

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARLOS RAFAEL WUTZKI

ANÁLISE ESPACIAL E QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO DE MOFO BRANCO
(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary) NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L) Merrill)

PONTA GROSSA - PR
2017

CARLOS RAFAEL WUTZKI

ANÁLISE ESPACIAL E QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO DE MOFO BRANCO
(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary) NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L) Merrill)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da
Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, com Área de Concentração em Agricultura.

Orientador: Dr. David de Souza Jaccoud Filho

PONTA GROSSA - PR
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

W973 Wutzki, Carlos Rafael
 Análise espacial e quantificação de
 inóculo de mofo branco (*Sclerotinia*
 sclerotiorum (Lib) de Bary) na cultura da
 soja (*Glycine max* (L) Merrill)/ Carlos
 Rafael Wutzki. Ponta Grossa, 2017.
 76f.

 Tese (Doutorado em Agronomia - Área de
 Concentração: Agricultura), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. David de Souza
 Jaccoud Filho.

 1.*Sclerotinia sclerotiorum*. 2.Índice de
 doença. 3.Escleródios. 4.Semivariogramas.
 5.*Glycine max*. I.Jaccoud Filho, David de
 Souza. II. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Doutorado em Agronomia. III. T.

CDD: 632



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Tese: "Análise espacial e quantificação de inóculo de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary) na cultura da soja (*Glycine max* (L) Merrill)".

Nome: Carlos Rafael Wutzki

Orientador: David de Souza Jaccoud Filho

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatto

Prof. Dr. Edlane Maurício Grabisoski

Prof. Dr. Maristella Dalla Pria

Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto

Data da Realização: 14 de agosto 2017.

Aos meus Pais.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e sua presença constante comigo.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e o curso de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade.

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

Aos meu pais, Arno e Ida, por sempre me incentivarem nessa jornada

A minha querida esposa Raquel, por todo apoio, incentivo, compreensão e ombro amigo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. David de Souza Jaccoud Filho, pela paciência, auxílio, incentivo e exemplo profissional durante todos esses anos de convivência.

A todos integrantes do Laboratório de Fitopatologia Aplicada da UEPG, muito obrigado por toda ajuda, companheirismo, dedicação e principalmente pelos ótimos momentos passados juntos.

Aos produtores rurais que forneceram as áreas onde foram conduzidos os experimentos.

Aos integrantes da banca examinadora: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti; Prof^a Dr^a Maristella Dalla Pria; Prof^a Dr^a Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski e o Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto, pela disposição e contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

A todos os professores e colegas da Pós-Graduação em Agronomia da UEPG, por todo o conhecimento compartilhado.

A todos os servidores da UEPG, pela amizade, simpatia e prontidão em auxiliar.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

Até aqui nos ajudou o Senhor.
I Samuel 7:12B

RESUMO GERAL

O conhecimento da dinâmica espacial de doenças de plantas, aliado a quantificação de inóculo e monitoramento das condições meteorológicas é de grande importância para a adoção de estratégias de manejos adequados e com menor impacto ambiental. Sendo assim, os objetivos deste trabalho de pesquisa foram caracterizar a distribuição, variabilidade espacial e possíveis relações entre atributos referentes ao mofo branco e atributos de plantas de soja além de avaliar técnicas de identificação e quantificação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* durante o florescimento da soja. Foram realizadas amostragens através de uma malha georreferenciada em uma área de 12 hectares (ha) no município de Mauá-da-Serra-PR nas safras 2013/14 e 2014/15 e uma área de quatro hectares no município de Ponta Grossa-PR na safra 2015/16. Foram utilizados quadrats com área útil de 7,2 m² para avaliação das seguintes variáveis: escleródios presentes no solo, estande da cultura, incidência, índice de doença, rendimento, escleródios produzidos na colheita, além da deposição do bioaerossol, partes de folha e flores da soja como uso de Meio Semi-seletivo a *Sclerotinia sclerotiorum* (MSS) e Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), em 36 pontos de amostragem na área de Ponta Grossa-PR, em três datas durante o florescimento da soja. Os dados foram analisados com uso de estatística descritiva, ajuste de semivariogramas e matriz de correlação de Pearson. As condições meteorológicas observadas nos três experimentos foram adequadas para o desenvolvimento da cultura da soja e do mofo branco na soja. As variáveis referentes a cultura da soja apresentaram coeficientes de variação baixos ou moderados e as variáveis referentes ao mofo branco apresentaram coeficiente de variação muito elevados. Os ajustes dos semivariogramas apresentaram diferenças nos três experimentos, com efeito pepita puro, ajuste linear, esférico e exponencial. A variável escleródios do solo apresentou efeito pepita puro nos dois experimentos em Mauá-da-Serra. Foram encontradas correlações significativas positivas entre a incidência do mofo branco e a produção de escleródios na colheita, além de correlação negativa com o rendimento nos três experimentos. A identificação de inóculo de mofo branco com incubação em MSS mostrou-se a técnica com maior sensibilidade, mas demanda de até 15 dias para a confirmação de *S. sclerotiorum*, tanto para bioaerossol, como flores e partes de folhas de soja. Foi possível otimizar o protocolo de extração de DNA e ciclo de reação para qPCR, além de gerar uma curva padrão com DNA oriundo de ascósporos de *S. sclerotiorum*, com ajuste ao modelo linear ($R^2=0,99$) e eficiência de 92,2%. O uso de qPCR mostrou-se promissor para partes de folhas, sendo possível resultados em um dia de trabalho.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*; Índice de doença; Escleródios; Semivariogramas; *Glycine max*; Meio Semi-seletivo; qPCR; Bioaerossol; Ascósporos.

GENERAL ABSTRACT

The knowledge of the spatial dynamics of plant diseases, allied with the quantification of inoculum and monitoring of the meteorological conditions, is important for the adoption of adequate management strategies and with less environmental impact. The aim of this work was to characterize the distribution, spatial variability and possible relations between white mold attributes and soybean plants attributes, as well as to evaluate techniques for identification and quantification of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* during soybean flowering. Samplings were carried out through a georeferenced grid on a field of 12 hectares (ha) in the municipality of Mauá-da-Serra-PR in the 2013/14 and 2014/15 crop seasons and, on a field of four hectares in the municipality of Ponta Grossa-PR in the 2015/16 crop season. Quadrats with a useful area of 7.2 m² were used to evaluate the following variables: sclerotia in the soil, crop stand, incidence, severity, yield, sclerotia produced at harvest, as well as bioaerosol deposition, soybean leaf parts and flowers on semi-selective medium to *Sclerotinia sclerotiorum* (MSS) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR), at 36 sampling points in the Ponta Grossa-PR field, at three dates during soybean flowering. Data were analyzed using descriptive statistics, semivariogram adjustment and Pearson correlation matrix. The meteorological conditions observed in the three experiments were adequate for the development of soybean crop and white mold disease. The variables related to soybean plants, showed low or moderate coefficients of variation and the variables related to white mold showed a high coefficient of variation. The semivariograms adjustments showed differences in the three experiments, with pure nugget effect, linear, spherical and exponential adjustments. The variable sclerotia of soil showed pure nugget effect on the two experiments in Mauá-da-Serra. Significant positive correlations were found between the incidence of white mold and the production of sclerotia at harvest, in addition to negative correlation to yield in the three experiments. The identification of white mold inoculum with incubation on MSS was shown to be the most sensitive technique, but takes up to 15 days for the confirmation of *S. sclerotiorum* pathogen for bioaerosol, flowers and parts of soybean leaves. It was possible to optimize the protocol of DNA extraction and reaction cycle for qPCR, besides generating a standard curve with DNA from ascospores of *S. sclerotiorum*, adjusted to the linear model ($R^2=0,99$) and efficiency of 92.2%. The use of qPCR showed promise results for leaf parts, being possible achieve concluding results in one working day.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; Disease index; Sclerotia; Semivariograms; *Glycine max*; Semi-selective medium; qPCR; Bioaerosol; Ascospores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes de um semivariograma típico. Fonte: o autor.....	22
----------	--	----

CAPÍTULO I

Figura 1	Representação da área utilizada em Mauá-da-Serra, PR, na safra de 2013/14 com os 43 pontos de amostragem. Fonte: o autor.....	35
Figura 2	Representação da área utilizada em Mauá-da-Serra, PR, na safra de 2014/15 com os 44 pontos de amostragem. Fonte: o autor.....	36
Figura 3	Representação da área utilizada em Ponta Grossa, PR, na safra de 2015/16 com os 95 pontos de amostragem. Fonte: o autor.....	37
Figura 4	Dados meteorológicos observados em Apucarana – PR utilizados como referência para o experimento 1 conduzido em Mauá-da-Serra na safra 2013/14, com correção de temperatura. Fonte: SIMEPAR. VE: emergência; R1: início do florescimento; R3: início formação das vagens; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977).....	39
Figura 5	Dados meteorológicos observados em Telêmaco Borba – PR utilizados como referência para o experimento 2, conduzido em Mauá-da-Serra na safra 2014/15, com correção de temperatura. Fonte: SIMEPAR. VE: emergência; R1: início do florescimento; R3: início formação das vagens; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977).....	40
Figura 6	Dados meteorológicos observados na Fazenda Escola Capão da Onça, utilizados como referência para o experimento 3 conduzido em Ponta Grossa na safra 2015/16. Fonte: Mini Farm BASF. VE: emergência; R1: início do florescimento; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977).....	41
Figura 7	Semivariogramas isotrópicos ajustados para as variáveis avaliadas no experimento 1 - Mauá-da-Serra, safra 2013/14: A) estande; B) escleródios recuperados do solo; C) incidência do mofo branco; D) índice de doença; E) rendimento da soja; F) escleródios produzidos na colheita. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada ponto no semivariograma.....	46
Figura 8	Semivariogramas isotrópicos ajustados para as variáveis analisadas no experimento 2, safra 2014/15 em Mauá-da-Serra: A) estande; B) escleródios presentes no solo (m ²); C) incidência; D) índice de doença; E) rendimento; F) escleródios produzidos na colheita. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada distância no semivariograma.....	48
Figura 9	Semivariogramas isotrópicos para as variáveis analisadas no experimento 3, Ponta Grossa, safra 2015/16. A) estande; B) incidência; C) índice de doença; D) rendimento; E) escleródios recuperados da massa de grãos. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada distância no semivariograma.....	49

CAPÍTULO II

Figura 1	Coletor F12 instalado em uma área experimental, Ponta Grossa, 2016. Foto: Carlos R. Wutzki.	62
Figura 2	Suporte de madeira com as placas de Petri contendo MSS para coleta de ascósporos de <i>S. sclerotiorum</i> na cultura da soja. Ponta Grossa, 2016. Foto: Carlos R. Wutzki.....	64
Figura 3	Dados meteorológicos observados na Fazenda Escola Capão da Onça, utilizados como referência para o experimento conduzido em Ponta Grossa na safra 2015/16. Fonte: Mini Farm BASF. VE: emergência; R1: início do florescimento; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977).....	68
Figura 4	Curvas de dissociação de <i>Sclerotinia minor</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> meio de qPCR.....	69
Figura 5	A) Curvas de amplificações a partir de diluições de DNA de ascósporos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . B) Curva padrão gerada a partir diluição do DNA de ascósporos de <i>S. sclerotiorum</i> (reações em triplicatas).....	70
Figura 6	Placas de Petri contendo o meio semi-seletivo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A) Setas indicando a mudança de cor de azul para amarelo do meio semi-seletivo (MSS) indicando o desenvolvimento de <i>S. sclerotiorum</i> . B) Isolamento de micélio originados ascósporos de <i>S. sclerotiorum</i> e a formação de escleródios sob MSS.....	71
Figura 7	Porcentagem de amostras positivas para presença <i>S. sclerotiorum</i> oriundas do bioaerossol, fitas, partes de folhas e flores de soja, nas duas metodologias testadas: Meio semi-seletivo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (MSS) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); Máximos (Máx); Média (Med); Mediana (Men); Desvio padrão (DP); Coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e Teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 1, Mauá-da-Serra, PR, safra 2013/14.....	43
Tabela 2	Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); Máximos (Máx); Média (Med); Mediana (Men); Desvio padrão (DP); Coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e Teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 2, em Mauá-da-Serra, PR, na safra 2014/15.....	43
Tabela 3	Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); Máximos (Máx); Média (Med); Mediana (Men); Desvio padrão (DP); Coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e Teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 3, em Ponta Grossa, PR, na safra 2015/16.....	44
Tabela 4	Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 1, Mauá-da-Serra, PR, safra 2013/14.....	45
Tabela 5	Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 2 - Mauá-da-Serra, safra 2014/15.....	47
Tabela 6	Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 3 – Ponta Grossa, safra 2015/16.....	49
Tabela 7	Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 1 – Mauá-da-Serra, safra 2013/14.....	50
Tabela 8	Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 2 – Mauá-da-Serra, safra 2014/15.....	51
Tabela 9	Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 3 – Ponta Grossa, safra 2015/16.....	52

CAPÍTULO II

Tabela 10	Teste de especificidade do primer SsF/SsR (YIN et al., 2009) para DNA de microrganismos possíveis de estarem presentes nas amostras coletadas em lavouras de soja.....	69
-----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

pH	Potencial hidrogeniônico
MSS	Meio semi-seletivo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
PCR	Reao em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Reao quantitativa em cadeia da polimerase.
SIG	Sistema de informaes geográficas
HA	Hectare
GPS	Sistema de posicionamento global (<i>Global Positioning System</i>)
C ₀	Efeito pepita
C ₁	Escala
C ₀ + C ₁	Patamar
A	Alcance
EPR	Efeito pepita relativo
EPP	Efeito pepita puro
EXP	Exponencial
AP	Alcance prático
DE	Dependência espacial
nM	Nano molar
AIC	Critério de Akaike
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
SIMEPAR	Sistema Meteorológico do Paraná
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ESC	Escleródios
RPM	Rotaes por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. EPIDEMIOLOGIA DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
2.2. MANEJO DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA.....	16
2.3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
2.4. ANÁLISE ESPACIAL DE EPIDEMIAS.....	19
2.4.1. Padrão espacial de doenças de plantas.....	19
2.4.2. Análise do padrão espacial de doenças de plantas.....	20
2.4.3. Geoestatística.....	20
2.4.4. Semivariograma.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO I: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. GERAL.....	34
2.2. ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. EXPERIMENTO 1: MAUÁ-DA-SERRA SAFRA 2013/14.....	34
3.2. EXPERIMENTO 2: MAUÁ-DA-SERRA SAFRA 2014/15.....	36
3.3. EXPERIMENTO 3: PONTA GROSSA SAFRA 2015/16.....	37
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. DADOS METEOROLÓGICOS.....	39
4.2. ESTATÍSTICA DESCRITIVA.....	43
4.3. SEMIVARIOGRAMAS.....	45
4.4. MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON.....	49
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO DE MOFO BRANCO (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) NA CULTURA DA SOJA.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. OBJETIVOS.....	60
2.1 OBJETIVO GERAL.....	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA.....	61
3.2. COLETOR DE ESPOROS.....	61
3.3. MEIO SEMI-SELETIVO A <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	62
3.4. AMOSTRAGENS.....	63
3.5. AVALIAÇÕES.....	64
3.6. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE ASCÓSPOROS.....	65
3.6.1. Extração de DNA das flores, folhas e fitas.....	65
3.6.2. Reação q PCR.....	66
3.6.3. Especificidade do Primer.....	66
3.6.4. Suspensão de ascósporos e curva padrão de qPCR.....	66
3.7. CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1. CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS.....	68
4.2. ESPECIFICIDADE DO PRIMER.....	68
4.3. CURVA PADRÃO DE qPCR.....	69
4.4. MEIO SEMI-SELETIVO A <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	70
4.5. FOLHAS E FLORES EM MSS.....	72
4.6. qPCR DE FOLHAS E FLORES.....	73
4.7. qPCR EM FITAS ORIUNDAS DO COLETOR F12.....	74
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é considerada uma das fabáceas mais importantes do mundo e é utilizada como fonte de proteína para consumo animal e humano, sendo também matéria prima para a extração de óleo e produção de biodiesel, podendo originar inúmeros produtos processados. Devido a estas características e a grande adaptação da cultura em diferentes climas e solos, a soja é uma das principais plantas cultivadas mundialmente, e o Brasil é o segundo maior produtor (CONAB, 2016).

Devido a ampla capacidade de adaptação, a cultura da soja está sujeita a danos no rendimento de grãos por várias doenças. O destaque é o mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que vem aumentando sua disseminação e potencial de dano nas diferentes regiões produtoras do Brasil. Este fungo de solo pode infectar mais de 400 espécies de plantas (BOLAND; HALL, 1994), podendo ser responsável por danos de até 70% do rendimento de grãos na cultura da soja, conforme relatadas por Jaccoud Filho et. al. (2010) na safra 2008/2009 no Estado do Paraná.

O fungo *S. sclerotiorum* produz estruturas de resistência denominados escleródios que se formam externa e internamente à planta, podendo manter seu poder patogênico por períodos de até 10 anos (ADAMS; AYERS, 1979; COLEY-SMITH; COOKE, 1971). Esses por sua vez podem germinar e produzir micélio, infectando diretamente os tecidos da planta ou então germinar carpogenicamente, podendo dar origem a até 20 apotécios que podem liberar mais de dois milhões de ascósporos num período de até 10 dias (STEADMAN, 1979).

O mofo branco pode se propagar em uma área ou infestar novas áreas devido a presença de solo contaminado com escleródios aderidos em equipamentos (tratores, colhedoras, semeadoras, etc), animais, pessoas ou material vegetal contaminado. Pode ser propagada pelo vento, através dos ascósporos liberados pela formação do apotécio (ABAWI; GROGAN, 1979; COLEY-SMITH; COOKE, 1971), além da disseminação a longas distâncias através da contaminação das sementes com micélio dormente ou mesmo a presença de escleródios (ADAMS; AYERS, 1979; NEERGAARD, 1958). Devido a isso, o mofo branco apresenta distribuição errática nas áreas contaminadas, sendo importante o conhecimento desta distribuição para o manejo da doença.

A associação dos organismos biológicos ocorre em diferentes níveis em uma mesma área. Esta associação pode variar tanto no espaço como no tempo, sofrendo influência dos componentes de plantas, solo e condições meteorológicas, além do manejo utilizado pelo

agricultor (BERGAMIN FILHO et al., 2007; CAMPBELL; NOE, 1985; DE WOLF; ISARD, 2007; GILLIGAN, 1983).

Estudar e quantificar algumas dessas interações é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle, desde ações como manejo da fertilidade do solo e arquitetura de plantas até o desenvolvimento de modelos de previsão de ocorrência de doenças baseados no inóculo inicial da doença aliado as condições meteorológicas (AGRAWAL; MEHTA, 2007; ALMQUIST; WALLENHAMMAR, 2015; BECKA et al., 2016; BERGAMIN FILHO et al., 2007; CAMPBELL; NOE, 1985; CHELLEMI et al., 1988; COULSON, 1992; WOLF; ISARD, 2007; GILLIGAN, 1983).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo cosmopolita, necrotrófico e que pode causar danos em mais de 400 espécies de plantas (BOLAND; HALL, 1994). Na cultura da soja causa a doença conhecida como mofo branco.

O fungo *S. sclerotiorum* desenvolve-se sob alta umidade relativa do ar e solo, com temperaturas ideais entre 11 e 25°C, mas, tolerando temperaturas de 5°C a 30°C (ABAWI; GROGAN, 1979; NATTI, 1971; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; STEADMAN, 1983).

Este patógeno produz estruturas de resistência denominadas escleródios, que são massas de hifas de consistência firme, exteriormente de cor escura, devido ao acúmulo de melanina, que protege o micélio dormiente no seu interior (TOWNSEND; WILLETTS, 1954).

Após um período de maturação, com exposição a temperaturas amenas e alta umidade no solo os escleródios podem germinar de forma miceliogênica ou carpogênica (ABAWI; GROGAN, 1979; NASSER et al., 1999; PURDY, 1979).

A germinação miceliogênica dos escleródios ocorre sobre a superfície do solo, a partir do crescimento de hifas oriundas do escleródio, podendo causar *damping off* em plântulas ou podridões no caule de plantas adultas. Normalmente, alta umidade no solo e temperaturas entre 20°C e 28°C são adequadas para o desenvolvimento do micélio (ABAWI; POLACH; MOLIN, 1975; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; SULEIMAN, 2008; TREVETHICK; COOKE, 1973)

Sob condições de umidade relativa do ar acima de 80% e temperaturas entre 15 a 24°C, pode ocorrer a germinação carpogênica dos escleródios (ABAWI; GROGAN, 1979; AGHAJANI; SAFAIE; ALIZADEH, 2010; BOLAND; HALL, 1988a; COLEY-SMITH; COOKE, 1971; HUANG, 1985; PURDY, 1979; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; SUN; YANG, 2000). O desenvolvimento do micélio dormiente no interior do escleródio rompe a camada externa e forma estipes, que se diferenciam em estruturas em forma de taça denominadas apotécios. Cada escleródio pode originar até 20 apotécios, que podem liberar mais de dois milhões de ascósporos num período de até 10 dias (STEADMAN, 1983). Os ascósporos podem ser disseminados a curtas distâncias pelo vento, depositando-se na superfície das plantas, ficando viáveis por até duas semanas (ABAWI; GROGAN, 1979; BOLAND; HALL, 1988; COLEY-SMITH; COOKE, 1971).

As maiores epidemias causadas por *S. sclerotiorum* normalmente se iniciam durante florescimento da cultura da soja, porque os ascósporos necessitam de uma fonte de energia, como flores senescentes, para sua germinação e infecção de plantas sadias (ABAWI; GROGAN, 1979; ABAWI; POLACH; MOLIN, 1975; BOLAND; HALL, 1988a; CHAMBERLAIN, 1951; CLARKSON et al., 2003). A penetração do patógeno ocorre por pressão mecânica via apressório, e/ou secreção de enzimas e ácido oxálico (WILLETS; WONG, 1980).

O ácido oxálico altera o funcionamento das células guarda dos estômatos, facilitando a penetração das hifas, além de alterar o pH do meio, ajudando na ação de enzimas degradantes da parede celular das células da planta (ABAWI; POLACH; MOLIN, 1975; LUMSDEN, 1969; MAXWELL; LUMSDEN, 1970).

Após a infecção das flores, os sintomas evoluem para axilas das folhas, ramos e vagens, podendo afetar toda a planta (ABAWI; GROGAN, 1979; ABAWI; POLACH; MOLIN, 1975; BOLAND; HALL, 1988a). Inicialmente, os sintomas do mofo branco na soja são lesões aquosas que evoluem para podridão mole dos tecidos com crescimento de micélio branco cotonoso, que pode formar escleródios interna e externamente as hastes e vagens da soja, culminando com a murcha, seca e morte das plantas (ABAWI; GROGAN, 1979; BOLAND; HALL, 1988a; CHAMBERLAIN, 1951; NELSON, 1998; PELTIER et al., 2012; PURDY, 1979; WILLETTTS; BULLOCK, 1992).

Os escleródios produzidos nas plantas infectadas podem retornar ao solo, aumentando o potencial de inóculo para próximas safras, ou serem transportados aderidos em maquinários ou nas sementes, podendo contaminar novas áreas de cultivo a longas distâncias (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; BOLAND; HALL, 1988b; JACCOUD FILHO et al., 2010; NELSON, 1998; PELTIER et al., 2012; STEADMAN, 1979).

2.2. MANEJO DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA

A melhor forma de manejo do mofo branco na soja é prevenir a contaminação da área com inóculo, já que, uma vez infestada com escleródios de *S. sclerotiorum*, a erradicação do mesmo é muito difícil.

Uma vez detectada a presença do mofo branco na área de cultivo, uma série de medidas devem ser tomadas visando o manejo da doença, dentre elas podemos citar o controle cultural, como rotação de culturas, maior espaçamento entre linhas, menor densidade de semeadura, cobertura do solo com palhada, época de semeadura desfavorável ao mofo branco e escolha por

variedades com resistência parcial ao patógeno, as quais podem contribuir para uma menor incidência e severidade do mofo branco na cultura da soja (AGHAJANI; SAFAIE; ALIZADEH, 2010; BERGER-NETO et al., 2017; BERUSKI, 2013; BOLAND; HALL, 1988a; CHAMBERLAIN, 1951; HENNEBERG et al., 2008; JACCOUD-FILHO et al., 2016; KURLE et al., 2001; MARTINS et al., 1999; NAPOLEÃO et al., 2005; PELTIER et al., 2012; ROUSSEAU; RIOUX; DOSTALER, 2007; STEADMAN, 1979, 1983; TU, 1989; WUTZKI et al., 2016).

Aliado as medidas de controle cultural, o uso do controle biológico vem ganhando destaque no manejo do mofo branco na soja. Vários relatos apontam resultados promissores com o uso de inúmeros agentes de controle biológico para *S. sclerotiorum*, como *Coniothyrium minitans* (ADAMS; AYERS, 1979; WUTZKI, 2014; YANG et al., 2007), *Trichoderma* spp. (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008; BETTIOL, 2012; OJAGHIAN, 2011; GRACIA-GRAZA; REELEDER; PAULITZ, 1997; TRUTMANN; KEANE, 1990), *Gliocladium* spp., (WHIPPS; BUDGE, 1990) *Sporidesmium sclerotivorum* (MARTINSON, 1999; ZENG et al., 2012) e *Bacillus subtilis* (DAVET, 1988; BUDGE et al., 1995), *Bacillus amyloliquefaciens* (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008), *Phoma nebulosa* (WHIPPS; BUDGE; MITCHELL, 1993), *Streptomyces lydicus* (ZENG et al., 2012), *Ulocladium atrum* (HUANG et al., 2006) e *Pseudomonas fluorescens* (AERON et al., 2011).

O uso de agentes de controle biológico demanda certos cuidados para a correta utilização, como escolha de microrganismo adaptado a região de utilização, condições ambientais favoráveis no momento da aplicação, além do tempo necessário para a estabilização na microbiota do solo e a inviabilização dos escleródios de *S. sclerotiorum*.

Devido a esses fatores, em áreas com alto potencial de inóculo e em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, a efetividade do controle cultural e biológico pode ser baixa (MUELLER et al., 2002). Neste caso, a aplicação de fungicidas pode diminuir a infecção da soja pelo patógeno e reduzir a produção de inóculo para as próximas safras, aumentando a eficiência dos demais métodos de controle no manejo do mofo branco na cultura.

A eficiência do controle químico do mofo branco reside na aplicação preventiva para o controle da doença, sendo necessário atingir as flores durante o período de florescimento da cultura da soja, coincidindo com a liberação de ascósporos pelo patógeno (BERGER-NETO et al., 2017; MUELLER et al., 2002; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; WUTZKI et al., 2016).

Assim, identificar a presença de ascósporos durante o florescimento da soja de uma forma rápida e barata, pode ser uma ferramenta eficaz para o monitoramento e o direcionamento das aplicações químicas visando o manejo de *S. sclerotiorum*, usando fungicidas de modo

racional, evitando aplicações desnecessárias e, conseqüentemente, evitando contaminação ambiental.

2.3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para identificar e quantificar esporos fúngicos presentes no bioaerossol, sendo métodos considerados convencionais e não convencionais.

Os métodos convencionais podem ser descritos como avaliação visual de esporos aderidos em superfície adesiva e plaqueamento em meio de cultura (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; CLARKSON et al., 2003; PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994). Como métodos não-convencionais pode-se citar técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e a PCR quantitativa (qPCR) (ALMQUIST; WALLENHAMMAR, 2015; FREEMAN et al., 2002; GRABICOSKI et al., 2015; LIANG et al., 2012; PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014a; ROGERS; ATKINS; WEST, 2009; YIN et al., 2009; ZIESMAN et al., 2015).

A avaliação visual através de microscopia é ineficiente para o mofo branco, já que os ascósporos de *S. sclerotiorum* não apresentam nenhuma característica marcante que os diferencie dos ascósporos de outras espécies de fungos (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; JACKMAN et al., 2013; PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014a; YIN et al., 2009; ZIESMAN et al., 2015).

Já o crescimento dos ascósporos em meio de cultura garante a viabilidade dos ascósporos e sua correta identificação através de meio semi-seletivo (MSS) (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994) ou a formação de escleródios (PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994), porém, leva-se de 3 a 15 dias após a coleta para a confirmação dos resultados, perdendo o período recomendado para a máxima eficácia do controle químico do mofo branco na soja em campo (MUELLER et al., 2002, 2004).

O uso de técnicas moleculares de detecção, principalmente PCR e qPCR, apresentam as vantagens de serem rápidas, acuradas, específicas e de grande repetibilidade, enquadrando-se perfeitamente em sistemas de previsão de doenças de plantas (BECKA et al., 2016; GRABICOSKI et al., 2015; JONES et al., 2011a; PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014b; SMITH et al., 2007; YOUNG; WERNER, 2012; ZIESMAN et al., 2015).

2.4. ANÁLISE ESPACIAL DE EPIDEMIAS

O padrão de distribuição espacial de uma doença no campo está intimamente ligado ao mecanismo de dispersão do patógeno (ZAWOLEK; ZADOCKS, 1992). Patógenos que apresentam dispersão pelo ar podem atingir grandes distâncias em curtos períodos de tempo e estão relacionados a uma distribuição espacial ao acaso, enquanto patógenos que apresentam mecanismos de dispersão a curtas distâncias, como respingos de chuva, relacionam-se como padrão de distribuição espacial agregada (BERGAMIN FILHO et al., 2004; MADDEN; HUGHES, 1995).

Contudo, um mesmo patógeno pode apresentar mais de um mecanismo de dispersão, como *S. sclerotiorum*, que apresenta dispersão dos ascósporos pelo vento, dispersão de micélio pela germinação miceliogênica dos escleródios ou mesmo de plantas infectadas para plantas saudáveis, além da dispersão por semente, seja por escleródios na massa de sementes ou micélio dormente aderido às mesmas (BAE; KNUDSEN, 2007; BOLAND; HALL, 1988b; CLARKSON et al., 2013; JACCOUD FILHO et al., 2010; STACEY; TRUSCOTT; GILLIGAN, 2001). Diante disto, o conhecimento sobre como ocorre a dispersão do patógeno em estudo é fundamental para a correta interpretação dos resultados obtidos.

2.4.1. Padrão espacial de doenças de plantas

O padrão de distribuição espacial de uma doença no campo pode ser definida como o arranjo das plantas doentes umas em relação às outras (GILLIGAN, 1983). Uma doença pode apresentar padrão espacial ao acaso ou agregado.

O padrão ao acaso ocorre quando todas as plantas possuem a mesma probabilidade de receber um esporo veiculado pelo ar e apresentar sintomas da doença, ou seja, todas as plantas possuem igual oportunidade de infecção (BERGAMIN FILHO et al., 2004).

Uma variação observada no padrão ao acaso é a distribuição regular da doença, que é caracterizada pela distribuição uniforme de plantas doentes na área (BERGAMIN FILHO et al., 2004, 2007; MADDEN; HUGHES, 1995; RIDOUT; XU, 2000). O padrão de distribuição regular ou uniforme não ocorre naturalmente em áreas, mas pode ser provocado com a semeadura de variedades resistentes e suscetíveis alternadamente em uma linha de semeadura (BERGAMIN FILHO et al., 2007).

Contudo, se as plantas mais próximas da fonte de inóculo apresentam maior chance de serem infectadas, devido ao modo de dispersão do patógeno (como respingos de chuva, por

exemplo), caracteriza-se o padrão espacial agregado (BERGAMIN FILHO et al., 2004; FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009). Neste caso, podem ser observados focos ou reboleiras de plantas doentes na área em estudo.

2.4.2. Análise do padrão espacial de doenças de plantas

Existem vários métodos descritos na literatura utilizadas para a análise de padrão espacial de doenças em plantas, como exemplo a comparação com distribuições estatísticas (quadrats), testes de run e doublet, além de índices de dispersão (BERGAMIN FILHO et al., 2007; CAMPBELL; NOE, 1985; GILLIGAN, 1983). Contudo, estas metodologias são ditas como descritivas, já que não levam em conta a dependência espacial destas variáveis umas com as outras.

Assim, é necessário o uso de métodos estatísticos capazes de considerar a distância entre as amostras para representar a dependência espacial, que é conhecida como a teoria da variável regionalizada, sendo a base dos fundamentos da geoestatística (ALMEIDA et al., 2011; ALVES et al., 2006; CARVALHO, 2008; CHELLEMI et al., 1988; DINARDO-MIRANDA et al., 2007; FILIPE et al., 2012; LARKIN; GUMPERTZ; RISTAINO, 1995; MADDEN; HUGHES, 1995).

2.4.3. Geoestatística

A geoestatística originou-se com os estudos do geólogo Daniel Krige, na África do Sul em 1957. Ele buscava melhorar o mapeamento de minas de diamantes e teve a ideia de modelar a distribuição do "parentesco" entre as amostras levando em conta sua posição espacial (VIEIRA, 2000). Inicialmente seu uso foi mais intenso para caracterização dos atributos de solo, contudo, com o tempo, outras áreas do conhecimento começaram a utilizar esta técnica.

A geoestatística utiliza de um conjunto de métodos estatísticos para a caracterização quantitativa da distribuição espacial, e tem sido utilizada em estudos sobre a distribuição espacial de doenças de plantas a nível de campo (CHELLEMI et al., 1988; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993; NELSON et al., 1999). Para isso, é necessário a utilização de sistemas de informação geográfica (SIG), para a coleta, armazenamento e interpretação dos dados georreferenciados (CAMPBELL; NOE, 1985; NELSON et al., 1999).

O SIG relaciona os dados recolhidos do sistema de posicionamento global (*Global Positioning System* – GPS) para outras fontes de informação e possui a capacidade de relacionar as camadas de informação espacial (NELSON et al., 1999).

O SIG tem sido aplicado na agricultura para a análise espacial de espécies de insetos (COULSON, 1992; DINARDO-MIRANDA et al., 2007; EVERITT; ESCOBAR; DAVIS, 1994; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993) ervas daninhas (JAIME-GARCIA et al., 2001) e doenças de plantas (ALMEIDA et al., 2011; ALVES et al., 2006; BAE; KNUDSEN, 2007; BARBOSA, 2002; BARNARD et al., 1998; CZERMAINSKI, 2006; FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009; GOSME; LUCAS, 2010; GUMPERTZ; GRAHAM; RISTAINO, 1997; JAIME-GARCIA; COTTY, 2006).

Quanto as doenças de plantas, o SIG pode ser utilizado para estudos de padrões espaciais, aspectos geográficos do controle da doença, ainda como a confecção de semivariogramas e de mapas para ilustrar a distribuição e propagação da doença em escalas locais, regionais e até continentais (NELSON et al., 1999).

2.4.4. Semivariograma

O semivariograma indica o grau de dependência espacial entre as amostras no campo experimental e é confeccionado a partir da soma dos quadrados da diferença entre as amostras separadas por uma mesma distância, divididas por duas vezes o número de pares possíveis para esta distância (CRESSIE, 1990; LANDIM, 2006; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993).

A determinação e o ajuste do semivariograma é a primeira etapa do processo de estimação dos valores de pontos não-amostrados pelo uso da krigagem. É um procedimento fundamental e que merece muito cuidado, pois os ajustes realizados nesta etapa influenciarão todas as considerações e a confecção de mapas posteriores.

Existem três tipos de semivariograma: a) Semivariograma observado ou experimental, que é aquele obtido a partir do conjunto de dados amostrais; b) Semivariograma real, composto por todos os dados da população e, portanto desconhecido; c) Semivariograma teórico, confeccionado a partir de modelos e utilizado como referência (GUERRA, 1988).

O semivariograma teórico é aquele que tem suas propriedades conhecidas e é utilizado para realizar inferências. Existem inúmeros modelos teóricos que podem ser ajustados ao semivariograma teórico, sendo os mais comuns: o semivariograma linear, o semivariograma esférico, o semivariograma exponencial e o semivariograma gaussiano (FARACO, 2006; LANDIM, 2006; RIBEIRO JUNIOR, 2004).

O comportamento da variável pode ser explicado pelos parâmetros ajustados do respectivo semivariograma (Figura 1), que são: efeito pepita (C_0), escala (C_1), patamar ($C_0 + C_1$) e alcance (a) (LANDIM, 2006; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993; VIEIRA, 2000). O

efeito pepita (C_0) reflete o erro analítico, indicando variabilidade não explicada de um ponto de amostragem até o outro, causado por erros experimentais ou por distâncias muito grandes entre as amostras.

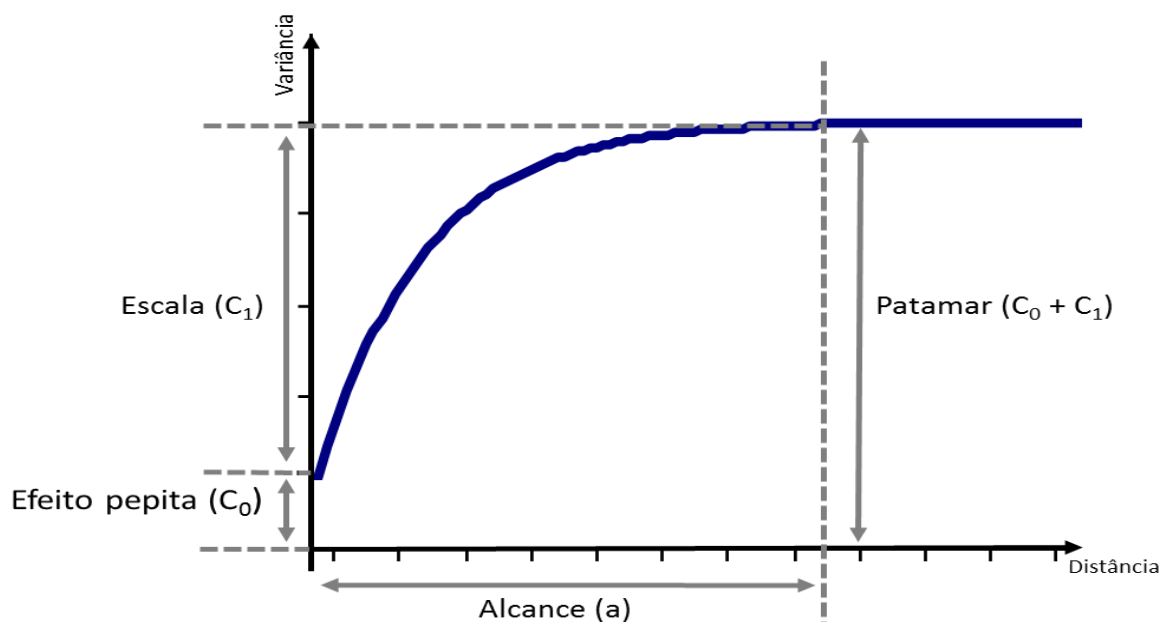


Figura 1 - Componentes de um semivariograma típico. Fonte: o autor.

O patamar indica a máxima variância observada na área experimental, ou seja, quando atingido o patamar é que temos o alcance (a), distância a partir da qual as amostras não estão mais relacionadas entre si. A diferença entre o efeito pepita e o patamar geram o valor da escala ou variância estrutural.

É possível determinar o grau de aleatoriedade da regionalização através de um índice oriundo da relação $Epr = C_0/(C_0+C_1)$, denominado de efeito pepita relativo (GARCIA, 1988), onde temos que:

$Epr < 0,15$ Componente aleatória pequena

$0,15 < Epr < 0,30$ Componente aleatória é importante

$Epr > 0,30$ Componente aleatória é muito importante

O efeito pepita puro é observado quando a menor distância entre as amostras já apresenta o valor da variância da área experimental, indicando ausência total de dependência espacial.

O ajuste do modelo teórico ao semivariograma experimental é necessário para direcionar a estimativa dos valores em locais não amostrados. Esta técnica é conhecida como interpolação e é fundamental para a confecção de mapas que reflitam a distribuição espacial da variável em estudo em qualquer ponto da área amostrada (CRESSIE, 1990; FLEISCHER; BLOM; WEISZ, 1999; NELSON et al., 1999).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 899–904, 1979.
- ABAWI, G. S.; POLACH, F. J.; MOLIN, W. T. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, V. 65. n.6, p. 673-678, 1975.
- ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, out. 2008.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 896–899, 1979.
- AERON, A.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K.; PANDEY, P.; BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 81–93, 21 abr. 2011.
- AGHAJANI, M. A.; SAFAIE, N.; ALIZADEH, A. Disease progress curves of *Sclerotinia* Stem Rot of canola epidemics in Golestan Province, Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 471–478, 2010.
- AGRAWAL, R.; MEHTA, S. C. Weather based forecasting of crop yields, pests and diseases. **Journal of the Indian Society of Agricultural Statistics**, v. 61, n. 2, p. 255–263, 2007.
- ALMEIDA, F. A.; BARRETO, M.; BARBOSA, J. C.; MAGNO, F. Distribuição espacial de *Phytophthora nicotianae* e reação de cultivares de cebola ao fungo. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 13–17, 2011.
- ALMQUIST, C.; WALLENHAMMAR, A. C. Monitoring of plant and airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* in spring oilseed rape using real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 109–118, 2015.
- ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ARAÚJO, D. V.; TALAMINI, V.; OLIVEIRA, M. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 557–563, 2006.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 21–24, jan. 2007.
- BARBOSA, F. F. L. Epidemiologia da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo - Brasil. 2002, 169f. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Tese (Doutorado em Agronomia), 2002.
- BARNARD, E. L.; ASH, E. C.; HOPKINS, D. L.; MCGOVERN, R. J. Distribution of *Xylella fastidiosa* in Oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*. **Plant Disease**, v. 82, n. 3, p. 569–572, 1998.

BECKA, D.; PROKINOVÁ, E.; SIMKA, J.; CIHLAR, P.; BECKOVÁ, L.; BOKOR, P.; VASAK, J. Use of petal test in early-flowering varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for predicting the infection pressure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Crop Protection**, v. 80, p. 127–131, 2016.

BEN-YEPHET, Y.; BITTON, S. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v. 13, n. 1, p. 33–40, 1985.

BERGAMIN FILHO, A.; LARANJEIRA, F.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R.; Análise Espacial de Epidemias. In: VALE, F. X. R. DO; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, 2004. p. 195–236.

BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F. Análise Espacial e Temporal de Epidemias de Patógenos de Solo. In: POLTRONIERI, L. S.; VERZIGNASSI, J. R. (Eds.). **Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p. 248.

BERGER-NETO, A.; JACCOUD-FILHO, D.D.S.; WUTZKI, C.R.; TULLIO, H.E.; PIERRE, M.L.C.; MANFRON, F.; JUSTINO, A. Effect of spray droplet size, spray volume and fungicide on the control of white mold in soybeans. **Crop Protection**, v. 92, p. 190-197, 2017.

BERUSKI, G. C. **Incidência e severidade de mofo branco em soja cultivada sob diferentes densidades populacionais e espaçamentos**. 2013. 212f. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Dissertação. (mestrado em Agronomia), 2013.

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

BOLAND, G. J.; HALL, R. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. **Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 329–336, 1988b.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93–108, 1994.

CAMPBELL, C. L.; NOE, J. P. The spatial analysis of soilborne pathogens and root diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 129–148, 1985.

CARVALHO, E. A. **Modelagem geoestatística da distribuição espacial de doenças do feijoeiro comum e da soja e sua relação com a fertilidade do solo e nutrição mineral de plantas**. 2008. 83 f. Universidade Federal de Lavras: UFLA. Dissertação (mestrado em Agronomia), 2008.

CHAMBERLAIN, D. W. *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Plant Disease Report**, v. 35, p. 490–491, 1951.

CHELLEMI, D. O.; ROHRBACH, K. G.; YOST, R. S.; SONODA, R. M. Analysis of the spatial pattern of plant pathogens and diseased plants using geostatistics. **Phytopathology**, v. 78, p. 221–226, 1988.

CLARKSON, J. P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C. S.; WHIPPS, J. M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological research**, v. 107, n. 2, p. 213–222, 2003.

CLARKSON, J. P.; COVENTRY, E.; KITCHEN, J.; CARTER, H. E.; WHIPPS, J. M. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. **Plant Pathology**, v. 62, p. 309–324, 2013.

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

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Safra 2015/16 - oitavo levantamento**. v. 3, n. 8, p. 1–104, 2016.

COULSON, R. N. Intelligent geographic information systems and integrated pest management. **Crop Protection**, v. 11, n. 6, p. 507–516, 1992.

CRESSIE, N. A. C. **Statistics For Spatial Data**. Revised ed. IOWA: John Wiley e Sons, INC., p. 192, 1990.

CZERMAINSKI, A. B. C. **Dinâmica espaço-temporal de populações do patossistema leprose dos citros em condições naturais de epidemia**. 2006, 91f. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Tese (Doutorado em Agronomia), 2006.

DE WOLF, E. D.; ISARD, S. A. Disease cycle approach to plant disease prediction. **Annual review of phytopathology**, v. 45, p. 203–220, 2007.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; VIEIRA, S. R.; FRACASSO, J. V.; GREGO, C. R. Uso da geoestatística na avaliação da distribuição espacial de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 449–455, 2007.

EVERITT, J. H.; ESCOBAR, D. E.; DAVIS, M. R. Application of remote sensing and spatial information technologies for detecting and mapping insect infestations. **Entomology**, v. 21, p. 240–256, 1994.

FARACO, M. A. **Qualidade do ajuste de modelos geoestatísticos utilizados na agricultura de precisão**. 2006, 135f. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), 2006.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S. DE; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 24–30, 2009.

FILIPE, J. A. N.; COBB, R. C.; MEENTEMEYER, R. K.; LEE, C. A.; VALACHOVIC, Y. S.; COOK, A. R.; RIZZO, D. M.; GILLIGAN, C. Landscape epidemiology and control of pathogens with cryptic and long-distance dispersal: sudden oak death in northern Californian forests. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 1, p. e1002328, jan. 2012.

FLEISCHER, S. J.; BLOM, P. E.; WEISZ, R. Sampling in Precision IPM: When the Objective Is a Map. **Phytopathology**, v. 89, n. 11, p. 1112–1118, 1999.

FREEMAN, J.; WARD, E.; CALDERON, C.; MCCARTNEY, A. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 9, p. 877–886, 2002.

GARCIA, R. Á. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. 154f. Universidade Federal de Uberlândia, Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2008.

GILLIGAN, C. A. Modeling of soilborne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 45–64, 1983.

GOSME, M.; LUCAS, P. Effect of host and inoculum patterns on take-all disease of wheat incidence, severity and disease gradient. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 1, p. 119–131, 24 out. 2010.

GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M. L. C.; VRISMAN, C. M.; DABUL, A. N. G. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 69–74, 2015.

GUERRA, P. A. G. **Geoestatística operacional**. Ministério de Minas e Energia, Departamento Nacional da Produção Mineral, p.145, 1988.

GUMPERTZ, M. L.; GRAHAM, J. M.; RISTAINO, J. B. Autologistic model of spatial pattern of *Phytophthora* epidemic in bell pepper : effects of soil variables on disease presence. **Journal of agricultural, Biological and Environmental Statistics**, v. 2, n. 2, p. 131–156, 1997.

HENNEBERG, L.; JACCOUD-FILHO, D. S.; GRABICOSKI, E. M. G.; VRISMAN, C. M.; PIERRE, M. L. C.; SARTORI, F. F. Monitoramento da incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja produzida em áreas do Paraná e seu potencial de disseminação através da semente. In: XVII Congresso Brasileiro de Sementes, 2011, Natal - RN. **Anais XVII Congresso Brasileiro de Sementes**, 2011.

HUANG, H. C. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 75, p. 433–437, 1985.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R.S.; PHILLIPPE, L.M.; MUELLER, C.A.; SUN, S.K.; HUANG, J.W. Control of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* by soil amendment with S–H mixture or Perlka® in bean, canola and wheat fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1348–1352, jun. 2006.

JACCOUD-FILHO, D. S.; SARTORI, F.F.; MANOSSO-NETO, M.; VRISMAN, C.M.; PIERRE, M.L.C.; BERGER-NETO, A.; TÚLLIO, H.E.; JUSTINO, A.; FONSECA, A.; ZANON, S. Influence of row spacing and plant population density on management of “white mould” in soybean in southern Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, 2016.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M.O.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F.F.; DEMARCH, V. B.; ROCHA, C.H. Análise, distribuição e quantificação do “mofo branco” em diferentes regiões produtoras do estado do Paraná. In: **XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil – Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 226–228.

JACKMAN, P.; WEST, J.S.; VARRAILLON, T.; CANNING, G. G. M.; FREEMAN, L.; HEARD, S.; LAWAL, N.; GRIEVE, B. Modelling of likely sclerotinia disease incidence in oilseed rape fields in the United Kingdom. **EFITA-WCCA-CIGR Conference “Sustainable Agriculture through ICT Innovation”**, n. June 2013, p. 24–27, 2013.

JAIME-GARCIA, R.; ORUM, T. V.; FELIX-GASTELUM, R.; TRINIDAD-CORREA, R.; VANETTEN, H D.; NELSON, M. R. Spatial analysis of *Phytophthora infestans* genotypes and late blight severity on tomato and potato in the del fuerte valley using geostatistics and geographic information systems. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, p. 1156–65, dez. 2001.

JAIME-GARCIA, R.; COTTY, P. J. Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in south texas. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 599–607, jun. 2006.

JONES, S.; GENT, D.H.; PETHYBRIDGE, S. J.; HAY, F. S. Site-specific risk factors of white mould epidemics in bean (*Phaseolus vulgaris*) in Tasmania, Australia. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 671, n. December, p. 1–13, 2011.

KURLE, J. E.; GRAU, C. R.; OPLINGER, E. S.; MENGISTU, A. Tillage, crop sequence, and cultivar effects on *Sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 973–982, 2001.

LANDIM, P. M. B. Sobre Geoestatística e mapas. **Terra e Didática**, v. 2, n. 1, p. 19–33, 2006.

LARKIN, R. P.; GUMPERTZ, M. L.; RISTAINO, J. B. Geostatistical analysis of *Phytophthora* epidemic development in commercial bell pepper fields. **Phytopathology**, v. 85, n. 2, p. 191–203, 1995.

LIANG, Y.; YAJIMA, W.; DAVIS, M. R.; KAV, N. N. V.; STRELKOV, S. E. Disruption of a gene encoding a hypothetical secreted protein from *Sclerotinia sclerotiorum* reduces its virulence on canola (*Brassica napus*). **Canadian journal of plant pathology**, v. 35, n. 1, p. 46–55, 2012.

LIEBHOLD, A. M.; ROSSI, R. E.; KEMP, W. P. Geostatistics and geographic information systems in applied insect ecology. **Annual Review Of Entomology**, v. 38, p. 303–327, 1993.

MADDEN, L. V; HUGHES, G. Plant disease incidence :Distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 529–564, 1995.

MARTINS, M. C.; CÂMARA, G. M. S.; PEIXOTO, C. P.; MARCHIORI, L. F. S.; LEONARDO, V.; MATTIAZZI, P. Épocas de semeadura, densidades de plantas e desempenho vegetativo de cultivares de soja. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 851–858, 1999.

MARTINSON, C. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot in soybeans with *Sporidesmium sclerotivorum*. p. 33–38, **Leopold Center Completed Grant Reports**, v.133, 1999.

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, p. 26–31, 2002.

MUELLER, D. S.; BRADLEY, C.A.; GRAU, C.R.; GASKA, J.M.; KURLE, J.E.; PEDERSEN, W.L. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 983–988, out. 2004.

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

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

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

NEERGAARD, P. Mycelial seed infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease Report**, v. 42, p. 1105–1106, 1958.

NELSON, B. Biology of *Sclerotinia*. In: **Proceedings of the sclerotinia workshop**, 1998.

NELSON, M. R.; ORUM, T. V.; JAIME-GARCIA, R.; NADEEM, A. Applications of geographic information systems and geostatistics in plant disease epidemiology and management. **Plant Disease**, v. 83, n. 4, p. 308–319, abr. 1999.

OJAGHIAN, M. R. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 2, p. 185–193, 9 mar. 2011.

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Evaluation of air sampling and detection methods to quantify airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 32–42, 2014a.

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Assessment of spatial distribution of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* for regional disease forecasting in carrots. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 36, n. October, p. 438–446, 2014b.

PELTIER, A. J. BRADLEY, C.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; KIERSTEN W. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2012.

PERES, A. P.; NASSER, L. C. B.; MACHADO, J. D. C. Use of semi-seletive media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 62, p. 123–127, 2002.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* : history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

RIBEIRO JUNIOR, P. J. **Fundamentos de Geoestatística**. 96p. Universidade Federal do Paraná, 2004.

- RIDOUT, M. S.; XU, X. Relationships between several quadrat-based statistical measures used to characterize spatial aspects of disease incidence data. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 568–575, 2000.
- ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 324–331, 2009.
- ROUSSEAU, G.; RIOUX, S.; DOSTALER, D. Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 87, n. 3, p. 605–614, 2007.
- SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 68, n. 3, p. 383–388, 1978.
- SMITH, D. L.; HOLLOWELL, J. E.; ISLEIB, T. G.; SHEW, B. B. A site-specific, weather-based disease regression model for *Sclerotinia* blight of peanut. **Plant Disease**, v. 91, n. 11, p. 1436–1444, 2007.
- STACEY, A. J.; TRUSCOTT, J. E.; GILLIGAN, C. A. Soil-borne fungal pathogens: scaling-up from hyphal to colony behaviour and the probability of disease transmission. **New Phytologist**, v. 150, n. 1, p. 169–177, abr. 2001.
- STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n.8, p. 904–907, 1979.
- STEADMAN, J. R. White Mold -- A serious yield-limiting disease of Bean. **Plant Disease**, v.67, n.4, p. 346–350, 1983.
- STEADMAN, J. R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGES, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 68–70, 1994.
- SULEIMAN, I. **Epidemiological studies on Sclerotinia stem rot caused by Sclerotinia Sclerotiorum (Lib.) de Bary on Canola**. 2008, 120f. North Dakota State University, Fargo, Thesis (Doctor of Philosophy on Plant Pathology), 2008.
- SUN, P.; YANG, X. B. Light , temperature , and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, p. 1287–1293, 2000.
- TREVETHICK, J.; COOKE, R. C. Water relations in sclerotia of some *Sclerotinia* and *Sclerotium* species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 60, n. 3, p. 559–566, 1973.
- TRUTMANN, P.; KEANE, P. J. *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 22, n. I, p. 43–50, 1990.
- TU, J. C. Management of White Mold of White Beans in Ontario. **Plant Disease**, v. 73, n. 4, p. 281–285, 1989.

VIEIRA, S. R. Geoestatística em estudos de variabilidade espacial do solo. In: NOVAIS, R. F. DE; ALVAREZ, V. V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. (Eds.). . **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.1-54, 2000.

WHIPPS, J. M.; BUDGE, S. P. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 94, n. 5, p. 607–612, jul. 1990.

WHIPPS, J. M.; BUDGE, S. P.; MITCHELL, S. J. Observations on sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, v. 97, n. 6, p. 697–700, jun. 1993.

WILLETTS, H. J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. **Mycological Research**, v. 96, n. 10, p. 801–816, 1992.

WUTZKI, C. R. **Controle alternativo, biológico e químico do mofo branco na cultura da soja**. 2014, p. 112. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dissertação (Mestrado em Agronomia) 2014.

WUTZKI, C. R.; JACCOUD FILHO, D.S.; BERGER NETO, A.; TULLIO, H.E.; JULIATTI, F.C.; NASCIMENTO, A. J. Reduction of white mold level on soybean by fungicide management strategies | Redução do nível de mofo-branco na soja pelo manejo de fungicidas. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, 2016.

YANG, R.; HAN, Y. C.; LI, G. Q.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 4, p. 411–420, 12 jun. 2007.

YIN, Y.; DING, L.; LIU, X.; YANG, J.; MA, Z. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in planta by a real-time PCR assay. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 7–8, p. 465–469, 2009.

YOUNG, C. S.; WERNER, C. P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 730–738, 2012.

ZAWOLEK, M. W.; ZADOCKS, J. C. Studies in focus development: an optimum for the dual dispersal of plant pathogens. **Phytopathology**, v. 82, p. 1288–1297, 1992.

ZENG, W.; WANG, D.; KIRK, W.; HAO, J. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 225–232, fev. 2012.

ZIESMAN, B. R.; TURKINGTON, T. K.; BASU, U.; STRELKOV, S. E. A quantitative PCR system for measuring *Sclerotinia sclerotiorum* in Canola (*Brassica napus*). **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 984–990, 2015.

CAPÍTULO I: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

O mofo branco na soja, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, pode causar sérios danos à soja, devido à dificuldade de seu controle. O estudo da distribuição espacial do mofo branco em áreas agrícolas e as relações entre os atributos do patógeno e os atributos de planta podem fornecer suporte para melhorar o manejo e controle desta doença na soja no Brasil. Diante disso, o objetivo deste capítulo foi caracterizar a distribuição, variabilidade espacial e possíveis relações entre atributos referentes ao mofo branco e atributos de plantas de soja em áreas naturalmente infestadas com *S. sclerotiorum*. Foram realizadas amostragens através de uma malha georreferenciada em uma área de 12 hectares (Ha) no município de Mauá-da-Serra-PR nas safras 2013/14 e 2014/15 e em outra área de quatro hectares no município de Ponta Grossa-PR na safra 2015/16. A distância entre os pontos amostrados variou de 8 a 50m nos três experimentos. Foram quantificados os escleródios presentes no solo em cada ponto de amostragem em quatro pontos de 0,25m x 0,05m de profundidade. As avaliações de estande da cultura, incidência, índice de doença, rendimento e escleródios produzidos na colheita foram realizadas em quadrats com área útil de 7,2m². Os dados foram analisados com uso de estatística descritiva, ajuste de semivariogramas e matriz de correlação de Pearson. As condições meteorológicas observadas nos três experimentos foram adequadas para o desenvolvimento da cultura da soja e do mofo branco na soja. As variáveis referentes a cultura da soja apresentaram coeficientes de variação baixos ou moderados e as variáveis referentes ao mofo branco apresentaram coeficiente de variação muito elevados. Os ajustes dos semivariogramas apresentaram diferenças nos três experimentos, com efeito pepita puro, ajuste linear, esférico e exponencial. A variável escleródios do solo apresentou efeito pepita puro nos dois experimentos em Mauá-da-Serra. Foram encontradas correlações significativas positivas entre a incidência do mofo branco e a produção de escleródios na colheita, além de correlação negativa com o rendimento nos três experimentos.

Palavras-chave: Atributos de plantas; incidência; índice de doença; *Sclerotinia sclerotiorum*; escleródios; semivariogramas; *Glycine max*.

CHAPTER I: SPATIAL DISTRIBUTION OF WHITE MOLD IN SOYBEAN

ABSTRACT

White mold disease in soybeans, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, can cause serious damage to soybean crop, being a pathogen of difficult control. The study of the spatial distribution of white mold in agricultural fields and the relations between pathogen attributes and plant attributes can support improvement to the management and control of white mold in soybean on Brazil. Thus, the objective of this chapter was to characterize the distribution, spatial variability and possible relations between attributes related to white mold and attributes of soybean plants in fields naturally infested with *S. sclerotiorum*. Samplings were carried out through a georeferenced grid in an area of 12 hectares (ha) in the municipality of Mauá-da-Serra-PR in the 2013/14 and 2014/15 crop seasons and another area of four hectares in the municipality of Ponta Grossa-PR during the 2015/16 crop season. The distance between the sampling points ranged from 8 to 50m in the three experiments. Sclerotia present in the soil at each sampling point were quantified at four points of 0.25m x 0.05m depth. The assessments of crop stand, incidence, severity, yield and sclerotia produced in the harvest were carried out in quadrats with a useful area of 7.2m². Data were analysed using descriptive statistics, semivariogram adjustment and Pearson correlation matrix. The meteorological conditions observed in the three experiments were adequate for the development of soybean crop and white mold disease. The variables related to soybean plants showed low or moderate coefficients of variation and the variables related to white mold showed high coefficient of variation. The semivariogram adjustments showed differences in the three experiments, with pure nugget effect, linear, spherical and exponential adjustment. The variable sclerotia of the soil showed pure nugget effect in the two experiments in Mauá-da-Serra. Significant positive correlations were found between the incidence of white mold and the production of sclerotia at harvest, in addition to negative correlation with yield in the three experiments.

Keywords: Plant attributes; Incidence; Severity; *Sclerotinia sclerotiorum*; Sclerotia, Semivariograms, *Glycine max*.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da localização e quantificação de determinada doença em uma área agrícola é importante pois gera informações sobre seu padrão de distribuição na área e serve como suporte para o desenvolvimento de hipóteses biológicas que podem explicar o comportamento da doença em associação aos demais componentes biológicos em estudo (ALVES et al., 2006; BERGAMIN FILHO et al., 2007; CAMPBELL; NOE, 1985).

Dentre estas hipóteses, pode-se encontrar respostas para diversos aspectos da epidemiologia do patossistema em estudo, tais como: otimização de planos de amostragem; compreensão da dinâmica populacional do patógeno; caracterização do padrão espacial de dispersão da doença; correlação entre a população do patógeno e os fatores ambientais, relevo e características físico-químicas do solo; além do mecanismo de dispersão da doença (BERGAMIN FILHO et al., 2004; CAMPBELL; NOE, 1985).

O estudo do padrão espacial de uma doença deve ser realizado conjuntamente com a quantificação da fonte de inóculo (escleródios no solo, por exemplo), para uma correta interpretação da dinâmica da epidemia, já que, inicialmente pode ocorrer um padrão agregado, passando para um padrão mais regular com o avanço da doença devido ao aumento do inóculo na área (ALVES et al., 2006; BOLAND; HALL, 1988b; CHELLEMI et al., 1988). Esse comportamento pode esclarecer como ocorre a dispersão do patógeno na área, além de demonstrar possível competição dentro da população (CAMPBELL; NOE, 1985).

A identificação do padrão espacial de distribuição do inóculo está relacionado com o padrão de distribuição de plantas doentes na mesma área sendo de grande importância para a compreensão da relação patógeno-hospedeiro (BERGAMIN FILHO et al., 2007; BOLAND; HALL, 1988b; CAMPBELL; NOE, 1985; FERRANDINO, 2012).

Assim, quantificar e caracterizar a distribuição espacial do inóculo, relacionando com a incidência e/ou severidade da doença nas plantas, além da quantificação do rendimento da cultura em cada situação amostrada pode servir como base para entender o desenvolvimento da doença em uma população de plantas e desenvolver modelos de previsão de danos na safra (FILIPE; MAULE; GILLIGAN, 2004; GILLIGAN, 1983; GOSME; LUCAS, 2010; HAMMOND; CUMMINGS; JOHNSON, 2008; JONES et al., 2011b).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Caracterizar distribuição, variabilidade espacial e possíveis relações entre atributos referentes ao mofo branco e atributos de plantas de soja em áreas naturalmente infestadas com *S. sclerotiorum*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar o padrão de distribuição espacial dos atributos do mofo branco, como incidência, severidade e produção de escleródios.
- Caracterizar o padrão de distribuição espacial de atributos de planta, como estande e rendimento na cultura da soja
- Identificar relações entre os atributos da doença e planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas amostragens de malha georreferenciada em uma área de aproximadamente 12 hectares (ha) no município de Mauá-da-Serra nas safras 2013/14 (Experimento 1) e 2014/15 (Experimento 2) e outra área de quatro hectares no município de Ponta Grossa na safra 2015/16 (Experimento 3).

3.1. EXPERIMENTO 1: MAUÁ-DA-SERRA SAFRA 2013/14

A área de Mauá-da-serra apresenta histórico de ocorrência do mofo branco na soja desde a safra 2010/11 (WUTZKI et al., 2016), apresentando até 75% de incidência de *S. sclerotiorum* na safra 2012/13 (BERGER NETO, 2015) sendo a soja a única cultura de verão semeada desde a safra 2005/06.

A adubação e manejo fitossanitário foram realizadas conforme recomendações técnicas da cultura da soja, sem nenhum controle do mofo branco. A Figura 1 representa a área utilizada no estudo com a malha de amostragem.

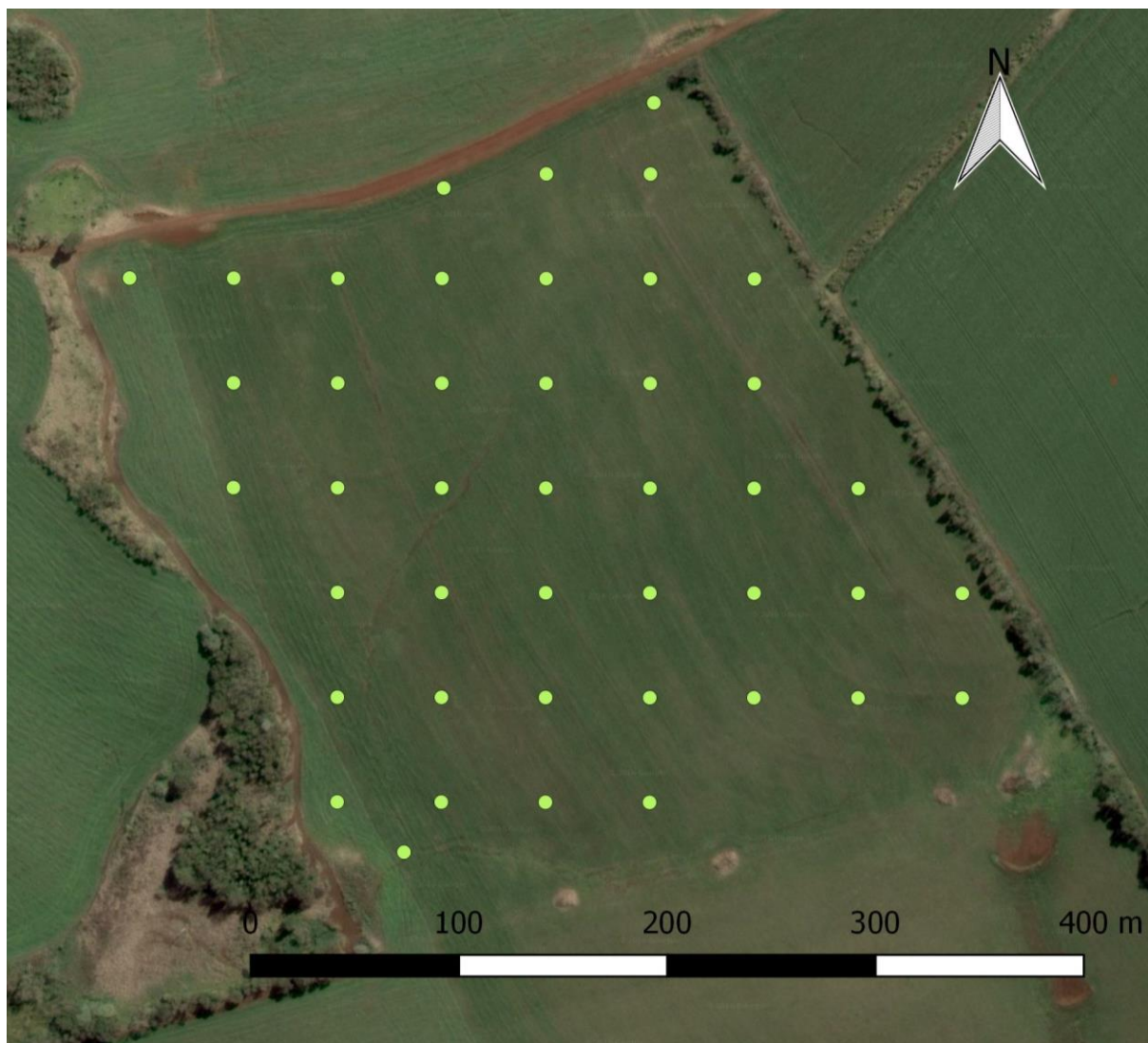


Figura 1 - Representação da área utilizada em Mauá-da-Serra, PR, na safra de 2013/14 com os 43 pontos de amostragem. Fonte: o autor.

A área foi semeada dia 29/10/2013 com a variedade FTS Ibyara RR (FT sementes, Ponta Grossa, PR, Brasil), na densidade de 11 sementes m^{-1} . Esta variedade apresenta hábito de crescimento determinado, grupo de maturação 5.9 e resistência ao acamamento (FT SEMENTES, 2017).

As amostras foram coletadas em malha com 50 m entre os pontos amostrados, com uso de receptor de sinais de satélites artificiais do sistema GPS, marca Garmin, modelo 62s, totalizando 43 amostras (Figura 2).

Em cada ponto de amostragem foi demarcado um quadrat de 7,2 m^2 (4 linhas de soja x 4 m de comprimento) onde foram realizadas as avaliações referentes aos atributos de planta.

Em cada quadrat foram avaliados:

- Número de escleródios antes da semeadura da soja, em quatro pontos de amostragem de 0,5m x 0,5m x 0,05m, totalizando 1 m² com 5 cm de profundidade, conforme metodologia proposta por Jaccoud Filho et al (2010);
- Estande da cultura no florescimento;
- Avaliação da incidência e severidade de mofo branco no estágio R5.5 da soja, em todas as plantas do quadrat;
- Rendimento de grãos;
- Número de escleródios presentes na massa de grãos.

A severidade do mofo branco foi avaliada com auxílio da escala diagramática proposta por Juliatti et al. (2013). De posse da incidência, severidade e estande de plantas nos quadrats, foi calculado o Índice de Doença conforme a equação proposta por McKinney (1923):

$$\text{Índice de Doença: } \left(\frac{\text{nota da escala utilizada} \times \text{número de plantas doentes}}{\text{número total de plantas} \times \text{valor máximo da escala}} \right) \times 100$$

3.2. EXPERIMENTO 2: MAUÁ-DA-SERRA SAFRA 2014/15

A mesma área de 12 hectares foi utilizada na safra 2014/15 com mudanças na malha de amostragem, totalizando 44 pontos de amostragem (Figura 2), para evitar a quantificação das variáveis nos mesmos pontos da safra 2013/14.

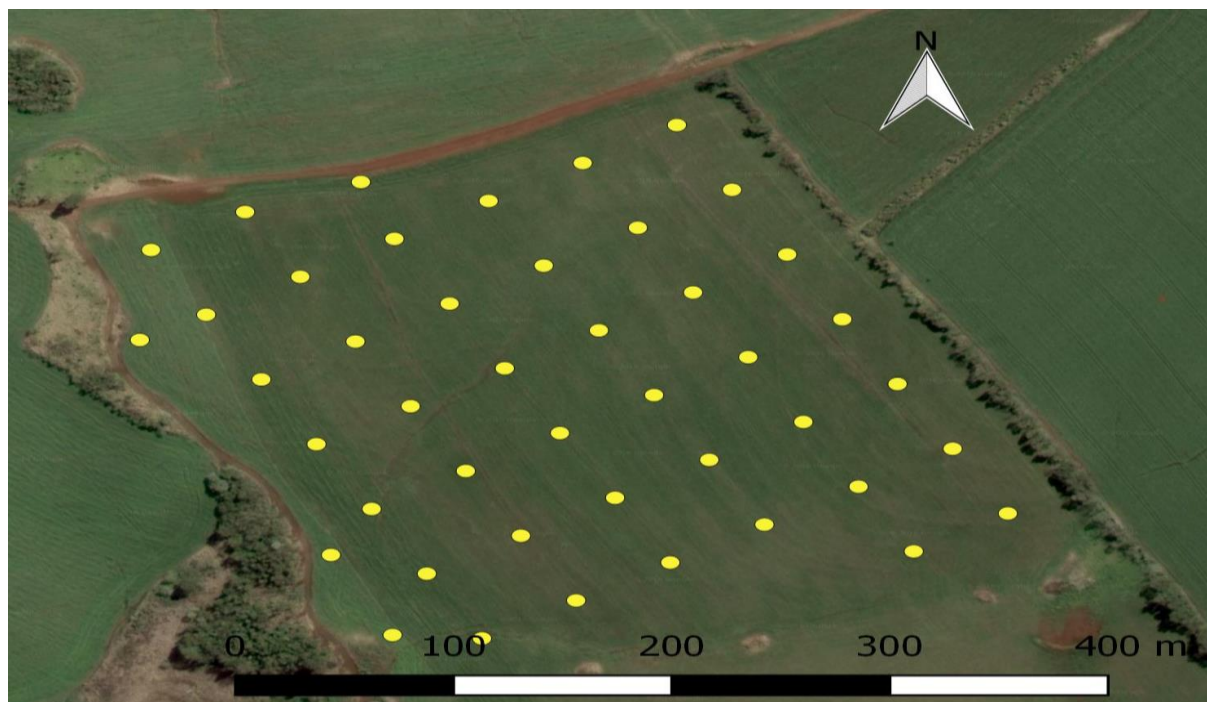


Figura 2 - Representação da área utilizada em Mauá-da-Serra, PR, na safra de 2014/15 com os 44 pontos de amostragem. Fonte: o autor.

A soja foi semeada dia 25/10/2014 com a variedade NS 6909 IPRO (Nidera sementes, São Paulo, SP, Brasil), na densidade de 13 sementes m^{-1} com espaçamento entre linhas de 0,45m. Esta variedade apresenta hábito de crescimento indeterminado e Grupo de maturação relativo 6.3 (NIDERA SEMENTES, 2015).

A metodologia e as variáveis avaliadas foram as mesmas da safra 2013/14.

3.3. EXPERIMENTO 3: PONTA GROSSA SAFRA 2015/16

Uma área de aproximadamente quatro hectares no município de Ponta Grossa – PR, com histórico de ocorrência de mofo branco na soja nas safras 2013/14 e 2014/15 foi utilizada para a realização de 95 pontos de amostragem alocados em uma malha com distância entre pontos variando de 8 a 25m (Figura 3). Em cada ponto de amostragem foi demarcado um quadrat de 7,2 m^2 (4 linhas de soja x 4 metros) onde foram realizadas as avaliações dos atributos de planta.

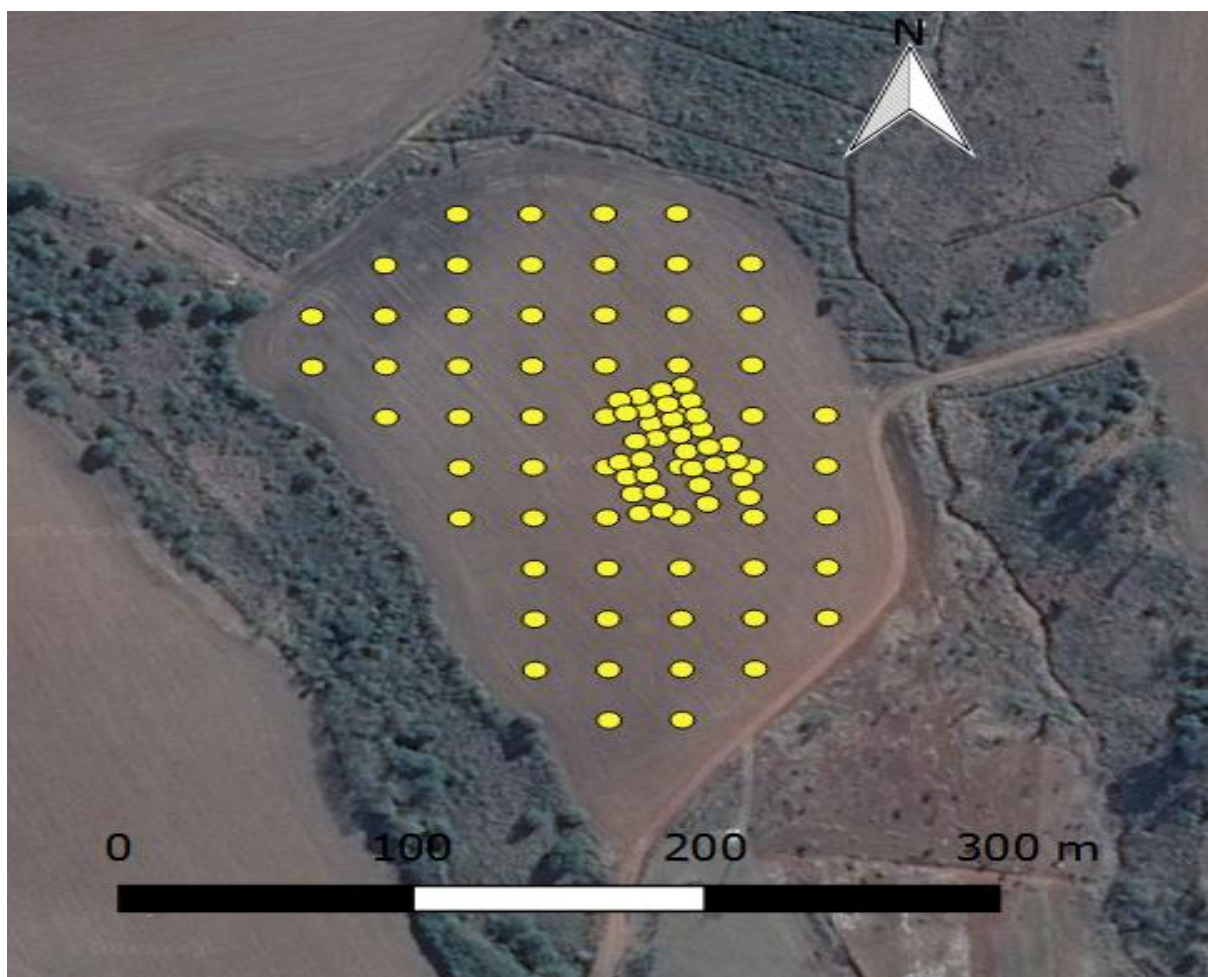


Figura 3 - Representação da área utilizada em Ponta Grossa, PR, na safra de 2015/16 com os 95 pontos de amostragem. Fonte: o autor.

Uma coleta de solo foi realizada nesta área no dia 25/09/2015 que apresentou uma infestação média de 18 escleródios m^{-2} de *S. sclerotiorum*.

A semeadura da soja foi realizada no dia 20/10/2015 com 14 semente m^{-1} e espaçamento de 0,45m entre linhas da variedade BMX Alvo RR[®] (Brasmax Genética, Cambé, PR, Brasil). Esta variedade apresenta hábito de crescimento indeterminado, grupo de maturação relativo 5.9 e resistência ao acamamento. A adubação e manejo fitossanitário foram realizados conforme as recomendações técnicas da cultura, sem nenhum método de controle para o mofo branco.

Em cada ponto de amostragem (quadrat) foram avaliados: estande da cultura; incidência e severidade do mofo branco no estágio R5.5 da soja; rendimento e a produção de escleródios na massa de grãos.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As malhas com os pontos de amostragem georeferenciados foram geradas com o uso do software Quantum GIS[®] (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2016), os semivariogramas e os mapas foram confeccionados no software VESPER[®] (MINASNY; MCBRATNEY; WHELAN, 2005). As análises estatísticas foram executadas no software action stat[®] (EQUIPE STATCAMP, 2014)

Os dados foram analisados por BoxPlot e os *outliers* foram descartados. Após a remoção dos *outliers*, o conjunto de dados de cada variável foi submetido ao resumo descritivo de estatística básica e ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

Os semivariogramas isotrópicos foram ajustados com *lags* na mesma distância da malha de amostragem, para uma distância máxima no semivariograma equivalente a 50% da maior distância observada entre dois pontos de amostragem. Com isso, cada ponto no semivariograma foi gerado a partir de 64 pares de pontos ou mais (CRESSIE, 1990; FLEISCHER; BLOM; WEISZ, 1999; JONES et al., 2011b; LANDIM, 2006; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993; RIBEIRO JUNIOR, 2004).

Para avaliar o melhor ajuste dos modelos possíveis foi utilizado o Critério de Akaike (AIC), sendo o menor valor considerado de melhor ajuste (RIBEIRO JUNIOR, 2004; WEBSTER; MCBRATNEY, 1989)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DADOS METEOROLÓGICOS

Para o experimento 1, os dados meteorológicos disponíveis mais próximos foram da estação de Apucarana, a 47 km de distância do local do experimento. Para o experimento 2, os dados meteorológicos disponíveis mais próximos foram de Telêmaco Borba, a 64 km de distância. Apesar da distância significativa entre as estações meteorológicas e a área do experimento, a temperatura, que é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento do mofo branco, pode ser estimada através da diferença de altitude (FRITZSON; MANTOVANI; AGUIAR, 2008).

Em trabalho utilizando dados históricos do IAPAR, SIMEPAR e INMET, de todas as estações meteorológicas do Paraná (exceto a região litorânea) (FRITZSON; MANTOVANI; AGUIAR, 2008) observaram que existe forte correlação entre altitude e temperaturas médias do mês de janeiro em todo o estado do Paraná, concluindo que ocorre uma diminuição de 1°C na temperatura a cada 126 metros de ascensão vertical, sugerindo essa correção para estimar as temperaturas de uma região que não apresenta estação meteorológica próxima.

Baseado no trabalho de Fritzson; Mantovani e Aguiar (2008), as temperaturas mínimas, médias e máximas foram ajustadas para a área do experimento 1 e 2 (1080m de altitude) a partir dos dados das estações meteorológicas de Apucarana (746 m altitude) e Telêmaco Borba (796m de altitude). Vale ressaltar que a umidade relativa e a precipitação utilizadas foram dados dos locais das estações meteorológicas, utilizados como referência para a região, já que não foram observados períodos prolongados sem chuva nos experimentos 1 e 2, conforme comunicação pessoal do produtor que conduzia as áreas no período dos experimentos. No experimento 3 a estação meteorológica de referência estava localizada a 7 km da área do experimento, sem diferença de altitude significativa.

Durante o ciclo da soja no experimento 1 foram observadas temperatura mínima de 9,9°C, umidade relativa mínima de 61% no início do período vegetativo, temperatura máxima ao redor de 35°C no início do florescimento e enchimento de grãos, com precipitação total acumulada de 1081 mm e ausência de períodos longos (>15 dias) sem precipitação (Figura 4).

A soja adapta-se a regiões com temperaturas variando entre 10 e 40°C, com o melhor desenvolvimento na faixa de 20 a 30°C e com precipitação mínima acumulada de 450 a 800mm bem distribuídos durante o ciclo da cultura (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007). Conforme os dados meteorológicos (Figura 4), todas as variáveis meteorológicas observadas estavam adequadas para o pleno desenvolvimento da cultura da soja no experimento 1.

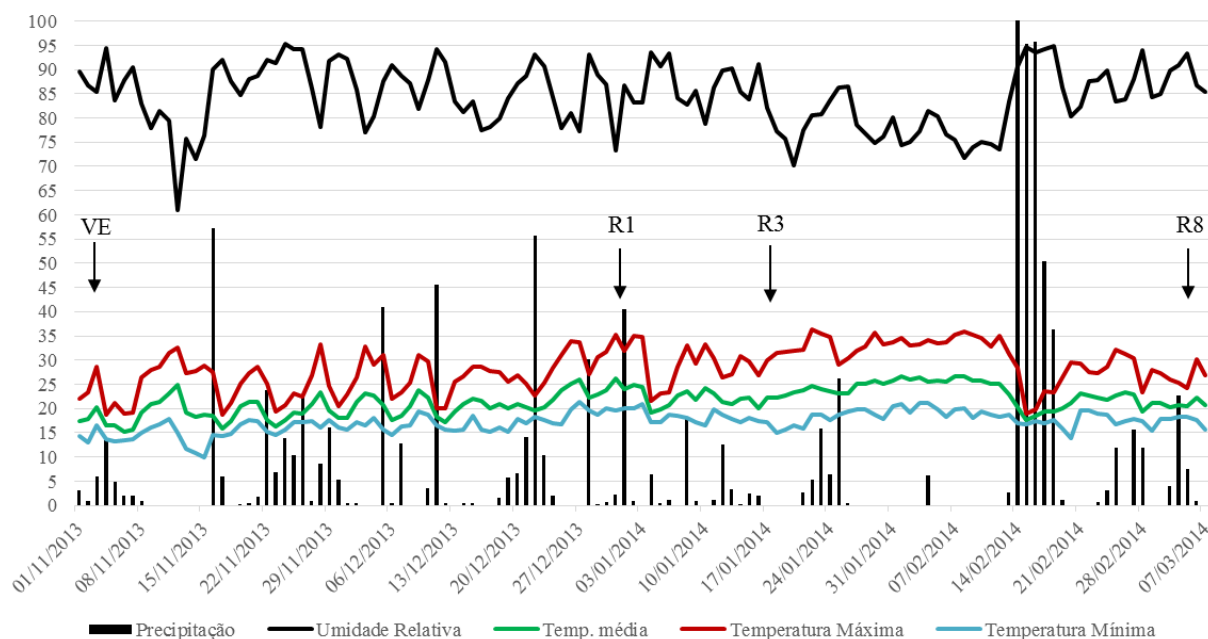


Figura 4 - Dados meteorológicos observados em Apucarana – PR utilizados como referência para o experimento 1 conduzido em Mauá-da-Serra na safra 2013/14, com correção de temperatura. Fonte: SIMEPAR. VE: emergência; R1: início do florescimento; R3: início formação das vagens; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977)

Durante o ciclo da soja no experimento 2 foram observadas temperatura mínima de 7,3 °C e a umidade relativa mínima de 56% no início período vegetativo e a temperatura máxima de 33,7°C no final do florescimento, com precipitação total acumulada de 830 mm e ausência períodos longos (>15 dias) sem precipitação (Figura 5).

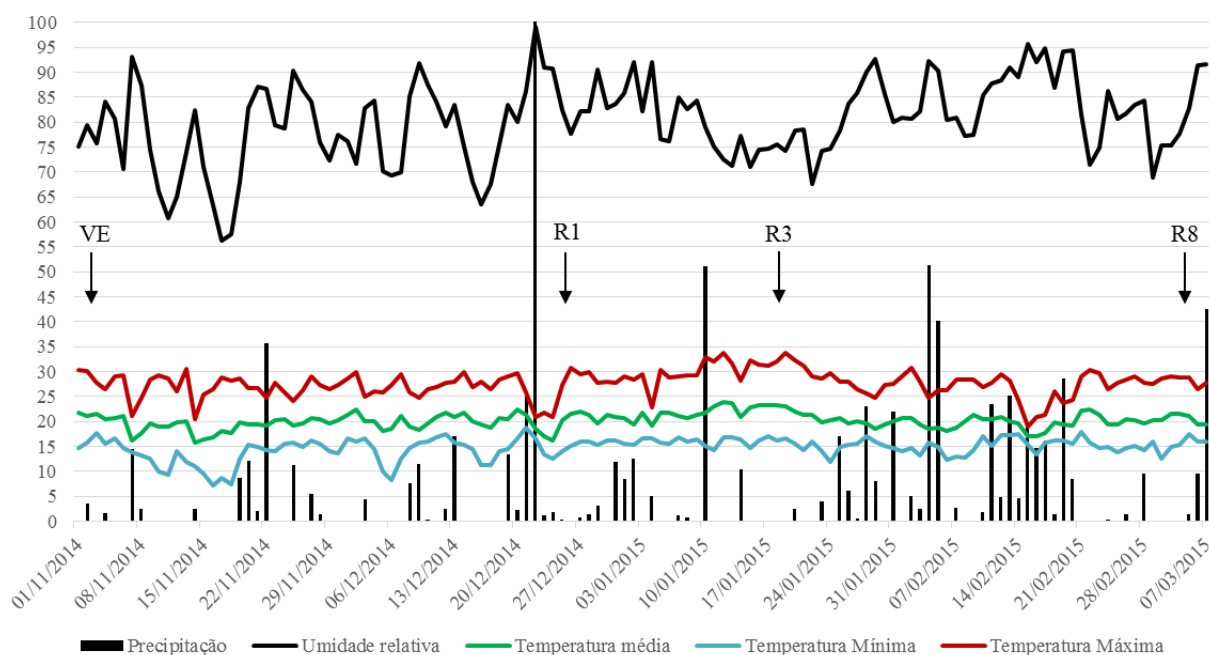


Figura 5 - Dados meteorológicos observados em Telêmaco Borba – PR utilizados como referência para o experimento 2, conduzido em Mauá-da-Serra na safra 2014/15, com correção de temperatura. Fonte: SIMEPAR. VE: emergência; R1: início do florescimento; R3: início formação das vagens; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977)

Durante o ciclo da soja no experimento 3, a temperatura mínima observada foi 13,1 °C, a temperatura máxima de 30,5°C, a umidade relativa mínima de 66,7% e o total acumulado de precipitação foi de 937 mm (Figura 6).

No experimento 3, a temperatura e umidade relativa observadas estavam adequadas ao pleno desenvolvimento da cultura da soja, ressalvando-se que, durante a formação de vagens e início do enchimento de grãos, ocorreu um período de 15 dias sem precipitação (veranico) (Figura 6), que provavelmente não causou sérios danos à cultura pois anteriormente a esse veranico foram observadas chuvas regulares e intensas, além de que as temperaturas máximas se mantiveram na faixa dos 25 a 30°C, diminuindo o potencial de evapotranspiração durante este período (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

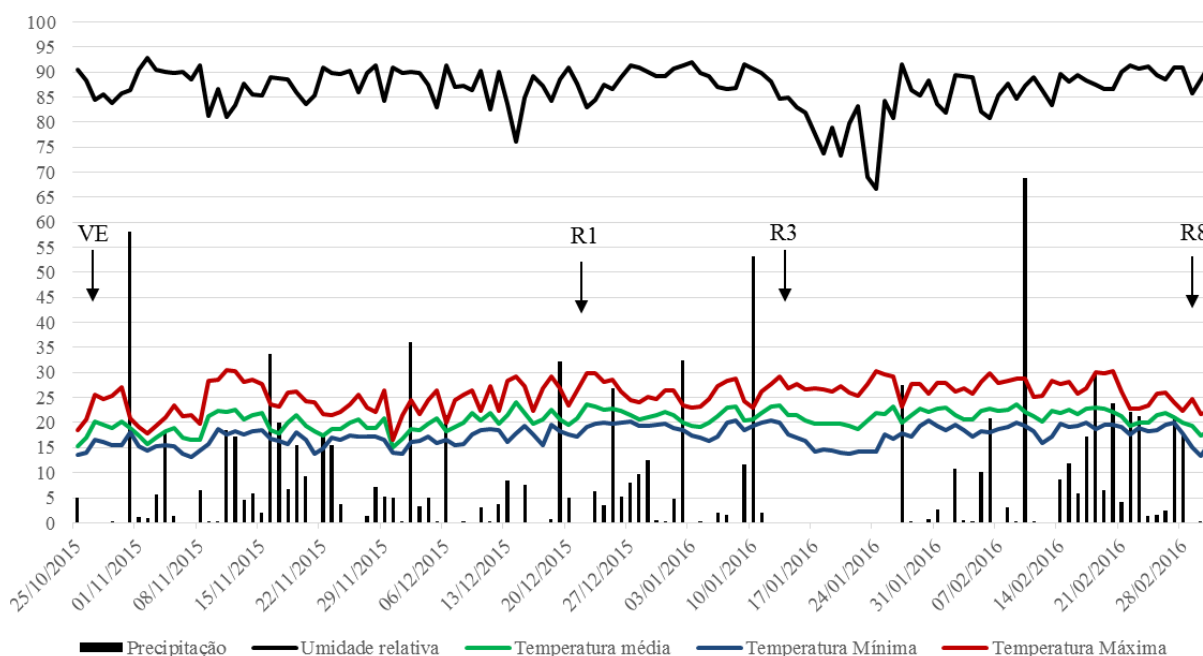


Figura 6 - Dados meteorológicos observados na Fazenda Escola Capão da Onça, utilizados como referência para o experimento 3 conduzido em Ponta Grossa na safra 2015/16. Fonte: Mini Farm BASF. VE: emergência; R1: início do florescimento; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977)

Para que ocorra a germinação carpogênica dos escleródios e infecção na soja, *S. sclerotiorum* requer de alta umidade relativa do ar e do solo, além de temperaturas entre 15 a 24°C durante o período de pré-florescimento e florescimento da cultura da soja (ABAWI; GROGAN, 1979; AGHAJANI; SAFAIE; ALIZADEH, 2010; BOLAND; HALL, 1988a; COLEY-SMITH; COOKE, 1971; HUANG, 1985; PURDY, 1979; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978; SUN; YANG, 2000).

Durante o período de pré-florescimento (10 dias antes de R1) é necessário alta umidade relativa do solo e temperaturas amenas para estimular a germinação e produção de apotécios,

que irão liberar ascósporos quando do florescimento da cultura (ABAWI; GROGAN, 1979; BOLAND; HALL, 1988a, 1988b; HUANG et al., 2006). Devido a isso, o período de pré-florescimento + florescimento foram utilizados para a observação das condições meteorológicas referentes a infecção do mofo branco, totalizando 27 dias para o experimento 1 e 35 dias para os experimentos 2 e 3 (Figuras 4, 5 e 6).

Durante o pré-florescimento + florescimento da soja no experimento 1, foram estimadas as médias de temperaturas mínima, média e máxima de 18,5; 22,5 e 29,5°C, respectivamente, com umidade relativa média de 85,8% e total de precipitação de 191,8 mm (Figura 4). No experimento 2 foram estimadas as médias de temperaturas mínima, média e máxima de 15,5; 21 e 28,6°C, respectivamente, com umidade relativa média de 80,4% e total de precipitação de 285 mm (Figura 5). Já no experimento 3, as médias de temperaturas mínima, média e máxima foram de 18,7; 21,5 e 26,2°C, respectivamente, com umidade relativa média de 87,7% e total de precipitação de 239 mm (Figura 6).

Como descrito no parágrafo anterior, a média da temperatura e a umidade relativa foram adequadas para o desenvolvimento do mofo branco na soja para os 3 experimentos. O volume de precipitação também foi adequado, visto que dados relatados por Wutzki (2014), sugerem um mínimo de 100 mm de precipitação bem distribuídos durante o período de pré-florescimento + florescimento da soja para ocorrência de mofo branco em áreas com histórico da doença no estado do Paraná.

Após o florescimento da soja no experimento 3, pode-se observar um período sem precipitação (veranico) com diminuição da umidade relativa média (Figura 6), o que provavelmente não afetou a infecção do patógeno, mas pode ter influenciado negativamente no desenvolvimento do mofo branco, acarretando em uma menor severidade e consequentemente nível menores do índice de doença para este experimento.

4.2. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

A análise por boxplot sugeriu a existência de dados discrepantes (*outliers*) nos dados do experimento 1, que foram removidos nas variáveis escleródios do solo (Esc. Solo) e escleródios na colheita (Esc. Colheita) (Tabela 1). Contudo, mesmo com a retirada de alguns *outliers*, observa-se grande variabilidade nos atributos referentes ao mofo branco, especialmente na variável escleródios do solo, sendo a única variável que não apresentou distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk ($P \leq 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); máximos (Máx); média (Med); mediana (Men); desvio padrão (DP); coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 1, Mauá-da-Serra, PR, safra 2013/14

Variável	Un	N	Mín	Máx	Med	Men	DP	CV(%)	Asm	Crt	SW ¹
Estande	pl m ⁻¹	43	7,9	12,9	10	9,8	1,1	11	0,4	-0,3	0,98 ^{NS}
Esc. Solo	un m ⁻²	41 ¹	0,0	24,0	5,8	4,0	7,9	136	1,2	-0,1	0,73*
Incidência	%	43	3,6	27,4	18,6	19,0	5,3	29	-0,5	-0,1	0,97 ^{NS}
Índice doença		43	1,8	19,7	10,8	10,9	4,0	37	-0,1	-0,5	0,99 ^{NS}
Rendimento	Kg ha ⁻¹	43	1978	3045	2505	2554	287,4	11	0,0	-0,9	0,97 ^{NS}
Esc. colheita	un m ⁻²	42 ¹	13,3	62,0	35,7	37,4	13,7	38	0,1	-1,0	0,97 ^{NS}

Un: unidade; N: número de amostras; Esc. escleródios; Pl m⁻¹: número de plantas de soja em um metro de linha de semeadura; ¹Remoção de dados discrepantes pela análise de BoxPlot; SW: Teste de Shapiro-Wilk: *= significativo a p≤0,05 (rejeita-se hipótese de distribuição normal dos dados) e ^{NS}= não significativo (aceita-se a hipótese de distribuição normal dos dados).

Nos experimentos 2 (Tabela 2) e 3 (Tabela 3), pode-se observar que apenas as variáveis estande e rendimento apresentaram distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk, p>0,05), corroborado pelo coeficiente de assimetria que apresentou valores tendendo a zero, e pela proximidade dos valores da média e mediana, indicando uma distribuição central dos dados no histograma (CRESSIE, 1990).

Tabela 2 - Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); máximos (Máx); média (Med); mediana (Men); desvio padrão (DP); coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 2, em Mauá-da-Serra, PR, na safra 2014/15.

Variável	Un	N	Mín	Máx	Med	Men	DP	CV(%)	Asm	Crt	SW ¹
Estande	pl m ⁻¹	44	9,4	13,6	11,7	11,8	1,1	9,1	-0,1	-0,8	0,97 ^{NS}
Esc. Solo	un m ⁻²	44	0,0	12,0	3,2	2,0	3,5	111	1,1	0,1	0,83*
Incidência	%	44	1,0	20,4	7,4	6,6	5,1	68,8	0,6	-0,6	0,93*
Índice doença		44	0,3	15,4	4,9	4,2	3,9	79,9	0,8	-0,3	0,90*
Rendimento	Kg ha ⁻¹	44	3001	3813	3446	3462	236,8	6,8	-0,1	-1,2	0,97 ^{NS}
Esc. colheita	un m ⁻²	44	0	10,4	3,4	2,6	2,7	80,0	0,7	-0,3	0,93*

Un: unidade; N: número de amostras; Esc. escleródios; Pl m⁻¹: número de plantas de soja em um metro de linha de semeadura; ¹ Teste de Shapiro-Wilk: *= significativo a p≤0,05 (rejeita-se hipótese de distribuição normal dos dados) e ^{NS}= não significativo (aceita-se a hipótese de distribuição normal dos dados).

Pode-se verificar que a média da incidência e do índice de doença foi menor nos experimentos 2 e 3 (Tabelas 2 e 3, respectivamente) quando comparados ao experimento 1 (Tabela 1). Cabe ressaltar que apenas no experimento 3 foram observados valores mínimos iguais a zero para incidência e índice de doença, ou seja, apenas o experimento 3 apresentou quadrats sem a ocorrência do mofo branco (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise estatística descritiva correspondente aos valores mínimos (Mín); máximos (Máx); média (Med); mediana (Men); desvio padrão (DP); coeficiente de variação (CV); assimetria (Asm); curtose (Crt) e teste de Shapiro-Wilk (SW) referentes as variáveis avaliadas no experimento 3, em Ponta Grossa, PR, na safra 2015/16.

Variável	Un	N	Mín	Máx	Med	Men	DP	CV(%)	Asm	Crt	SW ¹
Estande	pl m ⁻¹	95	8,2	13,1	10,6	10,6	1,0	9,4	-0,1	-0,3	0,99 ^{ns}
Incidência	%	95	0,0	32,9	11,9	10,7	7,8	65,7	0,6	-0,1	0,95*
Índice doença		95	0,0	19,8	5,6	4,5	4,8	84,5	1,0	0,5	0,91*
Rendimento	Kg ha ⁻¹	95	1936	3970	2950	2963	427	14,5	0,0	-0,4	0,99 ^{ns}
Esc. colheita	un m ⁻²	95	0,8	83,9	21,1	15,7	18,5	87,6	1,5	1,6	0,84*

Un: unidade; N: número de amostras; Esc. escleródios; Pl m⁻¹: número de plantas de soja em um metro de linha de semeadura; ¹ Teste de Shapiro-Wilk: *= significativo a p≤0,05 (rejeita-se hipótese de distribuição normal dos dados) e ^{ns}= não significativo (aceita-se a hipótese de distribuição normal dos dados).

De maneira geral, as variáveis referentes ao mofo branco (escleródios no solo, incidência, índice de doença e escleródios na colheita) apresentaram coeficientes de variação considerados muito altos (PIMENTEL-GOMES, 1985), porém, as variáveis estande e rendimento apresentaram coeficientes de variação baixos ou moderados, indicando que a metodologia de amostragem foi adequada (CARVALHO et al., 2003) e que a variabilidade presente nas variáveis referentes ao mofo branco são características deste patossistema.

A grande variabilidade nas variáveis avaliadas referentes ao mofo branco demonstram a ocorrência errática deste patógeno em lavouras de soja, conforme observado em outros estudos (BOLAND; HALL, 1988b; CLARKSON et al., 2013; JACCOUD-FILHO et al., 2016; JACCOUD FILHO et al., 2010; NASSER et al., 1999), salientando a importância de técnicas de geoestatística para o estudo do mofo branco na soja, já que a estatística convencional apresenta dificuldade em analisar este tipo de conjunto de dados (BERGAMIN FILHO et al., 2004; CAMPBELL; NOE, 1985; CORREIA, 2010; COULSON, 1992; CRESSIE, 1990; GUERRA, 1988; HUGHES, 1999; MADDEN; HUGHES, 1999; LANDIM, 2006; LIEBHOLD; ROSSI; KEMP, 1993; NELSON et al., 1999; PIMENTEL-GOMES, 1985; RIBEIRO JUNIOR, 2004; WHITE; GILLIGAN, 1998).

4.3. SEMIVARIOGRAMAS

Todas as variáveis analisadas no experimento 1, com exceção do rendimento, foram espacialmente independentes na malha de amostragem utilizada, caracterizadas como Efeito Pepita Puro (EPP) (Tabela 4, figura 7).

O EPP indica distribuição casual ou aleatória, ou seja, não foi possível caracterizar a variabilidade devido a erros de medida, variação não explicada e/ou o espaçamento de amostragem utilizado ser maior que o necessário para identificar a dependência espacial

(CAMBARDELLA et al., 1994; GUIMARÃES, 2004; HUGHES, 1999b; LANDIM, 2006; RIBEIRO JUNIOR, 2004).

Tabela 4 - Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 1, Mauá-da-Serra, PR, safra 2013/14.

Variável	Modelo	Ep	Pt	A (m)	AIC	EPR
Estande	EPP					
Esc. solo	EPP					
Incidência	EPP					
Índice doença	EPP					
Rendimento	Esf	26121	86492	182	82,8	0,30
Esc. colheita	EPP					

EPP: efeito pepita puro; Esf: esférico; Ep: efeito pepita; Pt: patamar; A: alcance; AIC: critério de Akaike; Epr: efeito pepita relativo; Esc: escleródios.

A variável rendimento, por outro lado, apresentou ajuste ao modelo Esférico com alcance de 182m e Efeito Pepita relativo de 0,30 (Tabela 4, figura 7). O modelo esférico descreve fenômenos com alta continuidade espacial e é comumente utilizada para descrever o rendimento (CAMBARDELLA et al., 1994; CRESSIE, 1990; FARACO, 2006; GUERRA, 1988; JONES et al., 2011b; LANDIM, 2006; RIBEIRO JUNIOR, 2004).

O EPR de 0,30 (Tabela 4) indica que a componente aleatória é significativa, segundo a classificação de Garcia (1988), indicando que há variabilidade não explicada, conforme pode ser observado no ajuste do semivariograma do rendimento (Figura 7 E), já que o modelo esférico não tem sua origem no valor zero do eixo y (eixo da variância). Contudo, resultados semelhantes são encontrados na literatura (CARVALHO, 2008; FARACO et al., 2008; FLORA, 2013; FARACO et al., 2008)

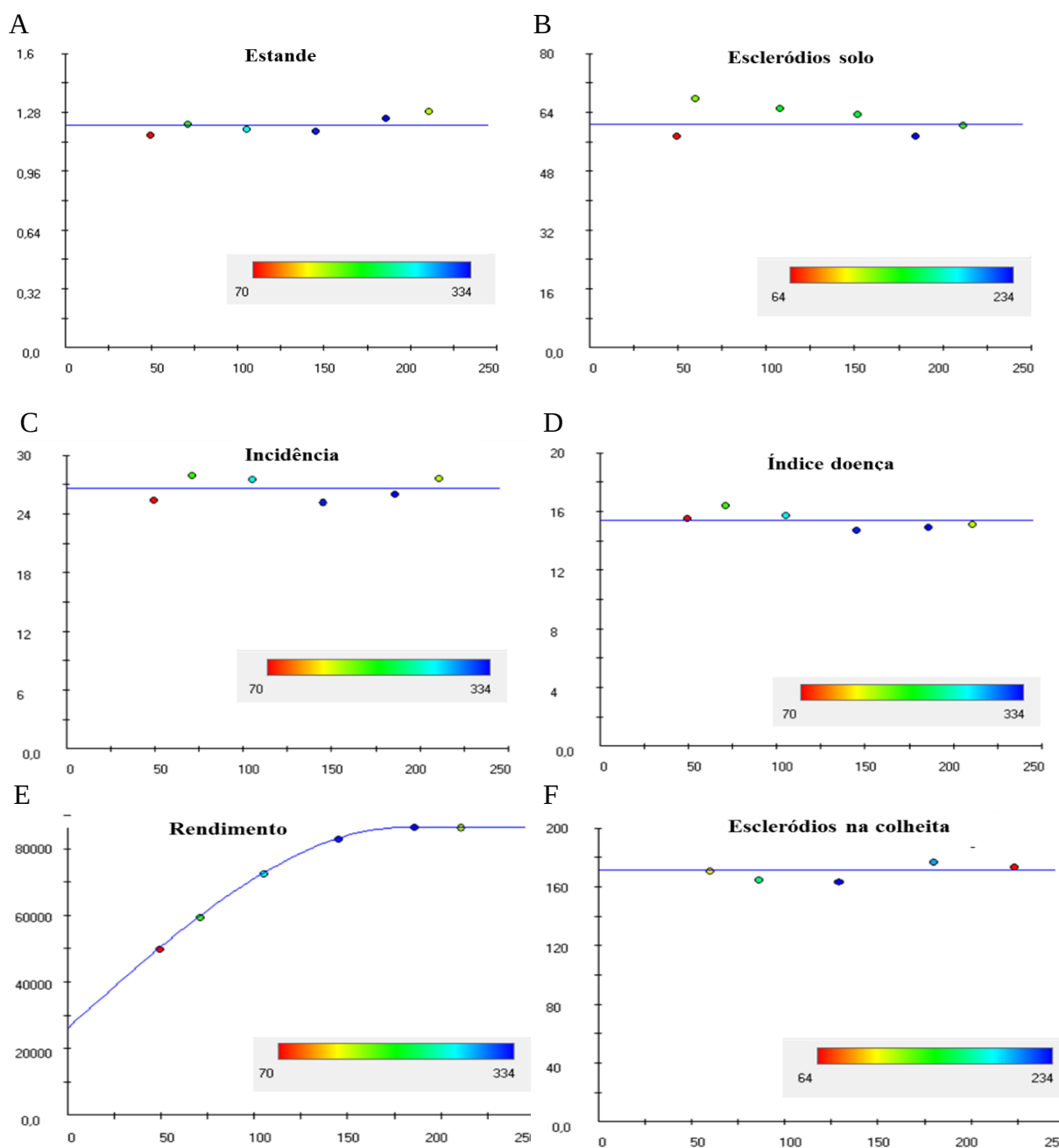


Figura 7 - Semivariogramas isotrópicos ajustados para as variáveis avaliadas no experimento 1 - Mauá-da-Serra, safra 2013/14: A) estande; B) escleródios recuperados do solo; C) incidência do mofo branco; D) índice de doença; E) rendimento da soja; F) escleródios produzidos na colheita. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada ponto no semivariograma.

No experimento 2 (Tabela 5, figura 8), semelhantemente ao observado no experimento 1 (Tabela 4), a variável escleródios no solo apresentou EPP, evidenciando a dificuldade de estudo desta variável, já que a realização da quantificação dos escleródios do solo em malhas de amostragens com distâncias menores que a utilizada torna-se inviável, devido ao intenso trabalho de coleta das amostras, peneiramento do solo e separação e quantificação dos escleródios. Contudo, a metodologia de coleta e quantificação dos escleródios no solo é útil para identificação de áreas infestadas com *S. sclerotiorum* (JACCOUD FILHO et al., 2010).

As variáveis estande e escleródios na colheita apresentaram ajuste ao modelo esférico (Tabela 5, figura 8) com a componente aleatória significativa e alcances de 155,4 e 95,6 m, respectivamente. Ainda no experimento 2, a incidência apresentou ajuste ao modelo exponencial com alcance prático de 161,2 m, e o índice de doença ajustou-se melhor ao modelo linear, sendo que ambas variáveis apresentaram componente aleatória muito significativa (Tabela 5, figura 8). O rendimento não apresentou dependência espacial.

Tabela 5 - Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 2 - Mauá-da-Serra, safra 2014/15.

Variável	Modelo	Ep	Pt	A (m)	AP	AIC	EPR
Estande	Esf	0,3	1,1	155,4		-16,3	0,25
Esc Solo	EPP						
Incidência	Exp	11,8	27,7	90,7	161,2	19,1	0,43
Índice doença	Linear	9,7	21,1	-		13,8	0,46
Rendimento	EPP						
Esc. Colheita	Esf	2,2	8,4	95,6		3,0	0,26

EPP: Efeito Pepita Puro; Esf: Esférico; Exp: Exponencial; Ep: Efeito Pepita; Pt: patamar; A: alcance; AP: alcance prático (95% do patamar). AIC: Critério de Akaike; Epr: Efeito Pepita Relativo; Esc: Escleródios.

No experimento 3, foi aumentado o número de pontos de amostragem por área quando comparado aos experimentos 1 e 2. Esta menor distância entre os pontos amostrados mostrou-se acertada, já que foi possível caracterizar a dependência espacial em todas as variáveis avaliadas, com exceção dos escleródios na colheita (Tabela 6, figura 9).

As variáveis estande e índice de doença apresentaram melhor ajuste ao modelo esférico com alcances de 46,7 e 42,3 m, respectivamente (Tabela 6, figura 9). Como pode-se observar, o alcance do índice de doença foi menor que 50 m, o que pode justificar a ausência de dependência espacial para esta variedade nos experimentos 1 e 2, que utilizaram uma malha de amostragem com 50 m entre pontos amostrados (Figuras 1 e 2).

As variáveis estande, incidência e índice de doença apresentaram uma componente aleatória muito significativa (Tabela 6, figura 9), ou seja, o erro associado a estes semivariogramas foi alto, exigindo cautela na interpretação dos resultados. Por outro lado, a variável rendimento apresentou a componente aleatória pequena ou pouco expressiva, apresentando melhor ajuste ao modelo exponencial com um alcance prático de 94,6 m (Tabela 6, figura 9).

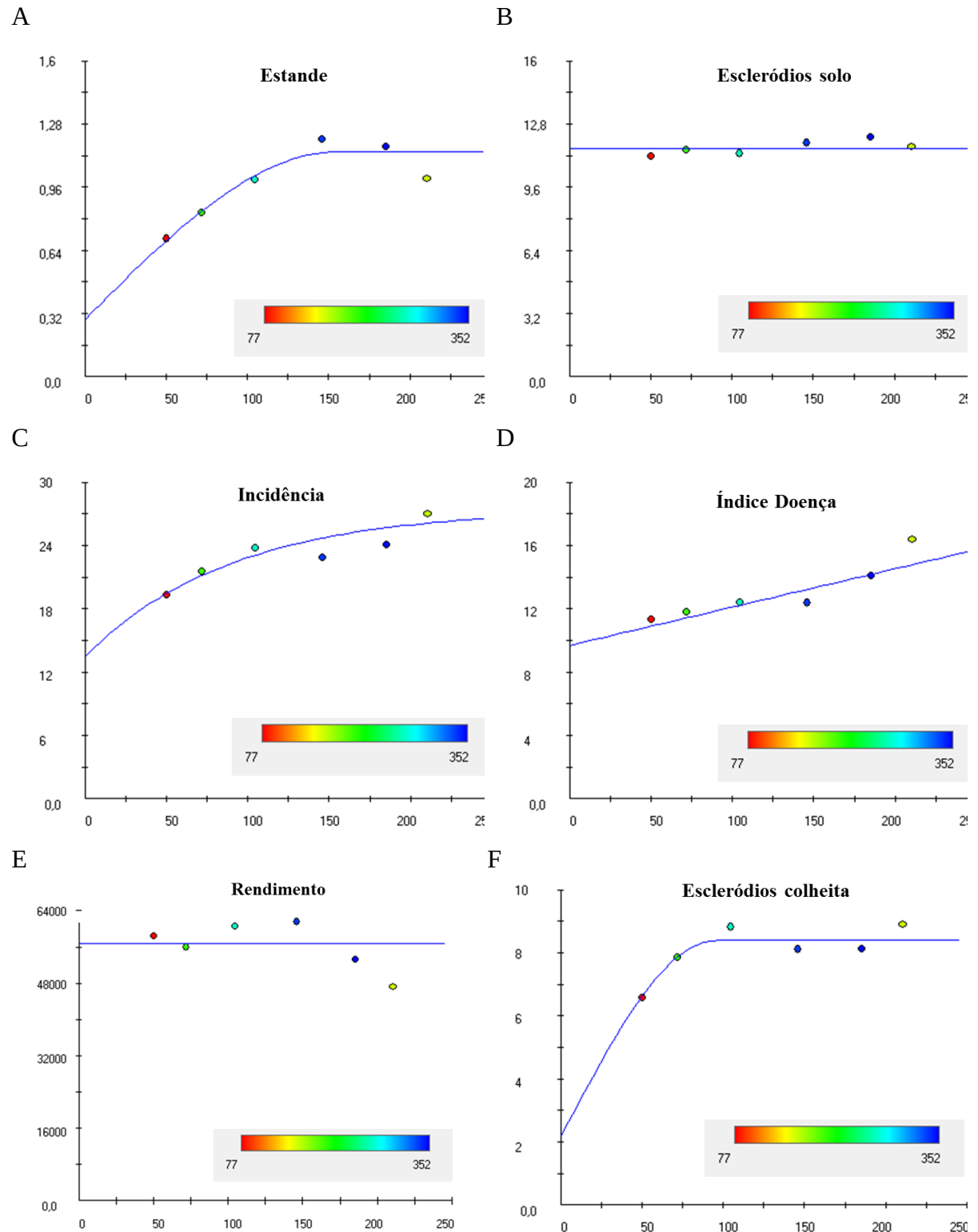


Figura 8 - Semivariogramas isotrópicos ajustados para as variáveis analisadas no experimento 2, safra 2014/15 em Mauá-da-Serra: A) estande; B) escleródios presentes no solo (m^2); C) incidência; D) índice de doença; E) rendimento; F) escleródios produzidos na colheita. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada distância no semivariograma.

Tabela 6 - Modelos e parâmetros estimados dos semivariogramas das variáveis avaliadas no experimento 3 – Ponta Grossa, safra 2015/6.

Variável	Modelo	Ep	Pt	A (m)	AP	AIC	EPR
Estande	Esf	0,8	1,1	46,7		-43,1	0,71
Incidência	Exp	38,8	66,0	37,6	78,4	33,8	0,59
Índice de doença	Esf	14,2	25,5	42,3		12,6	0,56
Rendimento	Exp	24430	216531	33,2	94,6	184,9	0,11
Esc. Colheita	EPP						

EPP: efeito Pepita Puro; Esf: esférico; Exp: exponencial; gau: Gaussiano; Ep: efeito Pepita; Pt: patamar; A: alcance; AP: alcance prático (95% do patamar); AIC: critério de Akaike; Epr: efeito pepita relativo; Esc: escleródios.

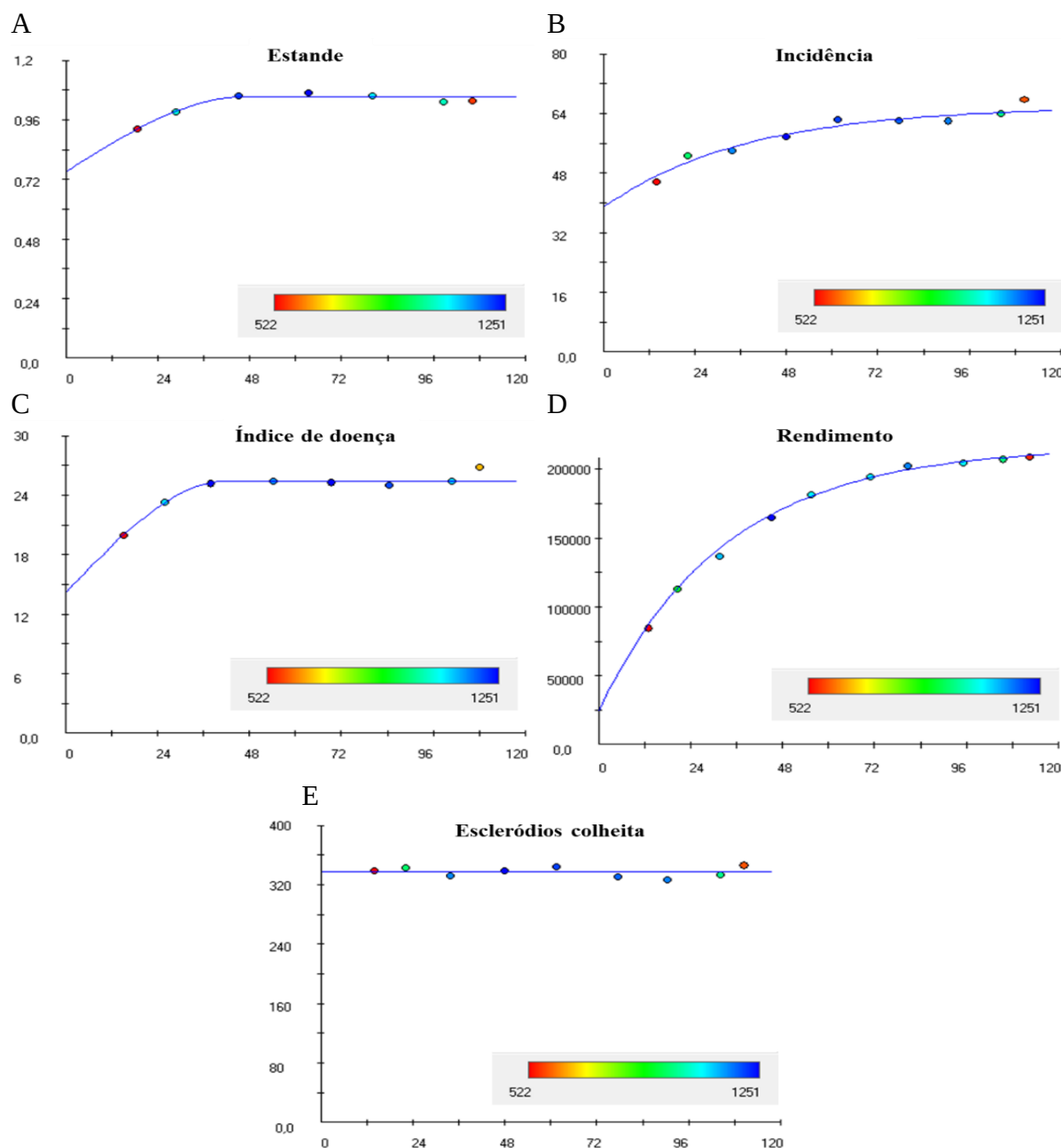


Figura 9 - Semivariogramas isotrópicos para as variáveis analisadas no experimento 3, Ponta Grossa, safra 2015/16. A) estande; B) incidência; C) índice de doença; D) rendimento; E) escleródios recuperados da massa de grãos. Observação: a barra colorida indica o número de pares utilizados em cada distância no semivariograma.

Ao intensificar o número de pontos amostrados, o número de pares disponíveis para gerar o semivariograma é maior, aumentando a qualidade do ajuste. Porém, como o número de pontos amostrados por área foi elevado, e os escleródios no solo apresentou EPP nos dois experimentos anteriores, optou-se por não realizar a quantificação dos escleródios no solo no experimento 3, já que seria necessário o processamento de aproximadamente 1728 kg de solo que demandaria aproximadamente 256 horas de trabalho entre coleta, secagem, moagem e peneiramento do solo, e a separação, identificação e quantificação dos escleródios.

4.4. MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

O grau de relação linear entre duas variáveis é indicado pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), e sua significância é dada pelo valor de p . O coeficiente de Pearson (r) pode variar de -1 a 1, sendo que valores negativos indicam relação inversamente proporcional e valores positivos indicam relação positiva entre as variáveis. Valor de r igual zero indica a ausência de correlação. De acordo com Franzblau (1958), pode-se interpretar a magnitude da relação entre duas variáveis como com o valor de r , sendo que: se $|r| < 0,20$, a correlação é negligenciável; se $0,20 < |r| < 0,40$, a correlação é fraca; se $0,40 < |r| < 0,60$, a correlação é moderada; se $0,60 < |r| < 0,80$, a correlação é forte e se $|r| > 0,80$, a correlação é muito forte.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 podem ser observadas as matrizes de correlação de Pearson para as variáveis avaliadas nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Pode-se observar que a variável estande não apresentou relação significativa com nenhuma outra variável em nenhum dos três experimentos.

Tabela 7 - Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 1 – Mauá-da-Serra, safra 2013/14.

	Estande	Esc S	Inc	ID	Rend	Esc C
Estande	1,00	-0,25	0,19	0,23	0,06	0,22
p-valor	1,000	0,112	0,231	0,144	0,713	0,164
Esc S	-0,25	1,00	0,11	0,06	-0,10	0,09
p-valor	0,112	1,000	0,497	0,707	0,526	0,563
Inc	0,19	0,11	1,00	0,86*	-0,51*	0,59*
p-valor	0,231	0,497	1,000	0,000	0,001	0,000
ID	0,23	0,06	0,86*	1,00	-0,44*	0,45*
p-valor	0,144	0,707	0,000	1,000	0,004	0,004
Rend	0,06	-0,10	-0,51*	-0,44*	1,00	0,07
p-valor	0,713	0,526	0,001	0,004	1,000	0,659
Esc C	0,22	0,09	0,59*	0,45*	0,07	1,00
p-valor	0,164	0,563	0,000	0,004	0,659	1,000

Esc S: escleródios recuperados do solo; Inc: incidência; ID: índice de doença; Rend: rendimento; Esc C: escleródios recuperados massa de grãos na colheita; *: correlação significativa $p \leq 0,05$.

A variável escleródios do solo não apresentou relação com nenhuma outra variável no experimento 1 (Tabela 7), mas apresentou correlação positiva com as variáveis incidência, índice de doença e escleródios na colheita no experimento 2 (Tabela 8). Ainda no experimento 2 a variável escleródio no solo apresentou correlação negativa com a variável rendimento (Tabela 8). Vale lembrar que no experimento 2, as médias de escleródios no solo, incidência e índice de doença foram menores (Tabela 1) quando comparadas ao experimento 1 (Tabela 2), demonstrando o comportamento variável e dificuldade de previsão do mofo branco na soja com base na quantificação de escleródios no solo.

Tabela 8 - Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 2 – Mauá-da-Serra, safra 2014/15.

	Esc_S	Estande	Inc	ID	Rend	Esc_C
Esc_S	1,00	0,04	0,49*	0,47*	-0,31*	0,53*
p-valor	1,000	0,811	0,001	0,001	0,042	0,000
Estande	0,04	1,00	-0,22	-0,21	0,07	-0,24
p-valor	0,811	1,000	0,156	0,168	0,669	0,123
Inc	0,49*	-0,22	1,00	0,97*	-0,36*	0,79*
p-valor	0,001	0,156	1,000	0,000	0,015	0,000
ID	0,47*	-0,21	0,97*	1,00	-0,32*	0,77*
p-valor	0,001	0,168	0,000	1,000	0,032	0,000
Rend	-0,31*	0,07	-0,36*	-0,32*	1,00	-0,40*
p-valor	0,042	0,669	0,015	0,032	1,000	0,007
Esc_C	0,53*	-0,24	0,79*	0,77*	-0,40*	1,00
p-valor	0,000	0,123	0,000	0,000	0,007	1,000

Esc S: escleródios recuperados do solo; Inc: incidência; ID: índice de doença; Rend: rendimento; Esc C: escleródios recuperados massa de grãos na colheita; *: correlação significativa $p \leq 0,05$.

As variáveis incidência e índice de doença apresentaram correlação positiva com os escleródios na colheita nos três experimentos (Tabela 7, 8 e 9) além de apresentaram forte correlação entre si. O índice de doença apresentou correlação negativa com o rendimento nos três experimentos, e a incidência também apresentou correlação negativa com o rendimento no experimentos 1 e 2 (Tabelas 7, 8 e 9), demonstrando a estabilidade da correlação entre essas variáveis e os danos que o mofo branco pode causar à cultura da soja (HOFFMAN et al., 1998; KURLE et al., 2001; PELTIER et al., 2012).

A quantificação de escleródios no solo apresentou resultados inconsistentes e nenhum ou baixo coeficiente de correlação com as variáveis relacionadas ao mofo branco na soja, além de ser uma metodologia que demanda muito trabalho. Devido a isso, constatou-se a necessidade de estudar métodos para identificar e quantificar a presença de ascósporos de *S. sclerotiorum*

durante o florescimento da cultura da soja e suas prováveis relações com a incidência e índice de doença na cultura da soja.

Tabela 9 - Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas no experimento 3 – Ponta Grossa, safra 2015/16.

	Estande	Inc	ID	Rend	Esc_C
Estande	1,00	-0,01	0,10	-0,11	0,02
p-valor	1,000	0,906	0,354	0,301	0,877
Inc	-0,01	1,00	0,91*	-0,19	0,71*
p-valor	0,906	1,000	0,000	0,065	0,000
ID	0,10	0,91*	1,00	-0,30*	0,63*
p-valor	0,354	0,000	1,000	0,003	0,000
Rend	-0,11	-0,19	-0,30*	1,00	0,00
p-valor	0,301	0,065	0,003	1,000	0,997
Esc C	0,02	0,71*	0,63*	0,00	1,00
p-valor	0,877	0,000	0,000	0,997	1,000

Inc: incidência; ID: índice de doença; Rend: rendimento; Esc C: escleródios recuperados massa de grãos na colheita; *: correlação significativa $p \leq 0,05$.

5. CONCLUSÕES

As variáveis meteorológicas observadas foram adequadas ao pleno desenvolvimento da cultura e ao desenvolvimento do mofo branco na soja nos três experimentos.

A análise descritiva básica mostrou que as variáveis referentes ao mofo branco apresentam coeficientes de variação de moderado a elevados e não apresentaram distribuição normal dos dados nos experimentos 2 (Mauá-da-Serra safra 2014/15) e experimento 3 (Ponta Grossa safra 2015/16).

A análise descritiva mostrou que a variável rendimento apresentou coeficiente de variação baixo a moderado e distribuição normal nos três experimentos.

O ajuste dos semivariogramas apresentou diferenças nos três experimentos, com ajustes aos modelos EPP, linear, esférico e exponencial.

A menor distância entre pontos amostrados e o maior número de pontos disponíveis proporcionaram melhor qualidade do ajuste dos semivariogramas no experimento 3 (Ponta Grossa safra 2015/16).

O índice de doença apresentou correlação positiva com a incidência e a produção de escleródios na colheita, e correlação negativa com o rendimento nos três experimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of Diseases Caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 899–904, 1979.
- AGHAJANI, M. A.; SAFAIE, N.; ALIZADEH, A. Disease progress curves of *Sclerotinia* Stem Rot of canola epidemics in Golestan Province, Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 471–478, 2010.
- ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ARAÚJO, D. V.; TALAMINI, V.; OLIVEIRA, M. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 557–563, 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; LARANJEIRA, F.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R.; Análise Espacial de Epidemias. In: VALE, F. X. R. DO; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, 2004. p. 195–236.
- BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F. Análise Espacial e Temporal de Epidemias de Patógenos de Solo. In: POLTRONIERI, L. S.; VERZIGNASSI, J. R. (Eds.). **Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p. 248.
- BERGER NETO, A. **Controle do mofo branco: efeito de pontas e volumes de pulverização em soja e produtos biológicos em soja e canola**. 2015. 105f. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2015.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. **Phytopathology**, v.78, p. 1241-1245, 1988a.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. **Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 329–336, 1988b.
- CAMBARDELLA, C. A.; MOORMAN, T. B.; NOVAK, J. M.; PARKIN, T. B.; KARLEN, D. L.; TURCO, R. F.; KONOPKA, A. E. Field-Scale variability of soil properties in central Iowa soils. **Soil Science Society of American Journal**, v. 58, p. 1501–1511, 1994.
- CAMPBELL, C. L.; NOE, J. P. The spatial analysis of soilborne pathogens and root diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 129–148, 1985.
- CARVALHO, C. G.; ARIAS, C. A. A.; TOLEDO, J. F. F.; ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R.A.S.; OLIVEIRA, M. F.; HIROMOTO, D. M.; TAKEDA, C. Proposta de classificação dos coeficientes de variação em relação à produtividade e altura da planta de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 187–193, 2003.
- CARVALHO, E. A. **Modelagem geoestatística da distribuição espacial de doenças do feijoeiro comum e da soja e sua relação com a fertilidade do solo e nutrição mineral de plantas**. 2008. 83 f. Universidade Federal de Lavras: UFLA. Dissertação (mestrado em Agronomia), 2008.

CHELLEMI, D. O.; ROHRBACH, K. G.; YOST, R. S.; SONODA, R. M. Analysis of the spatial pattern of plant pathogens and diseased plants using geostatistics. **Phytopathology**, v. 78, p. 221–226, 1988.

CLARKSON, J. P.; COVENTRY, E.; KITCHEN, J.; CARTER, H. E.; WHIPPS, J. M. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. **Plant Pathology**, v. 62, p. 309–324, 2013.

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

CORREIA, P. **Modelação e estimação: uma introdução à geoestatística**, 2010. Disponível em: <http://leg.ufpr.br/lib/exe/fetch.php/disciplinas:geoesalq:pira2012:numist_-odelacao_e_estimacao_-sgems.pdf>

COULSON, R. N. Intelligent geographic information systems and integrated pest management. **Crop Protection**, v. 11, n. 6, p. 507–516, 1992.

CRESSIE, N. A. C. **Statistics For Spatial Data**. Revised ed. IOWA: John Wiley e Sons, INC., p. 192, 1990.

EQUIPE STATCAMP, **Action Stat - Consultoria em estatística e qualidade**. São Carlos, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br>>

FARACO, M. A. **Qualidade do ajuste de modelos geoestatísticos utilizados na agricultura de precisão**. 2006, 135f. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), 2006.

FARACO, M. A.; URIBE-OPAZO, M. A.; SILVA, E. A. A. S.; JOHANN, J. A.; BORSSOI, J. A. Seleção de modelos de variabilidade espacial para elaboração de mapas temáticos de atributos físicos do solo e produtividade da soja. **Revista brasileira de ciencia do solo**, v. 32, n. 3, p. 463–476, 2008.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Circular Técnica 48 - Ecofisiologia da Soja**. Londrina, PR. Embrapa Soja, , 2007. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/circtec48_000g3bkhmqr02wx5ok0r2ma0nxz1b1po.pdf>

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of Soybean Development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Special report, 80).

FERRANDINO, F. J. Time scales of inoculum production and the dynamics of the epidemic. **Phytopathology**, v. 102, n. 8, p. 728–32, ago. 2012.

FILIFE, J. A. N.; MAULE, M. M.; GILLIGAN, C. A. On “Analytical models for the patchy spread of plant disease”. **Bulletin of mathematical biology**, v. 66, n. 5, p. 1027–37, set. 2004.

FLEISCHER, S. J.; BLOM, P. E.; WEISZ, R. Sampling in Precision IPM: When the Objective Is a Map. **Phytopathology**, v. 89, n. 11, p. 1112–1118, 1999.

FRANZBLAU, A. N. **A primer of statistics for non-statisticians**. New York: Harcourt Brace & Compant, 150p. 1958.

FRITZSONS, E.; MANTOVANI, L. E.; AGUIAR, A. V. . Relação entre altitude e temperatura: uma contribuição ao zoneamento climático no estado do Paraná. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 10, n. 1, p. 40–48, 2008.

FT SEMENTES. **Cultivares de Soja Região 2**. Disponível em: <<http://ftsementes.com.br/cultivares-de-soja/regiao-02/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

GILLIGAN, C. A. Modeling of soilborne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 45–64, 1983.

GOSME, M.; LUCAS, P. Effect of host and inoculum patterns on take-all disease of wheat incidence, severity and disease gradient. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 1, p. 119–131, 24 out. 2010.

GUERRA, P. A. G. **Geoestatística operacional**. Ministério de Minas e Energia, Departamento Nacional da Produção Mineral, p.145, 1988.

GUIMARÃES, E. C. **Geoestatística básica e aplicada**. Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia. p 78. 2004. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Geoestatistica+Basica+e+Aplicada>>.

HAMMOND, C. N.; CUMMINGS, T. F.; JOHNSON, D. A. Deposition of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* in and near potato fields and the potential to impact efficacy of a biocontrol agent in the Columbia Basin. **American Journal of Potato Research**, v. 85, n. 5, p. 353–360, 21 jun. 2008.

HOFFMAN, D. D.; HARTMAN, G. L.; MUELLER, D. S.; LEITZ, R. A.; NICKELL, C. D.; PEDERSEN, W. L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 82, n. 7, p. 826–829, 1998.

HUANG, H. C. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 75, p. 433–437, 1985.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R.S.; PHILLIPPE, L.M.; MUELLER, C.A.; SUN, S.K.; HUANG, J.W. Control of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* by soil amendment with S–H mixture or Perlka® in bean, canola and wheat fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1348–1352, jun. 2006.

HUGHES, G. Sampling for decision making in crop loss assessment and pest management: introduction. **Phytopathology**, v. 89, n. 11, p. 1080–1083, 1999.

HUGHES, G.; MADDEN, L. Sampling for Plant Disease Incidence. **Phytopathology**, v. 89, n. 11, p. 1088–1103, 1999.

JACCOUD-FILHO, D. S.; SARTORI, F.F.; MANOSSO-NETO, M.; VRISMAN, C.M.; PIERRE, M.L.C.; BERGER-NETO, A.; TÚLLIO, H.E.; JUSTINO, A.; FONSECA, A.; ZANON, S. Influence of row spacing and plant population density on management of “white mould” in soybean in southern Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, 2016.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M.O.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F.F.; DEMARCH, V. B.; ROCHA, C.H. Análise, distribuição e quantificação do “mofo branco” em

diferentes regiões produtoras do estado do Paraná. In: **XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil – Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 226–228.

JONES, S. J.; GENT, D.H.; PETHYBRIDGE, S. J.; HAY, F. S. Spatial characteristics of white mould epidemics and the development of sequential sampling plans in Australian bean fields. **Plant Pathology**, v. 60, n. 6, p. 1169–1182, 12 dez. 2011b.

KURLE, J. E.; GRAU, C. R.; OPLINGER, E. S.; MENGISTU, A. Tillage, crop sequence, and cultivar effects on *Sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 973–982, 2001.

LANDIM, P. M. B. Sobre Geoestatística e mapas. **Terra e Didática**, v. 2, n. 1, p. 19–33, 2006.

LIEBHOLD, A. M.; ROSSI, R. E.; KEMP, W. P. Geostatistics and geographic information systems in applied insect ecology. **Annual Review Of Entomology**, v. 38, p. 303–327, 1993.

MCKINNEY, H. H. Influence os soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195–218, 1923.

MINASNY, B.; MCBRATNEY, A. B.; WHELAN, B. M. **VESPER version 1.62**. Sydney Australian Centre for Precision Agriculture, McMillan Buildings A05, The University of Sydney. 2005. Disponível em: <www.usyd.edu.au/su/agric/acpa>

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

NELSON, M. R.; ORUM, T. V.; JAIME-GARCIA, R.; NADEEM, A. Applications of geographic information systems and geostatistics in plant disease epidemiology and management. **Plant Disease**, v. 83, n. 4, p. 308–319, abr. 1999.

NIDERA SEMENTES. **Catálogo de Produtos Sul - Safra 2014/15**. Disponível em: <http://www2.niderasementos.com.br/produto_visualizar_arquivo_pdf.aspx?id=112>. Acesso em: 14 fev. 2017.

PELTIER, A. J. BRADLEY, C.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; KIERSTEN W. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2012.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Esalq, 451p. 1985.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* : history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Geographic Information System - Open Source Geospatial Foundation Project**, 2016. Disponível em: <<http://www.qgis.org/>>

RIBEIRO JUNIOR, P. J. **Fundamentos de Geoestatística**. 96p. Universidade Federal do Paraná, 2004.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 68, n. 3, p. 383-388, 1978.

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

WEBSTER, R.; MCBRATNEY, A. B. On the Akaike Information Criterion for choosing models for variograms of soil properties. **Journal of Soil Science**, v. 40, n. 3, p. 493–496, 1989.

WHITE, K. A. J.; GILLIGAN, C. A. Spatial heterogeneity in three-species , plant $\pm$ parasite $\pm$ hyperparasite systems. **Royal Society London**, n. 353, p. 543–557, 1998.

WUTZKI, C. R.; JACCOUD FILHO, D.S.; BERGER NETO, A.; TULLIO, H.E.; JULIATTI, F.C.; NASCIMENTO, A. J. Reduction of white mold level on soybean by fungicide management strategies | Redução do nível de mofo-branco na soja pelo manejo de fungicidas. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, 2016.

CAPITULO II: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO DE MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*) NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

O mofo branco pode causar sérios danos à cultura da soja e é uma doença de difícil controle, já que apresenta ocorrência esporádica e os escleródios podem permanecer viáveis por longos períodos no solo. Diante disso, a identificação de inóculo do mofo branco em áreas de soja pode ser importante para a escolha correta de medidas de controle durante o ciclo da cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar técnicas de identificação e quantificação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* durante o florescimento na cultura da soja. A deposição do bioaerossol, partes de folha e flores da soja foram avaliadas com o uso de meio semi-seletivo a *Sclerotinia sclerotiorum* (MSS) e reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR), sendo utilizado até 36 pontos de amostragem em uma área de soja em Ponta Grossa-PR. Todos os pontos de amostragem apresentaram incidência de mofo branco na soja. A identificação de inóculo de mofo branco com incubação em MSS mostrou-se a técnica com maior sensibilidade, mas demanda de até 15 dias para a confirmação de *S. sclerotiorum*, tanto para bioaerossol, como flores e partes de folhas de soja. Foi possível otimizar o protocolo de extração de DNA e ciclo de reação para qPCR, além de gerar uma curva padrão com DNA oriundo de ascósporos de *S. sclerotiorum*, com ajuste ao modelo linear ($R^2=0,99$) e eficiência de 92,2%. O uso de qPCR mostrou-se promissor para partes de folhas, sendo possível resultados em um dia de trabalho.

Palavras-chave: meio semi-seletivo; qPCR; bioaerossol; ascósporos; florescimento; *Glycine Max*.

CHAPTER II:
EVALUATION OF METHODS FOR QUANTIFICATION OF INOCULUM OF
***Sclerotinia sclerotiorum* IN SOYBEAN**

ABSTRACT

White mold can cause serious damage to soybean crop and it is a disease of hard control, since it has a sporadic occurrence and sclerotia can remain viable for long periods in the soil. Therefore, the identification of white mold inoculum in soybean fields is important for the correct choice of control techniques during the crop cycle. The objective of this work was to evaluate techniques of identification and quantification of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* during flowering period in soybean crop. The deposition of bioaerosol, leaf parts and soybean flowers were evaluated using semi-selective medium to *Sclerotinia sclerotiorum* (MSS) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR), using up to 36 sampling points in a Soybean field in Ponta Grossa-PR. All sampling points showed white mold incidence in soybean crop. The identification of white mold inoculum with incubation on MSS was shown to be the most sensitive technique, but takes up to 15 days for the confirmation of *S. sclerotiorum* pathogen for bioaerosol, flowers and parts of soybean leaves. It was possible to optimize the protocol of DNA extraction and reaction cycle for qPCR, besides generating a standard curve with DNA from ascospores of *S. sclerotiorum*, adjusted to the linear model ($R^2 = 0,99$) and efficiency of 92.2%. The use of qPCR showed promise results for leaf parts, being possible achieve concluding results in one working day.

Keywords: semi-selective medium; qPCR; bioaerosol; ascospores; flowering; *Glycine Max*.

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um importante patógeno na cultura da soja, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar e solo aliadas temperaturas amenas. As epidemias mais severas do mofo branco na soja são originárias da germinação carpogênica dos escleródios e liberação dos ascósporos durante o florescimento da soja.

A presença de ascósporos em meio a inúmeras partículas biológicas em suspensão no ar (bioaerossol) no período de florescimento da soja, são a fonte primária de inóculo que desencadeiam a maioria das epidemias do mofo branco. A deposição dos ascósporos em flores e folhas de soja podem iniciar o processo de infecção que pode culminar com o comprometimento de toda a planta.

O mofo branco apresenta ocorrência esporádica nas culturas hospedeiras, tornando modelo de previsão de ocorrência de doença de grande valor para este patógeno. Vários relatos de quantificação de ascósporos visando modelos de previsão de doença foram relatados em várias culturas, como canola (BECKA et al., 2016; ZIESMAN et al., 2015); feijão (HARIKRISHNAN; RÍO, 2006); alface (CLARKSON et al., 2014), contudo, estudos com soja ainda são escassos. Assim, um método para identificar e quantificar a presença de ascósporos no bioaerossol durante o florescimento da soja pode ser de grande valia para o monitoramento e manejo de *S. sclerotiorum*.

Vários métodos para identificação e quantificação de ascósporos de mofo branco tem sido descritos na literatura, como o uso de superfícies adesivas com posterior identificação via microscopia, uso de meio de cultura seletivos à *S. sclerotiorum*, quantificação de flores e folhas infectadas, além do uso de técnicas moleculares de identificação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar técnicas de identificação e quantificação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* durante o florescimento na cultura da Soja

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o uso de meio de cultura semi-seletivo a *S. sclerotiorum* (MSS) para identificação e quantificação de ascósporos de *S. sclerotiorum* presentes no bioaerossol, folhas e flores na cultura da soja.
- Identificação e quantificação dos ascósporos no bioaerossol de *S. sclerotiorum* através da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) de amostras coletadas em fita adesiva, folhas e flores na cultura da soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA

Uma área de aproximadamente 4 hectares no município de Ponta Grossa – PR, Brasil, com histórico de ocorrência de mofo branco desde a safra 2013/14, foi utilizada para testar as diferentes metodologias de coleta de ascósporos e avaliação da ocorrência do mofo branco.

A semeadura da soja foi realizada no dia 20/10/2015 com 14 semente m^{-1} e espaçamento de 0,45m entre linhas da variedade de soja BMX Alvo RR[®] (Brasmax Genética, Cambé, PR, Brasil). A variedade semeada apresenta hábito de crescimento indeterminado, Grupo de maturação relativo 5.9 e resistência ao acamamento (BRASMAX, 2017). A adubação e manejo fitossanitário foi realizado conforme as recomendações técnicas da cultura, sem nenhum método de controle para o mofo branco.

Na parte central da área, foram demarcadas 36 parcelas de 7x8 m (área útil de 4 linhas de soja x 4 m, totalizando 7,2 m^2), onde foram realizadas as amostragens.

3.2. COLETOR DE ESPOROS

Com o intuito de se coletar esporos presentes no ar, foi desenvolvido um coletor de esporos denominado coletor F12 (Figura 1). Apesar de existir equipamentos especializados para a coleta do bioaerossol, estes apresentam alto custo, inviabilizando a disseminação de seu uso em áreas agrícolas. Diante disso, o coletor F12 apresenta menor custo e facilidade de montagem, quando comparado aos equipamentos comerciais disponíveis, podendo ser utilizado em larga escala para monitoramento de esporos presentes no ar em áreas agrícolas.

O projeto utilizou componentes de PVC facilmente encontrados no mercado, sendo composto por tubos e conexões de 100 mm de diâmetro, um cooler de computador para forçar

o aerossol pelo aparelho nos períodos de vento com baixa intensidade e também limitar o fluxo de ar em períodos de vento com alta intensidade. Além disso o equipamento possui um “funil” para direcionar o fluxo de ar para a fita de coleta. A fixação do equipamento foi realizada em uma haste de alumínio contendo uma redução de pvc de 50-40 mm e um rolamento para deixar livre o movimento do coletor e sempre estar direcionado para o vento através do direcionador instalado na parte superior do mesmo (Figura 1).

A alimentação do cooler se deu com o uso de bateria 12 volts, através de um sistema de fiação interno à haste de fixação com plugue, para fácil remoção do equipamento.

O bioaerossol é direcionado para uma fita plástica contendo uma fina camada de uma mistura de vaselina líquida e sólida (Proporção 1:1), onde os esporos ficam aderidos. As coletas foram realizadas durante o dia, entre 10h00min e 13h00min, nos dias 29/12/2015, 7 e 11/01/2016. Após a retirada dos coletores, as fitas foram mantidas congeladas a -20°C até seu uso nas reações de qPCR.



Figura 1 - Coletor F12 instalado em uma área experimental, Ponta Grossa, 2016. Foto: Carlos Rafael Wutzki.

3.3. MEIO SEMI-SELETIVO A *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a detecção de ascósporos de *S. sclerotiorum* no bioaerossol, em folhas e flores, foi utilizado um meio semi-seletivo (MSS) composto por batata-dextrose-ágar (38 g L⁻¹), cloranfenicol (50 mg L⁻¹), azul de bromofenol (50 mg L⁻¹) com pH corrigido para 4,7 com uso de HCl. Após a autoclavagem, com o meio a aproximadamente 50°C adicionou-se

PentaCloroNitroBenzeno (95% do ingrediente ativo, 20 mg L⁻¹) tendo por base os trabalhos de (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994). Foram vertidos aproximadamente 20 mL do MSS em cada placa de Petri com diâmetro de 90 mm.

A identificação de *S. sclerotiorum* se dá pela formação de um halo amarelo em torno do crescimento do patógeno, devido a liberação de ácido oxálico que acidifica o meio e muda a cor de azul para amarelo (PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014a; PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994).

Contudo, outras espécies de fungos podem acidificar o meio que estão, como *Aspergillus*, *Botrytis* e *Penicillium* sp, causando falsos positivos (BEN-YEPHET; BITTON, 1985; PERES; NASSER; MACHADO, 2002; STEADMAN; MARCINKOWSKA; RUTLEDGES, 1994). Devido a isso, amostras das colônias identificadas como *S. sclerotiorum* foram repicadas para novas placas contendo MSS e incubadas a 19±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz até a formação de escleródios típicos e confirmação do patógeno.

3.4. AMOSTRAGENS

Foram realizadas coletas de folhas e flores nos dias 29/12/2015, 07/01/2016 e 11/01/2016, respectivamente aos 7, 16 e 20 dias após o início do florescimento da soja. Com auxílio de pinças esterilizadas, foram coletadas 10 flores e 10 folhas aleatoriamente nas duas linhas centrais de cada ponto de amostragem e acondicionadas em placas de Petri estéreis mantidas em caixas térmicas de isopor resfriadas (20±5°C) com gelo artificial até o uso no laboratório.

No laboratório, no máximo duas horas após a coleta no campo, de cada folha foi “recortado” um pedaço de 1 cm² da parte central, sendo que de cada ponto de amostragem 5 pedaços de folha e 5 flores foram uniformemente distribuídas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo MSS e incubadas a 19±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz por 120 horas (BECKA et al., 2016; BEN-YEPHET; BITTON, 1985; PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014a). Também foram acondicionados 5 pedaços de folha em um microtubo de 2 mL assim como 5 flores em outro tubo de 2 mL, os quais foram mantidos congelados a -20°C para posterior extração de DNA e reação de qPCR.

Para a quantificação de ascósporos presentes no ar, duas placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo MSS foram colocadas entre as duas linhas centrais de cada ponto de amostragem em suportes de madeiras na altura do dossel das plantas de soja (Figura 2).



Figura 2 - suporte de madeira com as placas de Petri contendo MSS para coleta de ascósporos de *S. sclerotiorum* na cultura da soja. Ponta Grossa, 2016. Foto: Carlos Rafael Wutzki.

Foram realizadas coletas do bioaerossol nos dias 26, 28 e 29/12/2015 e 5, 6, 7 e 11/01/2016, com abertura das placas entre 10hrs e 13hrs, sendo este período relatado como de maior liberação de ascósporos (ALMQUIST; WALLENHAMMAR, 2015; BEN-YEPHET; BITTON, 1985; PARKER; MCDONALD; BOLAND, 2014b; ROGERS; ATKINS; WEST, 2009).

Após a coleta, as placas foram fechadas com filme plástico e acondicionadas em caixas térmicas de isopor resfriadas ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) com gelo artificial para o transporte até o laboratório, onde foram incubadas a $19\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas e avaliadas entre 72 e 90 horas.

3.5. AVALIAÇÕES

As avaliações e a colheita em cada ponto de amostragem foram realizadas em quadrats com quatro linhas de semeadura de soja por quatro metros de comprimento, totalizando uma área útil de $7,2\text{ m}^2$. As avaliações de incidência e severidade das plantas infectadas por *S. sclerotiorum* foram realizadas no estágio fenológico R6 - final do enchimento de grãos (FEHR; CAVINESS, 1977).

Para a severidade foi utilizada a escala diagramática proposta por Juliatti et al. (2013). Como foram contadas todas as plantas em cada quadrat, a incidência e severidade foram corrigidas em equivalente a 100 plantas, ou seja, os resultados foram expressos em

porcentagem. O índice de doença foi calculado conforme a fórmula proposta por McKinney (1923), onde:

$$\text{Índice de Doença: } \frac{(\text{nota da escala utilizada} \times \text{número de plantas doentes}) \times 100}{(\text{número total de plantas} \times \text{valor máximo da escala})}$$

As plantas da área colhida foram trilhadas com uma bateadeira de cereais motorizada e a umidade foi corrigida a 13% v/v. Após a colheita, foram separados da massa de grãos os escleródios produzidos em cada ponto de amostragem. Para a separação dos escleródios, a massa de grãos de cada parcela foi despejada em uma bandeja plástica branca e procedeu-se a remoção manual dos escleródios com o auxílio de pinças.

3.6. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE ASCÓSPOROS

3.6.1. Extração de DNA das flores, folhas e fitas

A metodologia de extração de DNA foi baseada e adaptada dos trabalhos de Murray e Thompson (1980), Ferreira e Grattapaglia (1995); Freeman et al. (2002); Grabicoski et al. (2015); Parker; Mcdonald e Boland (2014a); Rogers; Atkins e West (2009).

O DNA presente nas folhas, flores e fitas armazenadas em microtubos de 2 mL foi extraído adicionando-se 200 mg de micro pérolas de vidro 425-600 µm lavadas em ácido e 500 µL da solução de extração de brometo de cetil trimetilamônio (CTAB 2%, NaCl 1,4 M; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; 1% e água ultra-pura). Foram realizados três ciclos contendo: ruptura mecânica no vortex (2 minutos), congelamento em freezer (10 min) e incubação a 60°C (2 min). Após três ciclos, o líquido foi transferido para outro microtubo de 2 mL que passou por congelamento (10min a -20°C) e incubação a 60°C por 30 minutos.

A extração prosseguiu com a adição de 500µL de clorofil (solução de clorofórmio / álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente), agitação manual por 5min, centrifugação por 15 min a 7000 rpm. Transferiu-se todo o líquido sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado, agitando manualmente (5 min), centrifugando (5 min a 7000 rpm), descartando o sobrenadante, adicionando 300 µL de etanol 70% gelado, centrifugando novamente (5 min a 7000 rpm), descartando novamente o sobrenadante, adicionando 300 µL de etanol 99% gelado, centrifugando novamente (5 min a 7000 rpm) e após o último descarte do sobrenadante, os microtubos foram deixados abertos secando durante 12 horas (Overnight). As amostras foram então ressuspensas em 100 µL de água ultra pura e armazenadas congeladas a -20°C até seu uso.

3.6.2. Reação q PCR

As reações de qPCR foram realizadas em um equipamento Mx3005P (Stratagene). Para as reações foram utilizadas 10 µL do Master Mix Fast Start universal SYBR green master ROX (Roche Life Sciences), adicionaram-se os primers SsF/SsR (YIN et al., 2009) na concentração de 400 nM e 5 µL da amostra de DNA, completando-se o volume total de reação com água ultra pura até 20 µL. A concentração de 400 nM dos primers foi a que apresentou melhores resultados em pré testes realizados (dados não apresentados).

As condições utilizadas para a reação de qPCR, conforme recomendações do fabricante do mix de reação utilizado, constitui-se de um ciclo inicial de 95°C por 15 min, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. As reações foram mantidas a 95°C por 1 min e curvas de dissociação dos produtos amplificados foram geradas iniciando-se em 70°C e finalizando em 90°C. Em todas reações foram utilizados controle positivo, composto por 20 ng de DNA de *S. sclerotiorum*, e controle negativo, composto pelo kit, primers e água ultrapura.

As amostras foram consideradas válidas quando as duplicatas apresentaram amplificação e a curva de dissociação resultou em apenas um pico em torno dos 81°C, que foi a temperatura de dissociação observada em DNA puro extraído de ascósporos de *S. sclerotiorum* isolado I-45 jataí (GARCIA, 2008). Os resultados apresentados são as médias das duplicatas (quando a diferença entre as duplicatas foi maior que 1 ciclo, não era considerada válida).

3.6.3. Especificidade do Primer

O par de primers SsF/SsR (YIN et al., 2009) foram testados com 14 espécies diferentes de fungos que podem estar presentes no bioaerossol, folhas e flores da cultura da soja, além do DNA da soja. As reações utilizaram 10ng de DNA de cada patógeno e de folhas de soja, cedidas pela Dr^a Edilaine M. G. Grabicoski (GRABICOSKI, 2012).

3.6.4. Suspensão de ascósporos e curva padrão de qPCR

Escleródios produzidos em laboratório do isolado Mutuca P11 foram dispostos em caixas plásticas tipo gerbox sobre substrato comercial esterilizado e mantidos a 19±2°C com fotoperíodo de 12 horas de luz. Após a formação dos apotécios, os mesmos foram transferidos

para microtubos estéreis contendo 1mL de água destilada e agitados mecanicamente para desprender os ascósporos do apotécio.

Após aferida a concentração de ascósporos, o volume correspondente a 1×10^5 ascósporos foi transferido para um microtubo estéril onde foi realizada a extração do DNA conforme protocolo descrito anteriormente. Este procedimento foi repetido três vezes.

Para a curva padrão, o DNA equivalente a 100.000 esporos foi ressuspendido em 100 μ L de água ultrapura, tendo sido realizadas quatro diluições seriais (1:10) e uma diluição (1:2) com a suspensão equivalente ao DNA de 100 ascósporos. Para a reação da curva padrão, foram utilizados 5 μ L de cada diluição, sendo equivalente ao DNA de 5.000, 500, 50, 5, 2,5 e 0,5 ascósporos, respectivamente.

3.7. CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS

Os dados meteorológicos foram coletados em uma estação meteorológica situada na Fazenda Escola Capão da Onça, em Ponta Grossa, PR. O experimento estava situado a 7 km de distância do local da estação meteorológica. As variáveis coletadas foram precipitação, umidade relativa do ar e temperatura máxima, mínima e média do ar.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS

A temperatura e umidade relativa observadas estavam adequadas ao pleno desenvolvimento da cultura da soja, ressaltando-se que, durante a formação de vagens e início do enchimento de grãos, ocorreu um período de 15 dias sem precipitação (veranico) (Figura 3). Contudo, este período sem precipitação ocorreu após a coleta das amostras durante o florescimento da cultura, não apresentando nenhuma limitação relativa aos dados meteorológicos para a liberação de ascósporos e infecção da cultura da soja.

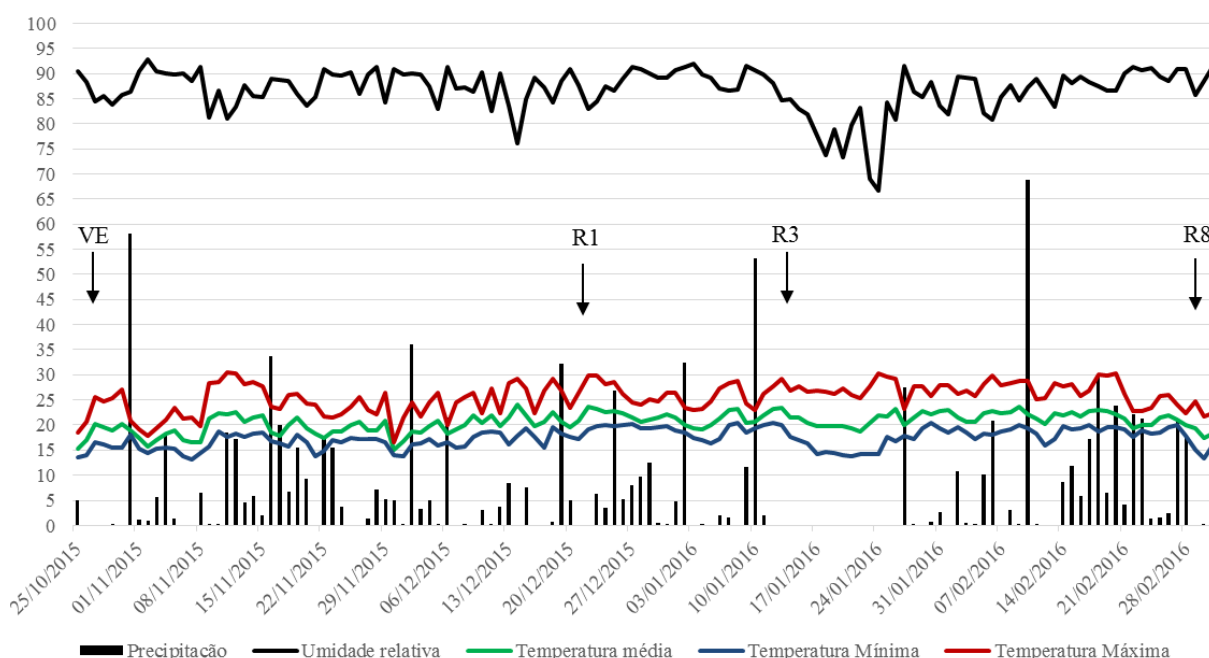


Figura 3 - Dados meteorológicos observados na Fazenda Escola Capão da Onça, utilizados como referência para o experimento conduzido em Ponta Grossa na safra 2015/16. Fonte: Mini Farm BASF. VE: emergência; R1: início do florescimento; R8: maturação plena (FEHR; CAVINESS, 1977).

4.2. ESPECIFICIDADE DO PRIMER

Utilizando os parâmetros de ciclo para a reação de qPCR conforme descrito no material e métodos, observou-se que o primer apresentou alta especificidade para *S. sclerotiorum*, sendo que apenas ocorreu amplificação do DNA de *S. minor* (Tabela 1). Entretanto, foram observadas diferenças na temperatura da curva de dissociação entre *S. minor* e *S. sclerotiorum* (Figura 4) sendo assim possível, distingui-las por este critério, além de que a amplificação de *S. minor* é bem mais tardia (Tabela 1).

Tabela 1 – Teste de especificidade do primer SsF/SsR (YIN et al., 2009) para DNA de microrganismos possíveis de estarem presentes nas amostras coletadas em lavouras de soja.

Amostra	Ct*	Amostra	Ct*
<i>Cercospora sojina</i>	-	<i>Penicilium</i> sp.	-
<i>Phomopsis sojiae</i>	-	<i>Rhizopus</i> sp.	-
<i>Cercospora kikuchii</i>	-	<i>Trichoderma</i> sp.	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	<i>Sclerotinia minor</i>	34,53
<i>Aspergillus</i> sp.	-	<i>Sclerotium rolfsii</i>	-
<i>Rhizoctonia</i> sp.	-	<i>Glycine max</i>	-
<i>Coletotrichum</i> sp.	-	<i>S. sclerotiorum</i> (5000 ascósporos)	21,82
<i>Machophomina phaseolina</i>	-	<i>S. sclerotiorum</i> (5 ascósporos)	31,83
<i>Aspergillus</i> sp.	-		

*Ct: Cycle Threshold – Ciclo Limiar de Detecção.

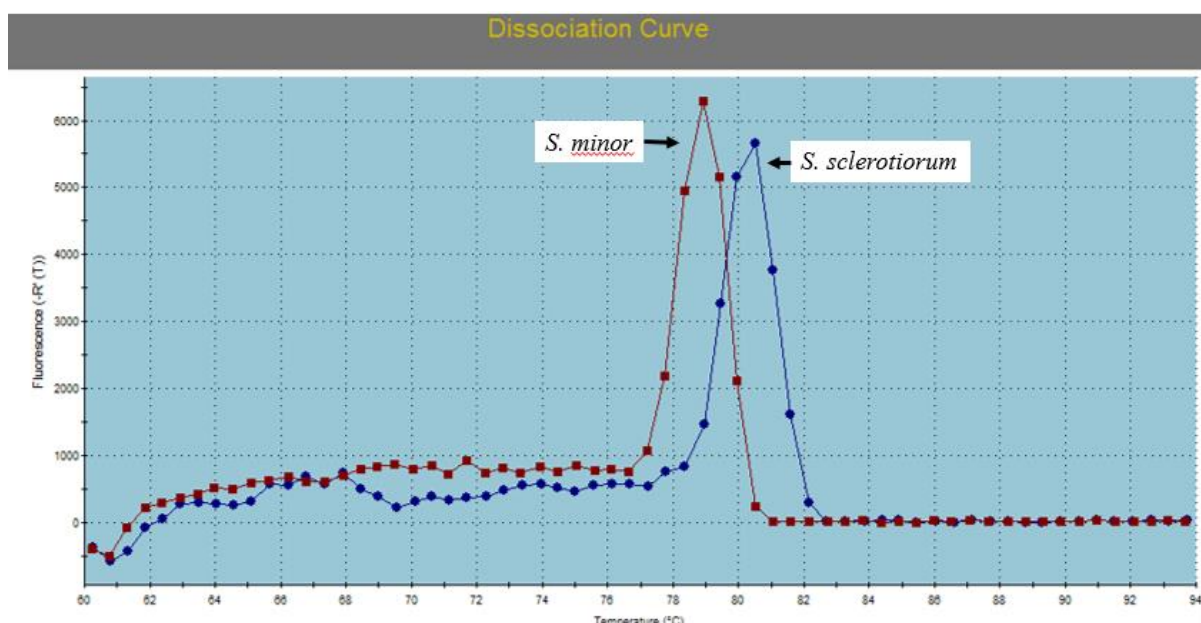
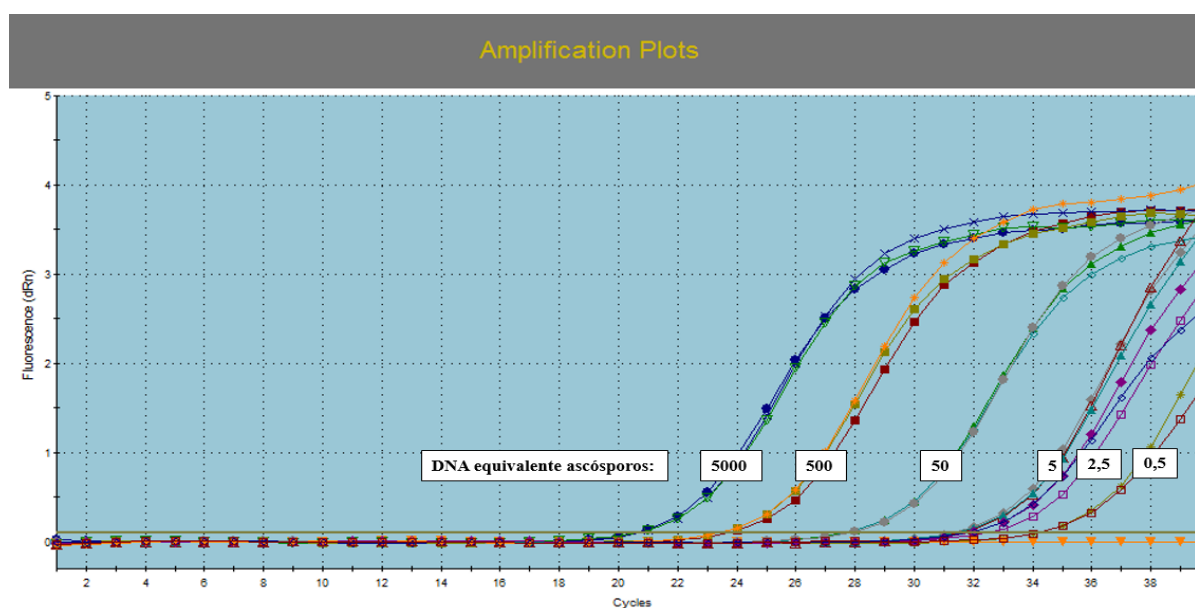


Figura 4 – Curvas de dissociação de *Sclerotinia minor* e *Sclerotinia sclerotiorum* meio de qPCR.

4.3. CURVA PADRÃO DE qPCR

As triplicatas utilizadas para a confecção da curva padrão apresentaram alta repetibilidade, com exceção da concentração equivalente a 0,5 ascósporo onde apenas uma das triplicatas não apresentou amplificação (Figura 5 A). Resultados semelhantes foram observados por Parker, McDonald e Boland (2014a) que, apesar de utilizarem um primer diferente e isolados de *S. sclerotiorum* oriundos de canola, verificaram que pelo menos uma das triplicatas sempre foi positiva nas reações equivalentes a 0,5 ascósporo.

A



B

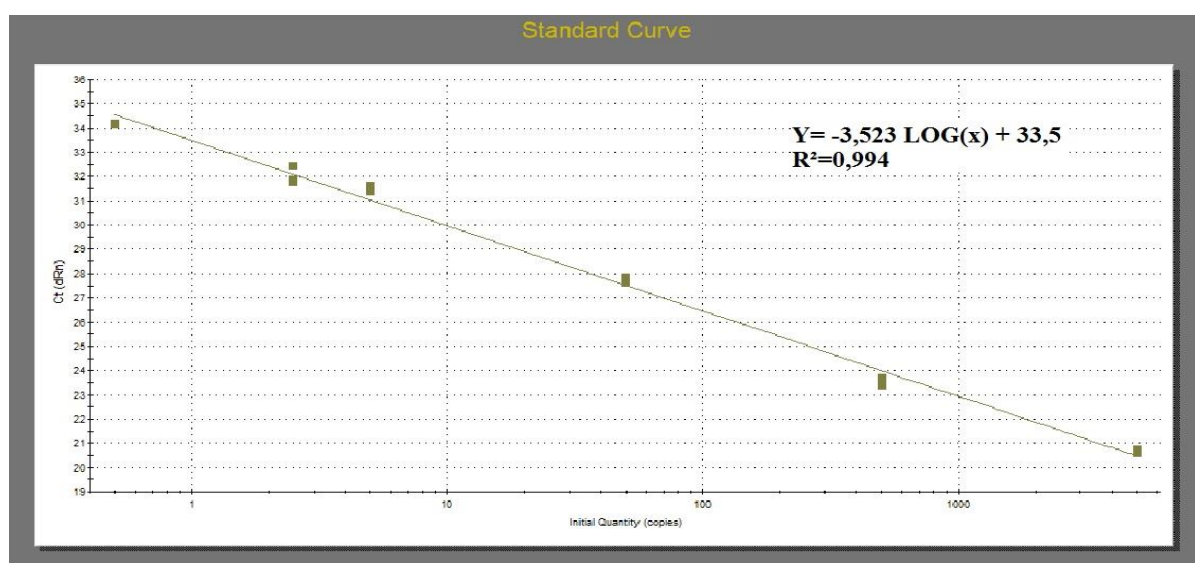


Figura 5 - A) Curvas de amplificações a partir de diluições de DNA de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*. B) Curva padrão gerada a partir diluição do DNA de *S. sclerotiorum* equivalente a 5000; 500; 50; 5; 2,5 e 0,5 ascósporos (reações em triplicatas).

4.4. MEIO SEMI-SELETIVO A *Sclerotinia sclerotiorum*

A detecção do ascósporos de *S. sclerotiorum* no bioaerossol com o uso do meio semi-seletivo (MSS) mostrou-se eficiente com períodos de incubação de 48 a 72 horas (Figura 6A), com a formação de halos amarelos e o crescimento de micélio típico de *S. sclerotiorum* (PURDY, 1979; SCHWARTZ; STEADMAN, 1978). Todas colônias identificadas no MSS foram repicadas em novas placas de Petri contendo MSS e após o período de incubação (a $19 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz) variando de 10 até 15 dias, verificou-se a formação

de escleródios típicos de *S. sclerotiorum* em todos os isolados, confirmando a eficiência do MSS (Figura 6B) e descartando a ocorrência de falsos positivos.

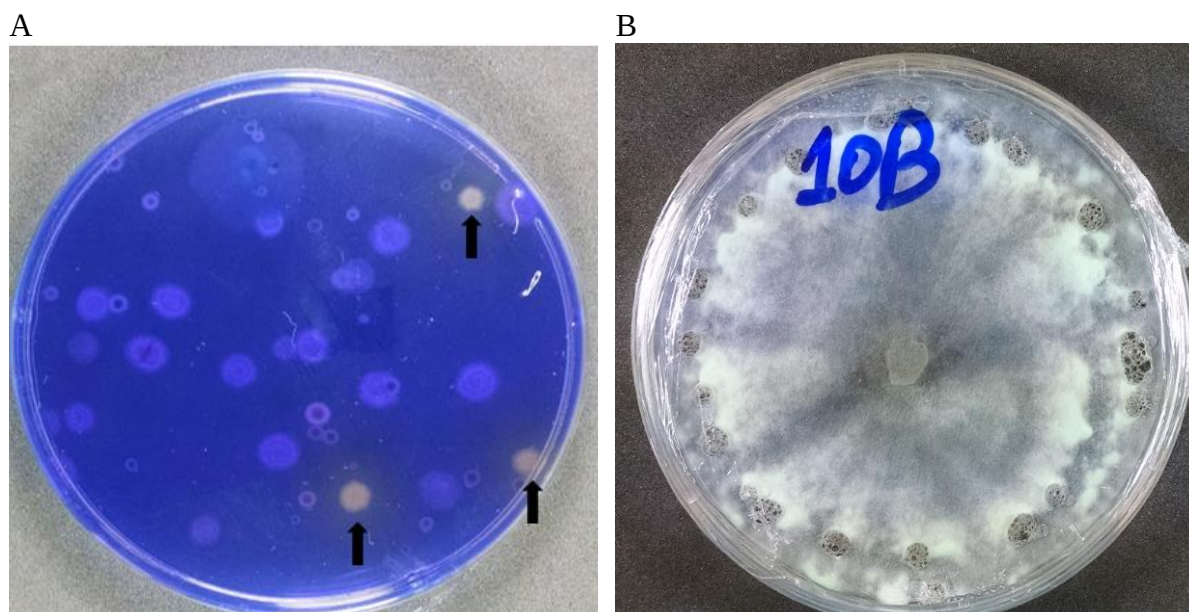


Figura 6 - Placas de Petri contendo o meio semi-seletivo a *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Setas indicando a mudança de cor de azul para amarelo do meio semi-seletivo (MSS) indicando o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. B) Isolamento de micélio originados ascósporos de *S. sclerotiorum* e a formação de escleródios sob MSS.

O uso do MSS apresenta as vantagens de apontar apenas os ascósporos viáveis e a possibilidade de confirmação do patógeno com repicagens da placa inicial, de grande utilidade para estudos sobre epidemiologia do mofo branco. A exposição de placas contendo MSS apresentou a maior porcentagem de amostras positivas quanto a presença de ascósporos no ar, apresentando mais de 50% das amostras positivas nas três datas avaliadas (Figura 7).

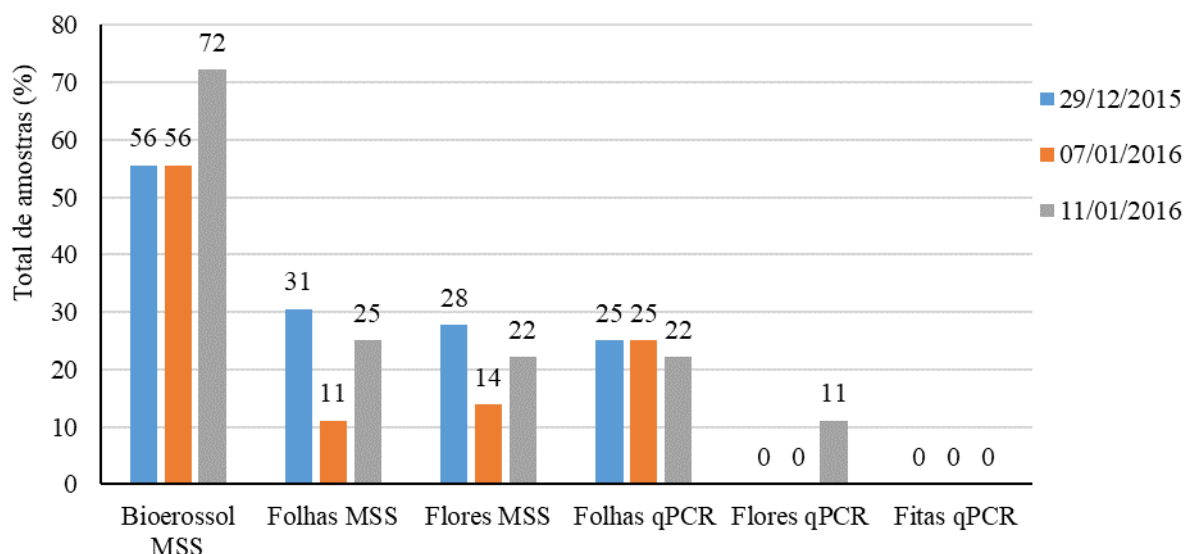


Figura 7 - Porcentagem de amostras positivas para presença *S. sclerotiorum* oriundas do bioaerossol, fitas, partes de folhas e flores de soja, nas duas metodologias testadas: Meio semi-seletivo a *Sclerotinia sclerotiorum* (MSS) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

Contudo, a utilização do MSS demanda laboratórios equipados para a produção de meio de cultura e incubação, além de profissionais treinados para a avaliação e repicagem das amostras, podendo levar até 15 dias para a formação dos escleródios para a confirmação de *S. sclerotiorum*, tempo longo para a utilização de métodos de controle durante o período preferencial que é o florescimento da cultura da soja. Além destes fatores, a abertura das placas com o MSS fica prejudicada em dias chuvosos.

4.5. FOLHAS E FLORES EM MSS

A detecção de *S. sclerotiorum* através da incubação de folhas e flores em MSS mostrou-se viável, já que em todas as datas coletadas foram encontradas amostras positivas, variando de 11 a 31% das amostras com a presença de *S. sclerotiorum* (Figura 7).

As maiores porcentagens de detecção foram verificadas no início de florescimento da soja, na primeira data de coleta (29/12/2015). Este resultado é importante visando o controle do mofo branco no mesmo ciclo, já que, mesmo após o período de incubação para identificação de *S. sclerotiorum*, ainda haveria tempo hábil para medidas de controle emergenciais, diminuindo o potencial de dano na cultura da soja.

O uso de flores e partes de folhas pode ser vantajoso quando comparado às placas contendo MSS por apresentar maior facilidade na coleta e envio das amostras para o laboratório, não sendo necessário o transporte, abertura e fechamento de placas de Petri no campo, além da coleta poder ser realizada em períodos chuvosos.

A detecção de *S. sclerotiorum* através da incubação de folhas e flores em meio de cultura já foi relatada na literatura em canola: Becka et al. (2016), encontraram correlação significativa entre número de flores infectadas e a incidência de *S. sclerotiorum* nas hastes das plantas de Canola e Young e Werner (2012) demonstraram a importância das flores contaminadas para a ocorrência do mofo branco na canola.

Além de canola, a detecção de *S. sclerotiorum* em parte vegetais já foi relatada em sementes de soja e feijão (HENNEBERG et al., 2012; PERES; NASSER; MACHADO, 2002). Entretanto, não foram encontrados relatos de incubação de flores ou folhas de soja em MSS, reforçando a necessidade do presente trabalho.

A incubação de folhas e flores de soja em MSS apresentou menor sensibilidade quando comparadas a coleta do bioaerossol em placas de Petri contendo MSS (Figura 7), sendo necessários mais estudos visando otimizar o número de folhas e/ou flores amostrados, com o objetivo de validar essa técnica.

4.6. qPCR DE FOLHAS E FLORES

O uso de detecção molecular em partes de folhas de soja mostrou-se promissora, já que de 22 a 25% das folhas analisadas foram positivas para identificação de *S. sclerotiorum* na soja (Figura 7), sendo que na primeira coleta (29/12/2015) já foram identificadas 25% das amostras de folhas contaminadas.

O uso de reação de qPCR de folhas para identificação é mais vantajoso que a identificação por MSS devido à rapidez na reação, pois em algumas horas é possível ter em mãos os resultados, oportunizando o estágio ideal para adoção de medidas de controle, como aplicações foliares de fungicidas ou agentes de controle biológico.

Uma dificuldade apresentada por este método pode ser a baixa disponibilidade de laboratórios preparados para analisar reações de qPCR, principalmente em regiões mais distantes de grandes centros urbanos ou universidades. Uma solução para isto seria o incentivo à pesquisa com identificação de inóculo para outras doenças e culturas, viabilizando a aquisição de equipamentos de qPCR por cooperativas ou grupos de produtores rurais.

Com relação ao uso de qPCR em flores, só foi possível a identificação na última coleta realizada em 11/01/2015 (Figura 7), período referente ao final do florescimento da soja. Apesar da rapidez no resultado das reações de qPCR, o período de detecção foi tardio, comprometendo o uso de controle efetivo na mesma safra. O uso de qPCR em flores de soja deve ser mais estudado, já que neste trabalho foi verificado uma porcentagem semelhante de folhas e flores contaminadas com a utilização de MSS, mas, com a utilização de qPCR, as amostras de flores apresentaram porcentagem menor de amostras contaminadas quando comparadas com as folhas.

Visando a detecção de inóculo de mofo branco em canola, Almquist e Wallenhammar (2015) conduziram vários experimentos na Suécia, testando crescimento em meio de cultura e reações de PCR e qPCR com partes de folhas e pétalas. Estes autores concluíram que a detecção de inóculo de mofo branco em folhas com PCR mostrou-se mais sensível quando comparada com a detecção molecular em pétalas, apresentando relação com o desenvolvimento da doença nas plantas, além de ser mais rápida (um dia de trabalho) quando comparada a incubação em meio de cultura. Os resultados encontrados por Almquist e Wallenhammar (2015) corroboram com os resultados encontrados neste experimento, indicando maior sensibilidade do uso de partes de folhas, quando comparadas com flores ou pétalas em reações de qPCR.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cruz (2015), também em trabalho com canola na Suécia, onde observou-se que 75% das amostras de folha e 69% das amostras de flores foram positivas para a presença de DNA de *S. sclerotiorum* em reações de qPCR.

Em um trabalho com detecção molecular de mofo branco em pétalas de canola no Canadá, Ziesman et al. (2015) relataram a presença de DNA de *S. sclerotiorum* em todos os 10 campos amostrados com histórico de ocorrência da doença, contudo, avaliações de incidência do mofo branco não foram realizadas.

4.7. QPCR EM FITAS ORIUNDAS DO COLETOR F12

Apesar de nos testes prévios a metodologia para extração de DNA e reação qPCR ter sido validada com sucesso, nenhuma amostra das fitas de coleta se enquadrou nos critérios estabelecidos para ser considerada utilizável (Figura 7). Devido a isso, mais estudos são necessários afim de identificar quais fatores possam estar comprometendo a performance do dispositivo e aprimorar seu funcionamento, como exemplos: o tempo de coleta, o fluxo de ar no coletor ou a quantidade de vaselina distribuída na fita.

5. CONCLUSÕES

A coleta passiva do bioaerossol em MSS mostrou-se a técnica mais sensível para detecção de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* presentes no ar durante o florescimento da cultura da soja.

O uso partes de folhas de plantas de soja para detecção de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* com uso de qPCR mostrou-se mais sensível quando comparada ao uso de flores.

Foi otimizado o protocolo de extração de DNA de *Sclerotinia sclerotiorum* em fitas, folhas e flores de soja.

São necessários novos estudos com objetivo de aprimorar as técnicas de amostragem (número de amostras por área, época de amostragem, partes do dossel amostradas) visando uma padronização do método.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMQUIST, C.; WALLENHAMMAR, A. C. Monitoring of plant and airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* in spring oilseed rape using real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 109–118, 2015.
- BECKA, D.; PROKINOVÁ, E.; SIMKA, J.; CIHLAR, P.; BECKOVÁ, L.; BOKOR, P.; VASAK, J. Use of petal test in early-flowering varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for predicting the infection pressure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Crop Protection**, v. 80, p. 127–131, 2016.
- BEN-YEPHET, Y.; BITTON, S. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v. 13, n. 1, p. 33–40, 1985.
- BRASMAX. **Cultivar Região Sul**. Disponível em: <<http://brasmaxgenetica.com.br/cultivar/regiao-sul>>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- CLARKSON, J. P.; FAWCETT, L.; ANTHONY, S. G.; YOUNG, C. A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 15–25, 2014.
- CRUZ, M. A. D. **Sclerotium and prediction of stem rot rape seed plants disease by using real time PCR**. Master Degree Project in Molecular Biology. University of Skövde, 2015.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of Soybean Development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Special report, 80).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA Cenargem, p.220, 1995.
- FREEMAN, J.; WARD, E.; CALDERON, C.; MCCARTNEY, A. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 9, p. 877–886, 2002.
- GARCIA, R. Á. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. 154f. Universidade Federal de Uberlândia, Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2008.
- GRABICOSKI, E. M. G. **Caracterização morfológica e patogênica de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary e o desenvolvimento de teste de detecção molecular em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2012, 138f. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2012.
- GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. S.; PILEGGI, M.; HENNEBERG, L.; PIERRE, M. L. C.; VRISMAN, C. M.; DABUL, A. N. G. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 69–74, 2015.

HARIKRISHNAN, R.; RÍO, L. D. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant disease**, v. 90, n. 7, p. 946–950, 2006.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Incidence of *Sclerotinia sclerotiorum* on soybean seeds and sensitivity of detection tests. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 6, 2012.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4325, 1980.

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Evaluation of air sampling and detection methods to quantify airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 32–42, 2014a.

PARKER, M. L.; MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Assessment of spatial distribution of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* for regional disease forecasting in carrots. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 36, n. October, p. 438–446, 2014b.

PERES, A. P.; NASSER, L. C. B.; MACHADO, J. D. C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 62, p. 123–127, 2002.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

ROGERS, S. L.; ATKINS, S. D.; WEST, J. S. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 324–331, 2009.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 68, n. 3, p. 383–388, 1978.

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

YIN, Y.; DING, L.; LIU, X.; YANG, J.; MA, Z. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in planta by a real-time PCR assay. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 7–8, p. 465–469, 2009.

YOUNG, C. S.; WERNER, C. P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 730–738, 2012.

ZIESMAN, B. R.; TURKINGTON, T. K.; BASU, U.; STRELKOV, S. E. A quantitative PCR system for measuring *Sclerotinia sclerotiorum* in Canola (*Brassica napus*). **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 984–990, 2015.