programa Bioedit (Hall, 1999) e, em seguida, foram submetidos à consulta de similaridade de nucleotídeos de *Sclerotinia* depositadas na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Foram utilizadas as espécies *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* e *S. nivalis* para a formação da árvore filogenética, pois as mesmas foram as que mais se aproximaram das sequências. A partir dos alinhamentos, foram preparadas árvores filogenéticas com o programa PAUP*4.0 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, EUA) utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*). Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1000 repetições.

3. RESULTADOS

O resultado da amplificação do DNA por PCR, utilizando-se o *primer* ITS4/ITS5, resultou em produtos de PCR com fragmentos de, aproximadamente, 550 pares de base para todos os isolados estudados (Figura 9).

As sequências de DNA dos isolados apresentaram homologia entre 99 e 100% com acessos do *GenBank* identificados como *S. sclerotiorum*.

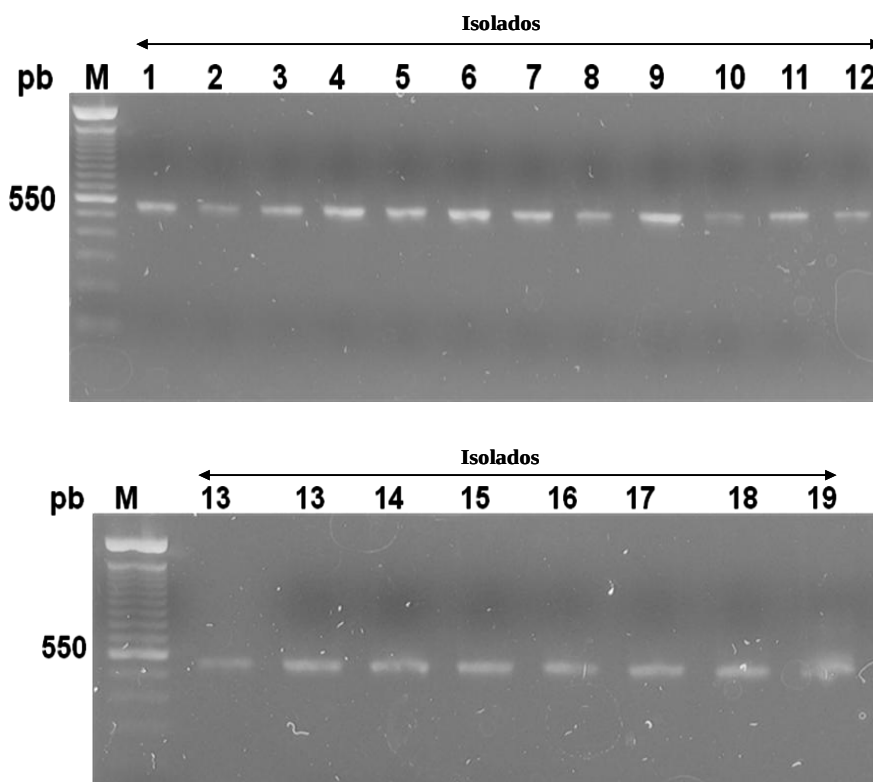


Figura 9. Gel de agarose da reação da polimerase em cadeia (PCR) demonstrando a amplificação específica utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS4/ITS5 para os 19 isolados analisados.

Após análise dos dados de sequenciamento do DNA em cada isolado, baseado na região ITS (ITS4 / ITS5), verificou-se que os isolados de *Sclerotinia*, utilizados nesse estudo, foram semelhantes aos da espécie *Sclerotinia sclerotiorum* depositadas no *GenBank* (Figura 10). Dentro da espécie, a árvore filogenética inferida pelo método de vizinhos (*neighbor joining*), neste estudo, separou os isolados de *Sclerotinia* em dois grupos, com suporte pelo teste *bootstrap* de 62% (Grupo I) em que estão isolados provenientes das culturas da soja, algodão, feijão e girassol e, 64% (Grupo II) contendo isolados da soja e do algodão, todos de diferentes regiões.

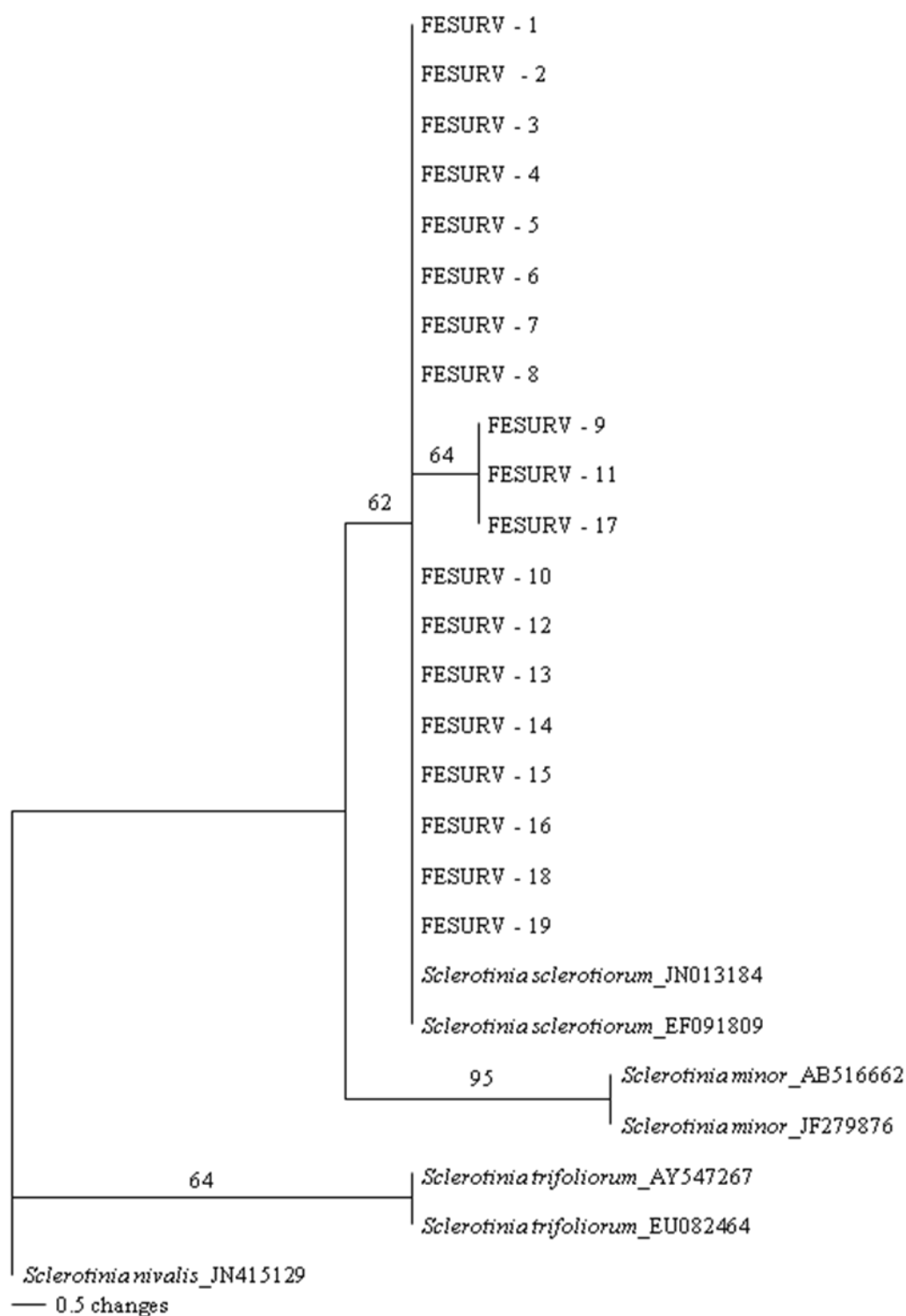


Figura 10. Árvore filogenética consenso inferida pelo método de agrupamento de vizinhos, a partir de sequências de DNA das regiões ITS4 e ITS5 do rDNA de isolados de *Sclerotinia*. Os números sobre as ramificações indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual, as repetições foram observadas (1.000 repetições).

Os resultados deste estudo mostram a ocorrência de variabilidade na população de isolados de *S. sclerotiorum* obtidos no Brasil, com a formação de um pequeno grupo com um isolado de algodão e dois de soja, dentro do maior grupo constituído pelos demais isolados. Ainda são escassos os trabalhos envolvendo identificação molecular nas culturas utilizadas no trabalho com essa determinada região ITS4 e ITS 5. No entanto, alguns estudos têm demonstrado variabilidade entre isolados de *S. sclerotiorum*. Análise genética tem mostrado que alguns isolados de *S. sclerotiorum* na América do Norte são homogêneos, com variabilidade limitada nas regiões 18S e 28S do rDNA. Os estudos de Kohn et al. (1991) utilizando um número de diferentes marcadores genéticos, RFLPs, sondas nucleares e mitocondriais, evidenciaram que cada amostra de grupo de compatibilidade micelial foi geneticamente uniforme. Cubeta et al. (1997) e Kohn (1995) demonstraram, em suas pesquisas, que populações de *S. sclerotiorum* em culturas de repolho na região leste do Estado da Carolina do Norte nos Estados Unidos e em canola no Canadá são de características idênticas ou clonais.

Já os estudos de Carpenter et al (1999) detectaram variabilidade genética relativamente alta, tanto dentro como entre populações de *S. sclerotiorum*, utilizando sondas de “DNA fingerprinting” em 75 isolados da Nova Zelândia. A dispersão de isolados clonais nesta população se limitou a áreas de uma mesma região geográfica e não entre regiões, o que pode ser explicado pela dispersão do patógeno através de implementos agrícolas. Na Austrália, maior variabilidade genética entre isolados de *S. sclerotiorum*, provenientes de campos de canola, foi detectada utilizando marcadores de microssatélites (Sirjusingh; Kohn, 2001). No presente trabalho, entre os conjuntos de marcadores utilizados, oito deles foram provenientes dos estudos de Sirjusingh; Kohn (2001) comprovando alta similaridade entre os mesmos.

Silva (2002), ao avaliar isolados proveniente do Distrito Federal, detectou variabilidade na análise da região ITS1, ITS2 e gene 5,8S do rDNA nesses mesmos isolados, indicando que as alterações encontradas podem ser em decorrência da inserção de diferentes genótipos e não somente de um alto índice de reprodução sexuada do fungo.

Embora esperasse maior variabilidade entre os isolados provenientes de culturas distintas e/ou regiões distantes, os três isolados (Isolado 9 = Roda Velha /BA - algodão; Isolado 11 = Montividiu /GO - soja e Isolado 17 = Goianápolis /GO - soja) que se diferenciaram foram dois provenientes da mesma cultura, mas mostraram ocorrência em regiões distantes, sem possibilidade de haver disseminação dos mesmos entre essas áreas. A alta variabilidade genética encontrada em isolados de *S. sclerotiorum*, tanto em isolados da

Austrália como em isolados dos Estados Unidos e China, sugere que pode estar havendo os dois tipos de reprodução, assexuada e sexuada, teoria também embasada pelo fato de já terem sido encontrados ascósporos recombinantes em isolados dos Estados Unidos (Atallah et al., 2004).

Estudos realizados por Petrofeza (2010) com 79 isolados de *S. sclerotiorum* obtidos a partir de quatro áreas com o cultivo de feijão, sob pivô central, na região Centro-Oeste do Brasil, mostraram, a partir das análises baseadas em índices de diversidade genética e fixação, maior variabilidade genética dentro das populações (71,21%) do que entre elas (28,79%). Uma maior variabilidade genética foi observada nos isolados provenientes da cultura de feijoeiro irrigado na região do Cerrado brasileiro, o que reforça a variabilidade em função de reprodução sexuada. A hipótese de populações clonais entre áreas de cultivo foi refutada também através da análise da sequência correspondente a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, detectaram variações entre os isolados presentes em uma mesma área.

Em outro estudo, foram analisados 40 isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes culturas hospedeira (feijão, soja, girassol, ervilha, canola, nabo forrageiro, tomate, pimentão, alface e cenoura) coletados em áreas agrícolas representativas nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, e Distrito Federal. A análise de agrupamento UPGMA utilizando o índice de similaridade de Jaccard permitiu separar os isolados analisados em três grupos, com índices de similaridade de 68,2%, 61,8% e 61,8%. Esses estudos demonstraram que o mofo branco é causado por populações de *S. sclerotiorum* geneticamente diversas e que esse patógeno é altamente variável dentro de pequenas áreas geográficas, como pode ser evidenciado em feijoeiro irrigado na Região Centro-Oeste (Petrofeza, 2010).

4. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram, através da análise filogenética, baseada nas regiões ITS-4 e ITS-5 (rDNA), que os 19 isolados pertencem apenas a espécie *Sclerotinia sclerotiorum*;

Foi observada variabilidade genética entre os 19 isolados analisados, pertencentes a espécie *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATALLAH Z. K.; LARGET B.; CHEN X.; JOHNSON D. A. High Genetic Diversity, Phenotypic Uniformity, and Evidence of Outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, v. 94, p. 737 – 742. 2004.

BIANCHINI, A; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, M.; 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, 2005. v.2, p. 333-349.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C. Manejo das principais doenças fúngicas da soja. **Atualidades Agrícolas**, São Bernardo dos Campos, v.5, n.2, p.20-28, ago.2005.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C; GALVÃO, J.C.B. Programa de aplicação dos fungicidas tiofanato metílico e fluazinam no controle do mofo branco em soja. **Tropical Plant Pathology**. Brasília: v.33 (suplemento), p.172, 2008.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; SILVA, J.R.C.; SILVA, A.F.; MORAES, E.B. Eficácia do fungicida fluazinam no controle do mofo branco na cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5., 2009; MERCOSOJA, 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009. Seção Trabalhos, t. 3. 1 CD-ROM.

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

CUBETA, M. A.; CODY, B. R.; KOHLI, Y. & KOHN, L. M. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. **Phytopathology**, v. 87, p. 1000 – 1004. 1997.

GENBANK on line, disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Acesso em: 27 de nov. 2011.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.

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

KOHN, L. M. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. **Canadian Journal Botanical**, v. 73 (Supl. 1), p. S1231 – S1240. 1995

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

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**; v.41, p.95–98. 1999.

MEINHARDT, L.W.; NELSON, A.W.; BELLATO, C.M.; TSAI, S.M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 211-215, 2002.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D. Manejo do mofo branco na cultura da soja. **Revista Cultivar**, maio, p.1-3, 2009.

MIRANDA; E.R.R; LOBO JUNIOR, M. **Controle químico preventivo e curativo de mofo branco em feijoeiro comum**. Disponível em: <
<http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0346.pdf>>. Acesso em 18/12/2011)

NASSER, L.C.B.; SPEHAR, C.R. Podridão branca. **Revista Cultivar**: grandes culturas. n.31, p. 1-2 , 2001.

NASSER, L.C.B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R.A. Mofo branco: cuidado com a semente. **Revista Cultivar**: grandes culturas. maio, p. 1-2 , 1999.

PERES, A., REGNAULTT, Y. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary on rootcollar: biology and development of contamination method on sunflower. In: Intern. *Sclerotinia* workshop, 8th. Toronto, Ontário. **Abstract...** p. 1-7. 1993.

PETROFEZA, S. Diversidade genética em populações de *Sclerotinia sclerotiorum*. 43º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Cuiabá, 2010, **Suplementos...**Cuiabá- MT, 2010.

SILVA, S. S. **Caracterização molecular de *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary isolados de cultura de feijoeiro irrigado.** (Dissertação mestrado) – Universidade Federal de Goiás – UFG, Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Goiânia – 2002.

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

SUN, JUN-MING; IRZYKOWSKI W.L JEDRYCZKA M., HAN F. Analysis of the Genetic Structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations from Different Regions and Plants by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 4, p. 385 – 395. 2005.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro.** Viçosa: Editora UFV, 1988. 213p.