

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AMOSTRAGEM SEQUENCIAL DE SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO
NA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum***

ALESSANDRA DE LOURDES BALLARIS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AMOSTRAGEM SEQUENCIAL DE SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO
NA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum***

ALESSANDRA DE LOURDES BALLARIS

Orientador: Cláudio Cavariani

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
2.- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

3. Ballaris, Alessandra de Lourdes, 1969-
B189a Amostragem sequencial de sementes de soja e feijão na detecção de
Sclerotinia sclerotiorum / Alessandra de Lourdes Ballaris. - Botucatu :
[s.n.], 2014
4. xi, 77 f. : ils., tabs., grafs.
5. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Cláudio Cavariani
Inclui bibliografia
1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. Micélio - Transmissão. 3. Fungos - Culturas e meios de cultura. I. Cavariani, Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AMOSTRAGEM SEQUENCIAL DE SEMENTES DE SOJA E FEIJÃO
NA DETECÇÃO DE *Scerotinia sclerotiorum*"

ALUNA: ALESSANDRA DE LOURDES BALLARIS

ORIENTADOR: PROF. DR. CLAUDIO CAVARIANI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CLAUDIO CAVARIANI



PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROFA. DRA. MARIA LAENE MOREIRA DE CARVALHO



PROF. DR. JOSÉ DA CRUZ MACHADO

Data da Realização: 10 de fevereiro de 2.014.

DEDICO

A minha mãe e irmãos, pelo amor, carinho e apoio nesta caminhada, a eles dedico todos os méritos desta conquista.

À DEUS, pela proteção e força em todos os momentos da minha vida.

"O mundo NÃO está interessado nas tempestades que você encontrou. Querem saber se trouxe o navio."

William McFee

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Cláudio Cavariani pela orientação e por acreditar.

A Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP (Botucatu), pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ), pela concessão de bolsa de estudo.

A Universidade Camilo Castelo Branco - Campus Fernandópolis, pela utilização dos equipamentos, espaço e realização de análises no Laboratório de Fitopatologia e Nematologia.

Ao Prof. Dr. José da Cruz Machado, pela colaboração, carinho e ensinamentos, que tornaram possível este trabalho.

A equipe do Departamento de Patologia de Sementes da UFLA, por todo companheirismo e amizade, em especial a Ellen Barrocas.

A todos os técnicos e funcionários de campo e laboratório de Fitopatologia e Nematologia da UNICASTELO Fernandópolis.

A todos os amigos de pós-graduação pela convivência e aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	12
SUMMARY	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 A importância econômica do mofo-branco.	17
2.2 Quadro sintomatológico do mofo-branco	19
2.2.1 Sintomatologia	19
2.2.2 Etiologia e epidemiologia da doença.....	20
2.2.3 Controle da doença	24
2.3 A qualidade de sementes.....	25
2.4 A semente como agente disseminador de <i>S. sclerotiorum</i>	27
2.5 Amostragem de sementes para validação de testes de sanidade.....	29
2.6 Amostragem Sequencial	31
2.6.1 Inferência Estatística	31
2.6.2 Testes de significância.....	31
2.6.3 Testes de hipóteses	33
2.6.4 Teste sequencial da razão de probabilidade	35
2.6.5 Amostragem sequencial no controle de qualidade sanitária de sementes	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Local do experimento	40
3.2 Obtenção das sementes	40
3.3 Plano de amostragem	41
3.3.1 Obtenção das amostras simples	41
3.3.2 Obtenção da amostra média e de trabalho	42
3.4 Avaliações preliminares.....	42
3.5 Teste da hipótese de presença - ausência do patógeno no lote	43

3.6	Determinação do tamanho da amostra necessária à detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para teste de sanidade de sementes.....	45
3.6.1	Obtenção e multiplicação do isolado fúngico.....	45
3.6.2	Inoculação das sementes.....	46
3.6.3	Avaliação da sensibilidade do teste Neon na recuperação de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes inoculadas artificialmente.....	46
3.6.4	Determinação do tamanho da amostra para <i>S. sclerotiorum</i>	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1	Determinação da heterogeneidade do lote	49
4.2	Teste da hipótese de presença - ausência do patógeno no lote	52
4.3	Determinação do tamanho da amostra necessária à detecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para teste de sanidade de sementes.....	55
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
5.	CONCLUSÕES	65
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de plântulas normais do teste de germinação para verificação da heterogeneidade dos lotes de sementes de feijão e de soja..... 50
- Tabela 2.** Valores médios obtidos nas determinações preliminares para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijão e de soja. Fernandópolis-SP,2013. 51
- Tabela 3.** Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão e de soja. Fernandópolis-SP, 2013..... 52
- Tabela 4.** Teste do qui-quadrado de aderência das frequências observadas às frequências esperadas, pela distribuição binomial, para presença de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja..... 53
- Tabela 5.** Porcentagem de sementes infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja obtidos através de dois testes de detecção. Fernandópolis-SP, 2013..... 54
- Tabela 6.** Avaliação da sensibilidade do teste Neon na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* para diferentes índices de incidência. Fernandópolis-SP, 2013.. 56
- Tabela 7.** Valores calculados dos limites de decisão do plano de amostragem sequencial para $p_0=0,01$, $p_1=0,005$ e $\alpha=\beta=5\%$ para grupos de sementes de tamanho $m=100$. Fernandópolis-SP, 2013. 57
- Tabela 8.** Tamanho médio da amostra (TMA) em função dos valores atribuídos a W no intervalo de -6 a 6. Fernandópolis-SP, 2013..... 60
- Tabela 9.** Número de sementes necessário no plano de amostragem sequencial para a decisão de aceitar ou rejeitar o lote, em função da presença de *Sclerotinia sclerotiorum* nas sementes de feijão e soja. Fernandópolis, 2013..... 62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Plano de amostragem dos lotes de sementes para obtenção de amostras. 41
- Figura 2.** Linhas de decisão do plano de amostragem sequencial com parâmetros $p_0 = 0,005$; $p_1 = 0,01$ e $\alpha = \beta = 0,05$ 58
- Figura 3.** Curva do tamanho médio de amostra do plano de amostragem sequencial para os parâmetros $p_0 = 0,005$; $p_1 = 0,01$ e $\alpha = \beta = 5\%$ 60
- Figura 4.** Curva característica de operação $CCO(p)$ do teste de verossimilhança para população total de *Sclerotinia sclerotiorum*. 62

RESUMO

Tendo em vista a elevação de áreas produtoras de sementes de feijão e de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e a recomendação do cumprimento do nível de tolerância zero para este agente patogênico na comercialização de sementes, o trabalho teve por o objetivo verificar a eficiência de um plano de amostragem sequencial para sementes de feijão e da soja, na detecção de *S. sclerotiorum*. Deste modo, primeiramente foi avaliada a heterogeneidade das amostras dos lotes dos cultivares de para as cultivares de feijão, cultivares Pérola (sementes C1), Pérola (“sementes salvas”) e Bolinha (“sementes salvas”), e de soja, cultivar IAC-Foscarin (sementes C1) pelos testes dos valores H e R e, concomitantemente verificada a qualidade fisiológica e sanitária utilizando-se métodos descritos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Para testar a presença ou ausência do patógeno foi realizada a verificação da distribuição do mesmo através do modelo binomial positivo, utilizando-se para este fim, o número de sementes infectadas naturalmente e recuperadas pelos testes Neon-S e Rolo de Papel. A eficiência do teste Neon-S, foi obtida para diferentes níveis de infecção (1:100, 1:200, ..., 1:1000), variando-se a proporção de 1 a 10 sementes por porção fixa analisada. Para a caracterização das amostras, a análise estatística para cada teste foi feita, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) de probabilidade. O plano de amostragem sequencial foi aplicado variando-se o tamanho da

amostra de 100 até 1000 sementes, em intervalos de 100 sementes, para os diferentes cultivares analisados. O plano de amostragem sequencial de sementes de soja e de feijão para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* na forma micelial foi eficiente, desde que 800 e 1.000 sementes sejam avaliadas, considerando incidências de 0,01 e 0,005%, respectivamente. Os métodos Neon-S e Rolo de Papel foram sensíveis na detecção micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e de feijão.

Palavras-chaves: Mofo-branco, transmissão micelial, Neon-S.

SEQUENTIAL SAMPLING IN SEEDS OF SOYBEAN AND BEANS IN THE DETECTION OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*. Botucatu, 2014. 77p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ALESSANDRA DE LOURDES BALLARIS

Adviser: CLÁUDIO CAVARIANI

SUMMARY

Given the elevation of producing areas of bean seeds and infected by *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean recommendation of compliance with level zero tolerance for this pathogen in the marketing of seeds, the study was aimed to verify the efficiency of a plan sequential sampling for seed beans and soybeans in *S. sclerotiorum* detection list. Thus, first the heterogeneity of samples of lots of cultivars to cultivars of beans, Perola (seeds C1), Perola ("saved seed") and Bolinha ("saved seed"), and soybean was evaluated, IAC - Foscarin (seeds C1) for values tests of H and R, concomitantly observed physiological and sanitary quality using methods described in the Rules for Seed Analysis (BRAZIL, 2009). To test for the presence or absence of the pathogen to check the distribution thereof was performed using the positive binomial model, using for this purpose the number of seed naturally infected and recovered by Neon-S and Roll Paper tests. The efficiency of Neon-S test was obtained for different levels of infection (1:100, 1:200, ..., 1:1000), varying the ratio 1 to 10 seeds per flat portion analyzed. For the characterization of samples, statistical analysis for each test was taken in a completely randomized design with four replications. Data were subjected to analysis of variance and the treatment means were compared by Tukey test ($P \leq 0,05$) probability. The sequential sampling method was applied by varying the sample size from 100 to 1000 seeds at intervals of 100 seeds for different cultivars analyzed. The sampling sequence of beans seeds and soybean for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in the mycelial form was efficient, since 800 and 1.000 seeds are evaluated considering incidences of 0,01 and 0,005%, respectively. Methods Neon-S and Roll Paper tests were sensitive in the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* mycelial seed and soya beans.

Keywords: White - mold, sampling, Neon-S

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de epidemias causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DeBary nas culturas de soja e feijão, em regiões onde ocorrem condições climáticas favoráveis ao patógeno, tem despertado, por parte dos produtores, grande preocupação. Até a década de 90 a ocorrência do mofo branco, designação comum da doença causada pelo respectivo patógeno, era mais restrita ao sul do Brasil e, esporadicamente em áreas de pivot central em Minas Gerais e Goiás. Porém, a falta dos devidos cuidados quanto a aquisição das sementes, utilização de “semente caseira ou pirata”, oriundas de áreas afetadas pelo mofo branco e os cuidados necessários com o beneficiamento, e a sucessão com culturas suscetíveis (soja, feijão, algodão) tornaram essa doença, atualmente, um dos maiores problemas fitossanitários.

A cada ano massivas perdas econômicas são sofridas tanto pelos agricultores como pelo comércio de sementes, causadas pelo mofo branco. Segundo Steadman (1983), uma semente infectada é capaz de formar mais de um escleródio, e este, por sua vez, formar até 20 apotécios e existe a capacidade de liberação de 2.000.000 de ascósporos no ambiente para cada apotécio formado. Os danos decorrentes da associação patógeno/semente resultam de reduções da emergência de plântulas e da produtividade, além de prejuízos a todo o sistema agrícola, com a disseminação da doença, ao tornar

regiões impróprias para o cultivo de espécies vegetativas. Assim, o aspecto sanitário, a exigir o controle de doenças transmissíveis pela semente, é relevante na produção agrícola uma vez que não se refere somente ao dano causado às sementes, mas, também, à própria expressão econômica de cada doença (MENTEN, 1995).

A semente é um artigo comercial e, para apoiar a sua negociação, produtores, vendedores e compradores de sementes requerem resultados confiáveis, das análises de sua avaliação. Por essa razão, a relevante uniformidade dos procedimentos de análises realizadas em diferentes laboratórios mediante padronização dos testes a serem executados na avaliação da qualidade das sementes. Estes, uma vez incorporados nas regras para análises, são, periodicamente avaliados quanto ao desempenho, adequação, aprimoramento ou mesmo elaboração de novos métodos.

Atualmente, constam das Regras para Análise de Sementes a recomendação de três métodos diferentes para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes de feijão e de soja, os quais sejam rolo de papel, *blotter test* e Neon. Os métodos recomendados e utilizados nas análises de sementes, tem dificuldades de precisão e de acurácia na obtenção de lotes de sementes artificialmente infectados, principalmente pela variabilidade na distribuição do patógeno. Assim, estudos para determinação do tamanho da amostra remetida para análise em laboratório, que possibilite a recuperação do fungo em condições de infecção natural de sementes tornam-se necessárias.

Neste sentido, o objetivo neste trabalho foi verificar a eficiência de um plano de amostragem sequencial para sementes de feijão e da soja, na detecção de *S. sclerotiorum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância econômica do mofo-branco.

O Brasil, os Estados Unidos e a Argentina foram responsáveis por 81% da produção e 90% da comercialização mundial de soja na safra 2012/2013, enquanto a Índia, o Brasil e a China responderam por $\frac{3}{4}$ da produção mundial de feijão, com de produção 2,81 milhões de toneladas na safra 2013/2014 pelo Brasil para esta cultura (CONAB, 2013).

As doenças constituem um dos principais fatores que limitam a produtividade das culturas gerando perdas, inviabilizando áreas de cultivo, bem como, onerando o produtor pelo aumento do custo de produção.

Dentre os inúmeros patógenos transmitidos e disseminados pelas sementes que podem causar perdas econômicas nas culturas do feijão e da soja, destaca-se o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. A introdução do referido patógeno foi detectada a partir da safra 1976/77, segundo Menten (1995), em lavouras no centro-sul do Paraná, sem provocar inicialmente, redução de produtividade. Vinte e quatro anos depois, perdas de 11,5 a 61% na região sul do Paraná, por ocasião da safra 2000/2001. Foi relatada no sul e regiões altas do cerrado (Goiás, Bahia, Minas, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) a

ocorrência de mofo branco em cerca de 60% de aproximadamente 5,5 milhões de hectares da área de cultivo de soja no país. Um milhão de hectares cultivados com soja no Estado de Goiás na safra 2008/2009 apresentaram cerca de 45% das áreas infectadas. Levantamentos de *S. sclerotiorum* em área de soja naturalmente infectada em 2010, revelaram níveis de incidência de 14 a 96% de mofo-branco, tornando incerta a capacidade futura de produção de sementes desta cultura e outras espécies de importância econômica. (JUNIO, BRANDÃO e MARTINS, 2013; MENTEN, CALAÇA e KREYCI, 2012; JACCOUD-FILHO et al., 2010; CAMPOS e SILVA, 2009; CARREGAL et al., 2008; YORINORI e FEKSA, 2001).

As perdas mencionadas são decorrentes de uma série de fatores, tais como, monocultivo, a sucessão de culturas com espécies suscetíveis (girassol, canola, feijão e algodão), uso de sementes infectadas na semeadura e condições ambientais favoráveis; são agravadas quando adotadas a irrigação por aspersão, o sistema de plantio direto nas áreas de cultivo e a redução do espaçamento entre linhas, pelo ao favorecimento ao desenvolvimento do patógeno. Nessas circunstâncias pode ser problemática a produção de sementes, uma vez que estas, quando oriundas de áreas contaminadas, podem dar origem a novos ciclos do patógeno, a curtas e longas distâncias, com conseqüente elevações da intensidade e da frequência da doença ou de novas raças do patógeno (REIS e NASCIMENTO, 2011; HENNEBERG, 2011a; BOTELHO, 2011; SOMDA, 2008; SILVEIRA e STONE, 2005; ZAMBOLIM, 2005; ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; MENEZES, 1995; CARDOSO, 1994; NEERGARD, 1979).

Outro aspecto a ser considerado atualmente, principalmente na cultura do feijão é a reserva de parte dos grãos produzidos para utilização subsequente como “sementes”, ou seja, “sementes salvas”. “Sementes salvas” são aquelas produzidas e guardadas pelo agricultor, ao final da colheita para fim exclusivo de plantio, na safra futura, pratica considerada legal, de acordo com o artigo 10º da Lei de Plantas e Cultivares (BRASIL, 1997):

“Não fere o direito de propriedade sobre a cultivar protegida aquele que reserva e planta sementes para uso próprio, em seu estabelecimento ou em estabelecimento de terceiros cuja posse detenha”

No entanto, acobertados por essa prerrogativa, muitos produtores, reservam não só a quantidade de “sementes” necessárias ao seu próprio plantio, mas,

também, quantidade extra para o comerciar ilegalmente sementes, atitude que eleva os danos sanitários e econômicos causados por *Sclerotinia sclerotiorum* no Brasil.

2.2 Quadro sintomatológico do mofo-branco

O fungo *S. sclerotiorum* é pertencente ao filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiaceae, gênero *Sclerotinia*, de ocorrência cosmopolita e observado tanto em regiões temperadas quanto subtropicais e tropicais no globo terrestre. É um fungo que pode atacar 408 espécies vegetais de 278 gêneros, entre plantas cultivadas e daninhas, à exceção das gramíneas, e causar a doença conhecida por diferentes designações, como mofo branco, podridão de esclerotinia, podridão branca da haste e murcha de esclerotinia, devido aos sintomas e sinais produzidos pelo patógeno nas plantas infectadas (CRATO, 2013; REIS et al., 2011; COSTA e COSTA, 2006; REIS e TOMAZINI, 2005; Index, 2013; BOLTON, THOMMA e NELSON, 2006; KIMATI et al., 2005; AGRIOS, 2005).

2.2.1 Sintomatologia

Plantas atacadas por *S. sclerotiorum* podem apresentar lesões em toda parte aérea, mas em geral, concentradas no terço médio e inferior. Haste principal, pecíolos, folhas e vagens, podem ser atacados e a doença é iniciada a partir de escleródios ou de apotécios, que produzem micélio e ascósporos, respectivamente, e que são responsáveis pela infecção e colonização (KIMATI et al., 2005; AGRIOS, 2005; ZAMBOLIM, 2004; STEADMAN, 1983).

Os sintomas do mofo-branco são muito semelhantes nas diversas espécies agrícolas susceptíveis e iniciam-se na junção do pecíolo com a haste, onde as flores e folhas desprendidas ficam geralmente retidas, aproximadamente 10 a 15 cm acima do solo, com a formação de micélio branco abundante. O início da infecção geralmente coincide com o final do período vegetativo e o florescimento da planta, quando pétalas de flores senescentes são colonizadas pelo fungo que, a seguir, invade outros órgãos. Nas folhas, surgem inicialmente, lesões encharcadas (anasarca) que tem seu tamanho aumentado, podendo tomar todo o órgão afetado, promover a perda da cor, tornando-as amareladas e posteriormente marrons, e culminar com a seca delas que se tornam leves e quebradiças. Nas vagens e haste principal, sob condições favoráveis, é possível verificar,

primeiramente, manchas de coloração avermelhada a arroxeada, de consistência mole (podridão mole), que evoluem rapidamente recobertas por uma densa massa de micélio branco, de aspecto cotonoso; deste são originados corpos duros, negros, irregulares, com poucos milímetros a alguns centímetros denominados escleródios que constituem estruturas de sobrevivência. Nos tecidos dos ramos atacados são criadas cavidades internas por destruição da medula, que são preenchidas com micélio e escleródios do patógeno. Com a extensão da necrose, a planta pode perecer e transmitir a doença às plantas vizinhas. As sementes infectadas ficam sem brilho, enrugadas com menor massa a transmissão do patógeno, pode ocorrer pelo micélio dormente interno aos seus tecidos, quanto por escleródios aderidos e ou misturados à elas. Frutos, tubérculos e raízes tuberosas também são atacados e apodrecem, podendo desenvolver um mofo branco e escleródios na superfície. (REIS, COSTA e LOPES, 2007; BOLTON et al., 2006; LEITE, 2005; KIMATI et al., 2005; AGRIOS, 2005; ZAMBOLIM, 2004; LAEMMLEN, 2001; STEADMAN,1983).

2.2.2 Etiologia e epidemiologia da doença

A epidemiologia estuda a dinâmica das populações das plantas e dos patógenos com o ambiente, visando a compreensão de cada um desses componentes e suas interações no processo da doença, possibilitando, desse modo, a tomada de decisões mais efetivas e menos perigosas para as culturas, para o homem e para o meio ambiente (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996; CAMPBELL e MADDEN, 1990).

O fungo *S. sclerotiorum* sobrevive no solo, sobre o solo e em resíduos de plantas infectadas na forma de escleródios, que mantém-se viáveis por períodos superiores a cinco anos (HUANG et al., 1998), e por 8 anos, quando enterrados no solo (STEADMAN, 1983; VENNETT, 1998), e altamente resistentes à substâncias químicas, ao calor seco até 70 °C e ao congelamento. Essa forma de sobrevivência proporciona longevidade e resistência ao patógeno, e permiti-lhe alcançar um elevado potencial de inóculo em áreas infestadas; é facilitada desta maneira, o início de um novo ciclo da doença em culturas suscetíveis, mesmo após 4 anos de rotação, com culturas não hospedeiras, conforme observado por Schwartz e Steadman (1978). Essa capacidade do agente da doença é uma ameaça à expansão das culturas de feijão e da soja, dentre outras,

por reduzir, consideravelmente o número de culturas alternativas, e economicamente interessantes, disponíveis para os produtores.

A sobrevivência e a germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum*, são afetados pela umidade do solo, pela temperatura, pelo tamanho, forma, localização e longevidade dos escleródios no solo, e por gases do solo, produtos químicos, atividades de outros microrganismos e nutrição, entre outros fatores (SILVA, et al., 2011; HAO, SUBBARAO e DUNIWAY, 2003).

A germinação dos escleródios podem ocorrer carpogênicamente ou miceliogênicamente, dependendo das condições ambientais e das culturas cultivadas, e significam a existência de dois tipos diferentes da doença. Quando a germinação carpogênica dos escleródios ocorre, há produção de um ou mais corpos de frutificação (apotecios) que liberam ascósporos durante várias semanas e infectam os tecidos das plantas próximas ao solo (CRATO, 2013; REIS et al., 2011; COSTA e COSTA, 2006; REIS e TOMAZINI, 2005; FERRAZ e CAFÉ-FILHO, 1998; SUTTON e DEVERALL, 1983; BOLLAND e HALL, 1988a); esse tipo de doença é verificada em grande diversidade de espécies. Boland e Hall (1988 a e b), estudando o número de apotecios no campo e a incidência de mofo-branco na cultura do feijão e da soja, verificaram relação quantitativa positiva entre as duas variáveis, evidenciando a importância deste tipo de infecção. Escleródios cuja germinação miceliogênica produzem hifas vigorosas que colonizam a matéria orgânica, e tem capacidade de iniciar o processo de infecção nos tecidos saudáveis, principalmente os suculentos, e da raiz das plantas, ao causar colapso das células parasitadas (AGRIOS, 2005). O micélio resultante de raízes infectadas introduzido do campo pode se espalhar para as raízes saudáveis adjacentes, originar novos focos da doença e expandir a doença ao armazenamento (REIS et al., 2011; REIS e TOMAZINI, 2005).

Os ascósporos são considerados a fonte primária de inóculo e podem sobreviver por mais de sete meses sob condições de baixa umidade. Sua liberação ocorre a partir do escleródio sob condições de baixos potenciais osmóticos, temperaturas variando de 8 a 16°C e umidade relativa do ar superior a 70%, sob tecidos senescentes que servem de fontes de energia para os esporos germinarem e infectarem adaxialmente os tecidos das plantas. Pétalas senescentes de plantas de canola e de feijão, bem como, estames de flores de ervilha e grãos de pólen, são citados como substratos para a germinação dos ascósporos, culminando com seu pleno desenvolvimento entre 4 e 12

semanas (CRATO,2013; COSTA e COSTA, 2006; HUANG et al., 1998; DILLARD, LUDWIG e HUNTER, 1995; TURKINGTON e MORRALL 1993; HUANG e KOKKO, 1992; PRATT e ROWE, 1991; INGLIS e BOLAND, 1990; TU, 1989). Micélios dormentes de *S. sclerotiorum* em sementes infectadas também podem estar envolvidos na propagação da doença. A sobrevivência de micélios dormentes em sementes infectadas variou, em média, de 85 a 90 %, não se alterando significativamente ao longo de um período de três anos, segundo Tu (1988).

A disseminação de *S. sclerotiorum* pode ser realizada pelo próprio escleródio, aderido aos implementos agrícolas, e em restos culturais, ou pelas sementes aderidas, misturadas ou internamente infectadas com o micélio do fungo. A dispersão ocorre pelo contato entre plantas doentes, grãos de pólen, água (chuva, respingos, irrigação), vento, insetos e sementes; quando semeadas, essas sementes não germinam, mas produzem escleródios criando uma fonte adicional de inóculo primário da doença (CRATO, 2013; COSTA e COSTA, 2006; BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 2005; HUANG e HOES, 1980; TU, 1988).

A transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente pôde ser verificada por Yang, Workemeh e Lundeen (1998) ao observarem que sementes de soja naturalmente infectadas produziram plantas doentes, e concluírem que estas serviam como agente de transmissão do patógeno.

Silva et al. (2008) observaram a formação de escleródios em sementes de feijão submetidas a teste de patologia e recomendaram a não utilização do lote representado; a justificativa para tanto, é que a ocorrência de uma semente infectada na amostra é preocupante, pois pode haver produção de mais de um escleródio, e estes, por sua vez, originarem numerosos corpos de frutificação do fungo (apotecios), que podem liberar uma nuvem de esporos infectantes em poucos dias, da ordem de 2.000.000 de ascósporos com possibilidade de iniciar o processo infeccioso (STEADMAN, 1983).

Bianchini, Maringoni e Carneiro (2005) relataram a ocorrência de infecção por *S. sclerotiorum* em tecidos do feijoeiro, na junção do ramo com o pecíolo, onde ficam aderidos pétalas ou folhas caídas. O patógeno na ausência de nutrientes exógenos, segundo Sutton e Deverall (1983) citado por Michereff, Andrade e Meneses (2005), desenvolvem pequenos tubos germinativos que penetram pela cutícula dos tecidos saudáveis jovens do feijoeiro e desenvolvem-se inter e intracelularmente apenas quando

proveniente dos ascósporos, uma vez que os escleródios são incapazes de infectar as plantas, mesmo sob condições favoráveis, na ausência de uma fonte de energia.

Yang, Lundeen e Uphoff (1999) afirmaram que a incidência de *S. sclerotiorum*, em cultivares de soja sob condições de campo está relacionada aos grupos de maturação das mesmas: cultivares de ciclo longo apresentam maior incidência da doença que as de ciclo curto. Segundo os autores, o fato pode ser atribuído ao maior período de florescimento em cultivares de ciclo longo, período mais sujeito à infecção devido à liberação dos ascósporos. Porém, segundo Juliatti et al. (2013), a doença é mais favorecida com o fechamento da cultura, geralmente coincidente com o florescimento, e principalmente com as condições ambientais favoráveis. Mesmo após a queda de todas as flores nos genótipos super precoce de soja, foram encontrados apotécios do fungo liberando ascósporos, bem como sintomas da doença nas axilas das folhas presentes no baixeiro.

As condições favoráveis ao desenvolvimento da doença e desencadeamento de epidemias severas de mofo-branco são a alta umidade, pois o apotécio requer um período de molhamento foliar entre 39 e 64 horas, aliada às temperaturas moderadas variando entre 15 e 25°C segundo Boland e Hall (1987), e elevada população de plantas. A temperatura ótima é variável com a espécie do patógeno (*S. minor*, de 18 a 25°C, e para *S. sclerotiorum*, o ideal de 10°C), conforme verificado por Hao, Subbarao e Duniway (2003).

A temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio situa-se entre 10 e 21°C segundo Almeida et al. (2005), e entre 5 e 30°C segundo Bianchini, Maringoni e Carneiro (2005). Assim, cabe salientar que a ocorrência de epidemias de mofo-branco na cultura de feijão e da soja, e se deve a favorabilidade climática ocorrida durante a safra, ou seja, excesso de precipitação aliado a temperaturas amenas (abaixo de 20°C) e altitude acima de 800 metros. Estudos realizados em condições controladas demonstraram que o número de escleródios enterrados que germinaram carpogenicamente em culturas de cenoura aumentou quando a umidade foi mantida constantemente na capacidade de campo (COUPER, 2001).

2.2.3 Controle da doença

Os métodos convencionais para o controle de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* incluem o controle químico, o melhoramento para resistência a doenças e o controle cultural. Em 2011 foram registrados alguns produtos comerciais do princípio ativo fluazinam e procimidona que mostraram boa eficiência de controle, porém, com custo mais elevado do que o dos benzimidazóis. Vale ressaltar que mesmo esses fungicidas não têm conseguido assegurar um controle igual ou superior a 80% da doença, como é preconizado pelo MAPA. Mesmo assim, poderão vir a se constituir uma das ferramentas importantes no manejo do mofo-branco, juntamente com a utilização de semente certificada, livre de escleródios (HENNING, 2009a).

O patógeno causador do mofo-branco apresenta alta agressividade, inexistem cultivares de soja com resistência completa ou imune, e sim cultivares com resistência parcial que auxiliam, consideravelmente, o manejo dessa doença, e na redução das perdas causadas (JULLIATI, 2013). A obtenção de cultivares resistentes é limitada pelas características genéticas do patógeno e produção de fitotoxinas. Assim, o controle da doença pode ser realizado pelo uso de cultivares com características desejáveis, como altura, maturidade precoce e resistência ao acamamento das plantas, que auxiliam na redução da doença principalmente pela redução do microclima favorável na região do colo das plantas.

Adicionalmente, reveste-se de importância no controle a recomendação do sistema integrado de medidas, como a utilização de sementes isentas do patógeno, aração profunda do solo, rotação de culturas, queima dos restos culturais contaminados, controle da água de irrigação, espaçamento maiores, entre e dentro das linhas para redução da propagação da doença pelo contato das plantas, e controle biológico (HENNERBEG et al., 2011b).

A introdução de espécies como *Urochloa ruziziensis* ou *Urochloa brizantha* nos sistemas produtivos de grãos também é útil ao manejo de doenças causadas por patógenos do solo, tais como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*, respectivamente causadores do mofo-branco e da podridão radicular, em espécies como a soja e o feijoeiro-comum (TOLEDO-SOUZA et al., 2008; GÖRGEN et al., 2009).

Conforme Görgen et al. (2009), em área altamente infestada por *S. sclerotiorum*, a alta eficiência da palhada de braquiária como barreira física à produção de

apotécios e determinou a possibilidade de utilização dessa gramínea forrageira para o controle biológico deste patógeno no sistema de plantio direto. A produção de palhada é eficiente em reduzir a população de escleródios no solo, que representam a principal fonte de inóculo e a parte fundamental no ciclo de vida do patógeno (CLARKSON et al., 2003).

A severidade do mofo-branco em diferentes hospedeiros é, em geral, proporcional à densidade de inóculo do patógeno no solo. Portanto, a redução da população de escleródios é essencial ao controle efetivo do mofo-branco que, além disso também deve bloquear a formação de apotécios e a ejeção de ascósporos e minimizar a produção de novos escleródios pelo controle preventivo da doença na parte aérea das plantas (GÖRGEN, et al., 2010).

A ocorrência de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão e de soja é relativamente baixa, raramente ultrapassando o índice de 2% (HENNERBEG, 2011a; PERES, 1996), e segundo a Embrapa (2005), a transmissibilidade do fungo da planta para a semente, na forma de micélio dormente, é inferior a 0,01%, mas torna necessário o desenvolvimento de métodos baratos, rápidos e reprodutíveis, sensíveis para detecção desse patógeno. Clara é, pois, a necessidade relevante de métodos de análise laboratorial rápidos, precisos e baratos para determinar, com eficiência, a presença deste patógeno nas sementes de soja, de modo a prevenir a infestação de áreas isentas ou, ainda, elevação do potencial de inóculo nos solos onde a cultura já é cultivada, evitando, assim, possíveis epidemias.

2.3 A qualidade de sementes

De maneira generalizada, qualidade de um produto significa adequação ao uso (MONTGOMERY, 1985). Em sementes, para que a qualidade seja adequada, uma série de providências, ao longo de todo o processo de sua inspeção de campo, produção e manuseio, devem ser tomadas no sentido conferi-la ao produto final. A verificação, portanto, conceitos de qualidade e análise de sementes não podem ser confundidos, como frequentemente ocorre, uma vez que a análise por si só constitui-se, apenas, em ferramenta que orienta o controle,

No Brasil, o cultivo de feijão e da soja é praticado em uma ampla diversidade de ecossistemas, e em consequência, diversos fatores podem limitar a ampliação da produtividade, expansão ou mesmo, a manutenção das áreas de plantio em

regiões agroclimáticas favoráveis para esta finalidade. O desempenho das culturas depende da conjugação de seus potenciais genéticos, condições edáfo-climáticas, práticas culturais, épocas de semeadura e da população de plantas (REIS e CASA, 1996; VIEIRA, 1988 e POPINIGIS, 1985).

Grande número de patógenos agressivos, considerados de risco, pode pelas sementes ser disseminado entre as diferentes regiões produtoras dentro de um mesmo país, tornando algumas áreas ou até mesmo regiões impróprias para o cultivo de algumas culturas, e mesmo entre países. Patógenos associados às sementes podem influenciar a proporção, a velocidade e a uniformidade da germinação e da emergência de plântulas, além da possibilidade de constituir fonte de inóculo nas áreas semeadas. Assim, prejuízos podem estender-se ao longo da produção, tanto em quantidade quanto em qualidade do produto final (FREITAS, 2005; HENNING, 2005; BOTELHO, 2011; YORINORI e FEKSE, 2001; MACHADO, 1994; MENTEN, 1991; GOULART, 1987; NEERGAARD, 1979).

Durante a maturação das plantas e a colheita da soja, os escleródios podem cair e permanecer sobre a superfície do solo ou serem colhidos com a semente (ALMEIDA et al., 2005). Estruturas do patógeno presentes nas sementes constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias e podem permanecer viáveis por longos período, quando elas são armazenadas (MACHADO, 1988; GOULART, 1987). O patógeno pode ser carregado internamente e/ou transportado por frações impuras do lote, que podem conter micélio, corpos de frutificação e esporos de fungos, cistos ou galhas de nematóides, células e partículas bacterianas (GOULART, 1987; MACHADO, 1988; MACHADO, 2000; BALARDIN et al., 2005).

Para que a análise possa avaliar adequadamente lotes de sementes é requerido o emprego de métodos padronizados de modo que os resultados sejam uniformes e comparáveis; considerando o aspecto sanitário, os testes podem ser considerados como uma medida preventiva, tanto nos programas de quarentena quanto no sistema de produção de semente certificada. (MARCOS-FILHO, CÍCERO e SILVA, 1987, CARVALHO, 1999, VECHIATO et al., 2000; HENNING, 2005; LIMA JR, 2010).

2.4 A semente como agente disseminador de *S. sclerotiorum*

Segundo Botelho (2010), existem poucos relatos na literatura sobre a importância do micélio de *S. sclerotiorum* na disseminação e transmissão da doença quando este está associado às sementes de espécies hospedeiras, como soja e feijão. O patógeno, como a maioria dos fungos destas culturas, pode ser transmitido via semente, como micélio dormente ou como contaminante na forma de escleródio.

A transmissão pode ocorrer da planta à semente e da semente à planta; neste último caso, a semente pode veicular o patógeno, porém não desencadear o processo da doença, a transmissibilidade ocorre somente se houver o estabelecimento do agente patogênico (NEERGAARD, 1979).

Portanto, a concretização da transmissão dos patógenos às plantas, a partir de sementes, pode ocorrer de diferentes maneiras, em função da localização do inóculo do patógeno na semente (tegumento, tecido de reserva ou no embrião) e da natureza de atuação desses agentes nos hospedeiros correspondentes. A transmissibilidade do agente causal da doença por semente depende de vários fatores intrínsecos e extrínsecos. Segundo Lima et al. (1985), a severidade da doença no campo nem sempre corresponde à porcentagem de sementes infectadas pelo patógeno e plantas com baixo índice de infecção podem dar origem a muitas sementes contaminadas.

A associação entre a severidade da doença e a recuperação do fungo nas sementes pode estar ligada à época em que o patógeno ataca a cultura. Elevadas porcentagens de associação de patógenos com sementes estão relacionadas com redução da germinação delas e do desenvolvimento de plântulas nos seus primeiros estádios (YORINORI, 1982); também são responsáveis pela transmissão de doenças para a parte aérea e sistema radicular da planta, decréscimo na qualidade fisiológica e morte das plântulas resultantes (MACHADO, 2000).

A transmissibilidade de *S. sclerotiorum* pelas sementes depende de fatores do ambiente e do hospedeiro e do tipo de germinação das sementes. Concretizada a transmissibilidade torna-se relevante a detecção de micélio dormente para a tomada de decisão relacionada ao controle da doença. (MACHADO, 1988).

Estudos sobre transmissão de patógenos são importantes, por gerarem subsídio ao estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes. Padrões de campo quanto à ocorrência de doenças são entendidos

como o número máximo de plantas infectadas acima do qual os surtos epidêmicos são iminentes (HEWETT, 1987; MACHADO, 1994).

Segundo Nasser e Carvajal (1999), quanto maior o grau de incidência na semente mais rápido é o desenvolvimento das doenças, com formação de escleródios em poucos dias. Em situação de campo, isto poderá representar uma maior capacidade de produção de apotécio e menor dependência das condições ambientais, uma vez que possivelmente não necessitaria de muitos dias de ambiente favorável para a formação do escleródio e do apotécio.

Brustolin et al. (2012), estudando o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos aéreos via lesão cotiledonar, e a produção de escleródios de *S. sclerotiorum* observaram resultados de emergência de plântulas de 8,3% e 95% das sementes infectadas e não infectadas, respectivamente, devido principalmente ao fato de 86,7% dos embriões das sementes infectadas terem sido mortos pelo fungo. Em média, uma única semente teve capacidade de originar até 2,18 escleródios, no interior do solo, constituindo-se dessa forma, na fonte de inóculo em lavouras.

Vieira et al. (2001) testaram a eficiência de quatro fungicidas aplicados via água de irrigação por aspersão no controle do mofo-branco do feijoeiro em área infestada por *Sclerotinia sclerotiorum* e verificaram ausência de influência dos tratamentos na incidência do fungo nas sementes que variou de 0,25% (procimidone) a 1,08% (fluazinam aplicado no solo).

A detecção de sementes infectadas naturalmente, provenientes de áreas infestadas, é dificultada em laboratório, e exige elevação do número de dias de incubação das semente, pelo método “*blotter test*”, de sete para 30 dias (BRASIL, 2009); Hoffman et al. (1998), analisando sementes naturalmente infectadas de campos de produção de soja por *S. sclerotiorum*, encontraram incidências entre 0 a 95% no campo e apenas 0,3 a 0,7% nas sementes, razão para considerar-se como reduzida taxa de disseminação pela semente, resultado esse corroborado por Embrapa (2010) que relatou a recuperação de apenas 0,01% do patógeno em sementes de soja.

Porém, o inverso ocorre em sementes inoculadas artificialmente, conforme verificado por Peres (1996) que ao inocular sementes de soja, pelo contato destas com colônias de *Sclerotinia sclerotiorum*, em meio BDA por 30 horas de exposição, obteve uma recuperação do patógeno entre 35 a 100% das sementes inoculadas; fato

semelhante foi observado por Napoleão et al. (2006) que constataram a presença de escleródios nas sementes inoculadas artificialmente em poucos dias.

A condição sanitária é extremamente importante, considerando-se que as sementes são veículos de agentes fitopatogênicos que nelas podem se alojar e com elas serem levados ao campo, provocando redução de germinação e vigor e originando focos primários de doenças, tornando-se um parâmetro para tomada de decisão do controle da disseminação da doença para novas áreas a detecção do patógeno na semente (STEADMAN, 1983; MUELLER et al., 1999; GOULART, 2005; JACCOUD-FILHO et al., 2010; HENNERBEG, 2011a).

O estabelecimento de padrões de sanidade para *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja tem sido discutido pelo setor sementeiro no Brasil, no intuito de ser adotado pelos sistemas de controle de qualidade de sementes certificadas. Devido a relevância deste organismo para a agricultura nacional, a proposição de tolerância zero para este patógeno em amostras de sementes básicas, certificadas e fiscalizadas de soja no Brasil, tem sido sugerida de maneira emergencial no país. (MACHADO, 1994; MENTEN, 1997; MACHADO e POZZA, 2005).

Cabe ressaltar que à transmissibilidade de *S. sclerotiorum* pela semente ainda é discutível, não havendo uma relação da porcentagem da transmissão de sementes infectadas na forma micelial nas culturas de soja e feijão e outras espécies hospedeiras deste patógeno.

2.5 Amostragem de sementes para validação de testes de sanidade

O objetivo da amostragem de sementes é obter uma amostra representativa, de tamanho adequado, visando à realização dos testes para avaliação da sua qualidade, portanto, do lote por ela representado. Quando a amostra é originada de um lote de sementes, é esperado que o resultados reflitam a qualidade média do mesmo. Para tanto, a amostra deve conter todos os componentes em proporções semelhantes do lote de sementes. Após a análise no laboratório, a qualidade fisiológica e ou sanitária do lote, é representada através de modelos matemáticos e estatísticos aplicados a eles. Observou-se que principal fonte de variação nos resultados dos testes é devida a falta de precisão na amostragem, logo, cuidados devem ser tomados retirada das amostras simples no armazém

e na obtenção da amostra de trabalho, para que os resultados da análise sejam confiáveis (CARVALHO, et al., 2011).

Na prática nem sempre a população em estudo é homogênea; assim, detalhes do planejamento de amostragem devem ser considerados pelo pesquisador, em cada situação, para que os procedimentos adotados assegurem o alcance resultados consistentes e coerentes em relação a população.

A amostragem usada para análise sanitária de sementes segue o mesmo procedimento empregado para a determinação da porcentagem de germinação, e pode não ser adequado para a detecção de patógenos presentes em um lote. Em consequência, poderia ocorrer influência nos resultados da análise sanitária, como falsos negativos.

Em uma análise sanitária envolvendo 10.400 sementes incubadas pelo método “*blotter test*”, representando um lote, foram observadas oito sementes contaminadas por *S. sclerotiorum* (HENNING et al., (2009). Assim, há possibilidade que analisando somente 400 sementes não seja detectada a presença do patógeno, ou seja, um resultado falso negativo. Estudos de amostragem devem ser uma das abordagens pesquisadas para novos parâmetros de representatividade do teste de detecção de patógenos em semente, segundo Hennerbeg et al. (2011b).

Os testes de sanidade foram baseados nos testes de germinação quanto ao número de 400 sementes da amostra de trabalho tomadas ao acaso da fração de sementes puras. No entanto, o tamanho real da amostra, para testes de sanidade, depende da frequência de ocorrência do patógeno nas sementes (CARVALHO, et al., 2011). Trabalhos que estimaram o tamanho real de uma amostra para detecção de fungos em análises de rotina são raros e, especificamente para *S. sclerotiorum*, inexistentes.

Mathur e Kongsdal (2003) verificaram que os fungos *Ustilago tritici*, *Ustilago nuda* e *Sclerospora graminicola* geralmente estão presentes nas sementes em quantidades vestigiais. Frequentemente, a incidência é de 0,1% inferior, sendo infecções maiores ocasionais ou raras. Para se detectar a incidência 0,1%, um mínimo de 1000 embriões infectados extraídos de sementes terão de ser examinados. Uma vez que é possível perder um embrião em uma população de mil, é essencial que pelo menos 2 a 3 repetições de 1000 embriões sejam examinados em testes de rotina de sanidade de sementes. Dessa forma, segundo Carvalho et al. (2011), dependendo do método do teste, a amostra média inteira ou parte dela pode ser usada como amostra de trabalho.

Cockerell e Roberts (2011) avaliaram três níveis de infecção (1%, 1,5% e 4%) de embriões de sementes de ervilha por *Ustilago nuda* em amostras de trabalho, do teste de heterogeneidade dos lotes utilizando o teste de distribuição binomial, constatado ser este de distribuição uniforme para todos os níveis de infecção estudados, no entanto, a repetibilidade e reprodutibilidade do teste utilizado para detecção do patógeno não foi satisfatória para os 13 laboratórios utilizados no experimento, indicando a dificuldade da sua realização e avaliação dos lotes para este patógeno.

2.6 Amostragem Sequencial

2.6.1 Inferência Estatística

A avaliação da qualidade de um lote de sementes a partir de uma amostra é de fato um procedimento inferencial para o qual é solicitado auxílio da estatística. Toda e qualquer inferência estatística pode ser classificada em dois tipos de procedimentos: Estimativa de Parâmetros que descrevem a população (o lote) sob estudo ou Teste de Hipóteses sobre esta população. Estimando ou testando, o usuário tratará com os três preceitos fundamentais da inferência: utilidade da inferência, certeza da inferência e custo da inferência (SANTANA, 1994).

Mesmo que estimar seja um procedimento útil em tecnologia de sementes, testar ainda é mais prático e suficiente em muitos casos. Basicamente dois tipos de Testes de Hipóteses existem: os Testes de Significância e os Testes de Hipóteses propriamente ditos. No primeiro tipo, essencialmente o que faz é avaliar as evidências que uma amostra apresenta, contra ou a favor, à uma pré-determinada hipótese, chamada tradicionalmente de Hipótese de nulidade, H_0 . Já nos Testes de Hipóteses propriamente ditos, procura-se levar em consideração também uma segunda hipótese H_1 , chamada de Hipótese Alternativa (SANTANA, 1994; BANZATTO e KRONKA, 1995; ANDRADE e OGLIARI, 2007).

2.6.2 Testes de significância

Os processos que nos permitem decidir a aceitação ou rejeição de uma determinada hipótese são denominados de testes de significância. Porém, ao tomar-se

a decisão de aceitar ou rejeitar uma hipótese, é possível a incorreção em dois tipos de erros: Erro Tipo I e Erro Tipo II. O Erro Tipo I é aquele cometido ao se rejeitar uma hipótese verdadeira que deveria ter sido aceita, sendo este, controlado através do nível de significância do teste (α). O Erro Tipo II é representado pela letra β e corresponde ao erro cometido ao aceitarmos uma hipótese falsa em detrimento de uma verdadeira (BANZATTO e KRONKA, 1995; ANDRADE e OGLIARI, 2007). O custo para um teste de significância é diretamente proporcional ao aumento da amostra, tamanho este dimensionado para que o teste tenha um nível de significância α pré-estabelecido (SANTANA, 1994).

Na avaliação de qualidade sanitária, um parâmetro a ser considerado é a porcentagem infecção. Pode-se então usar um teste de significância para testar $H_0: p=p_0$, ou seja, a hipótese de que a porcentagem de infecção de um lote é igual a p_0 . Um teste de significância verificará se uma amostra de n sementes reúne evidências suficientes para rejeição de H_0 . Se \hat{p} tem uma distribuição Normal Aproximada, com uma média p e desvio padrão $\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$ (ROHATGI, 1976). O nível de Significância do Teste ou o Valor da Probabilidade do teste é definido como a probabilidade de \hat{p} ser maior do que p_0 , ou de \hat{p} ser menor do que o valor encontrado na amostra, se este valor é menor do que p_0 .

Na prática, é comum fixar-se um valor mínimo de significância α (frequentemente adotado como 0,05 e 0,01) e convencionou-se que um valor de probabilidade abaixo de α leva a rejeição de H_0 ; $\frac{\hat{p} - p_0}{\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{n}}} \geq Z\alpha$ (rejeita-se H_0).

A ideia de nível de significância do teste pode ser generalizada pelo conceito de curva de Operação, que é definida pela função de p dada por:

$$P\{\text{aceitação de } H_0 / \text{porcentagem de infecção } p\}$$

Neste caso em específico, segundo Andrade e Ogliari (2007), esta função é dada por:

$$Prob = \left(\frac{\frac{\hat{p} - p_0}{\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{n}}}}{n} \right) < Z\alpha$$

Esta função permite calcular a probabilidade de se cometer o erro Tipo I, em função de um valor verdadeiro p de porcentagem de infecção do lote, ou seja, a hipótese nula será rejeitada caso a proporção amostral de uma amostra n seja menor que P . O nível de significância do teste é um dado particular dessa função, exatamente quando $p=p_0$ de tal modo que: Nível de Significância = $1 - \alpha$, valor da curva característica de operação do teste, para $p=p_0$. Este valor corresponde a confiança de se tomar uma decisão correta ao rejeitar a hipótese.

Voltando a considerar o custo da inferência, vê-se que este teste usa uma amostra com tamanho n fixo (neste caso 400 sementes para testar a sanidade do lote). Mas, a princípio, nada impede que se teste sequencialmente, não fixando a priori, o tamanho da amostra (WALD, 1947).

À cada semente ensaiada pode-se calcular a quantidade $\left(\frac{\hat{p}-p_0}{\frac{\sqrt{p_0(1-p_0)}}{n}} \right)$.

Para o primeiro valor de n , se a quantidade for maior do que $Z\alpha$, rejeita-se p_0 ; enquanto $\left(\frac{\hat{p}-p_0}{\frac{\sqrt{p_0(1-p_0)}}{n}} \right)$ for menor que $Z\alpha$, continua-se amostrando. Este procedimento sequencial apresenta como fator limitante, a possibilidade de se amostrar indefinidamente, sem tomar uma decisão sobre o lote de sementes. Uma solução para este problema seria limitar o número de sementes ensaiadas em um valor n -máximo, por exemplo, n -máximo = 400 sementes. Desta forma, constrói-se um teste sequencial truncado de significância, com risco de cometer o erro de rejeitar uma hipótese verdadeira controlado em no máximo α (SANTANA, 1994).

2.6.3 Testes de hipóteses

Independente da escolha do tamanho do teste (fixo ou sequencial), os testes de significância atentam somente para os riscos do produtor e sementes, não levando em consideração que o comprador das sementes também corre riscos, e que estes devem ser controlados. Enquanto um produtor perde, se uma semente isenta de patógenos é classificada como contaminada em um teste, um comprador será prejudicado se uma semente infectada for classificada como sadia pelo mesmo teste. Ambos são erros e devem ser controlados. Usando ainda a porcentagem de infecção, pode-se definir $H_0: p=p_0$ como a

hipótese que afirma um valor baixo (p_0) para a infecção das sementes e conseqüentemente, $H_1: p > p_1$, como a hipótese que afirma que um valor alto para esta mesma característica do lote (SANTANA, 1994; ANDRADE e OGLIARI, 2007).

O Teorema de Neyman e Pearson (1933) segundo Santana (1994) permite a elaboração de um teste de hipóteses que garante a menor probabilidade β de se aceitar uma hipótese H_0 falsa à uma probabilidade α de rejeitar H_0 verdadeira. Dessa forma, para o problema de testar a porcentagem de infecção de sementes, pode-se inferir que o teste de hipóteses que avalia $H_0: p = p_0$ contra a hipótese $H_1: p > p_1$ ($p_1 > p_0$) com o α pré-fixado para com o menor valor possível é dado por:

$$\left(\frac{\frac{\hat{p} - p_0}{\sqrt{p_0(1 - p_0)}}}{n} \right) \geq Z\alpha \quad \therefore \text{Rejeição de } H_0$$

onde:

\hat{p} : corresponde a porcentagem de infecção da amostra de n sementes (ANDRADE e OGLIARI, 2007).

Em geral, ao realizar um teste de hipóteses e controlado o erro do tipo I fixando-se a sua probabilidade de ocorrência α . Para a detecção de uma hipótese nula quando ela é falsa, Erro Tipo II, é possível através da relação Nível de significância = $1 - \beta$, que pelo Teorema de Neyman e Pearson pode ser obtido atribuindo-se alguns valores, escolhidos dentro do caso alternativo.

Como p não é conhecido, uma solução seria calcular o tamanho n da amostra necessário para que tanto o α e o β alcançassem níveis pré-fixados (por exemplo: $\alpha = \beta = 0,05$ se $p = p_0$ para α , e $p = p_1$ para β). Este valor de n é dado por:

$$\hat{p} (1 - \hat{p}) \frac{(z_\beta - z_\alpha)^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

Este procedimento é forçosamente sequencial, pois depende do valor amostral de p . Uma vez atingido ou superado o valor n pela expressão, é interrompida a amostragem e tomada uma decisão (aceitação ou rejeição da hipótese nula). Logo, ao rejeitar H_0 corre-se o risco α de se ter cometido o Erro Tipo I e assim, se

aceitar a hipótese nula, corre-se o risco β de cometer o Erro Tipo II (SANTANA, 1994; ANDRADE e OGLIARI, 2007).

O cálculo do tamanho da amostra em uma amostragem sequencial no caso da porcentagem de infecção sementes, deve considerar o número n de sementes necessária para se tomar uma decisão, e que este é função da sua quantidade, $\hat{p}(1 - \hat{p}) \frac{(z_\beta - z_\alpha)^2}{(p_1 - p_0)^2}$, e enquanto essa quantidade for maior que o número de sementes já ensaiadas, deve-se continuar amostrando. Uma vez atingida a quantidade igual ou menor ao número de sementes já amostradas, cessa-se o processo e toma-se uma decisão. Sendo \hat{p} uma variável aleatória, o número necessário para se tomar uma decisão sobre o lote (n) também o é, porém, enquanto \hat{p} tem uma distribuição normal aproximada para amostras grandes, n tem uma distribuição de probabilidade um pouco complicada. Dessa distribuição, o primeiro e maior interesse se resume em conhecer o tamanho médio da amostra $E(n)$ que determinará quantas sementes em média são necessárias para se tomar uma decisão quanto a infecção do lote (SANTANA, 1994).

Wald e Wolfowitz (1948), utilizando o Teorema de Neyman e Pearson demonstraram que os testes sequenciais de hipótese (baseados no teste Sequencial da Razão de Probabilidade (TSRP), WALD (1947)), além de permitirem o controle satisfatório de α e β , possuem a vantagem da redução do tempo de amostragem e de custos, sendo que em certos casos requer, em média, amostras com um terço do tamanho que seria utilizado com a amostragem de tamanho fixo para a tomada de decisão sobre o lote, evidenciando a vantagem deste sobre os testes de hipóteses tradicionais.

Quando as exigências de qualidade são predeterminados e a tarefa do controle de qualidade é verificar o cumprimento destes, então o método sequencial de amostragem pode ser aplicado. Atualmente, a International Seed Testing Association (ISTA), recomenda a utilização do TSRP em vários testes de análise de qualidade de sementes devido a sua representatividade em relação a qualidade real dos lotes examinados.

2.6.4 Teste sequencial da razão de probabilidade

O Teste da Razão de Probabilidade Sequencial é um caso específico de teste de hipótese, desenvolvido por Abraham Wald em 1933 originalmente

para estudos de controle de qualidade em sistemas de manufatura. É uma generalização do teste da razão de máxima verossimilhança para análises sequenciais.

Esse teste é popularmente conhecido como “teste do funil”. É utilizado quando é desejada opção pela aceitação ou rejeição do desempenho de algum sistema que faça uso de requisitos estatísticos. O Teste Sequencial da Razão de Probabilidade (TSRP) é utilizado sempre de forma a se reduzir o tamanho de uma amostra para se ter a confiabilidade esperada de um sistema.

Uma função de distribuição de uma certa variável x dada por $f(x)$ e que esta função tem apenas um parâmetro θ que é desconhecido. Este parâmetro pode ter apenas 2 valores, θ_0 e θ_1 e deseja-se testar a hipótese de que $\theta = \theta_0$. Denomina-se então a hipótese $\theta = \theta_0$ de H_0 , hipótese nula, e a hipótese $\theta = \theta_1$ de H_1 , hipótese alternativa. Considera-se os dados que estão sendo analisados uma sequência de variáveis aleatórias $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$.

Para qualquer inteiro positivo n , quando H_1 for verdadeira, a densidade de probabilidade da sequência de amostras acima definidas será:

$$(i) P_{1n} = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_1)$$

e, analogamente, quando H_0 for verdadeira:

$$(ii) P_{0n} = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_0)$$

Estabelecido isto, o TSRP de Wald determina que, em qualquer estágio da amostragem sequencial, onde já se coletou uma amostra de tamanho n , se:

$$(iii) \frac{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_1)}{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_0)} \geq A \quad \text{então, a amostragem deve ser}$$

cessada e deve-se rejeitar H_0 ;

$$(iv) \frac{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_1)}{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_0)} \leq B \quad \text{então, a amostragem deve ser}$$

cessada e deve-se rejeitar H_1

$$(v) A < \frac{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_1)}{p(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n : \theta_0)} < B \quad \text{então, continue amostrando}$$

sequencialmente, isto é, observe o valor x_{n+1} da variável sob estudo

Para fins computacionais, é interessante calcular o logaritmo das desigualdades acima, o que facilita o cálculo da razão P_{1n}/P_{0n} .

As constantes A e B são escolhidas de tal forma que as probabilidade de erro α e β , erros tipo I e II respectivamente, sejam especificadas. Pode ser mostrado que são válidas as seguintes relações (WALD, 1947):

$$A = \frac{1 - \beta}{\alpha}$$

$$B = \frac{\beta}{1 + \alpha}$$

O tamanho médio da amostra é também uma variável aleatória, uma vez que se trata de um procedimento sequencial, o que pode originar problemas muitas vezes, pois o tamanho da amostra fica muito grande, no entanto, toda amostragem sequencial determinada por TSRP termina, ou seja, em algum valor de n ela cessará. Procedimentos truncados tem sido considerados, onde um número máximo de elementos é imposto (ELLIS e WHITEHEAD, 1987).

Considerando o parâmetro porcentagem p de infecção de um lote de sementes por um fungo específico de decidir entre dois valores para p : ou o lote está com uma porcentagem p_0 de infecção abaixo do nível de tolerância para o patógeno, ou está com a porcentagem p_1 acima do tolerado. Grupos de sementes de tamanho m devem ser amostrado, para que seja evitada a realização de ensaio semente-à-semente. Nesta situação, o TSRP determina que em cada grupo amostrado seja contado o número de sementes infectadas, por exemplo: em um grupo composto por 10 sementes apresenta 2 (X_1) com crescimento fúngico característico, e assim sucessivamente coleta-se os dados de infecção em cada grupo, obtendo-se um conjunto de valores final de X_1, X_2, \dots, X_n . Estes valores, devem então ser comparados com dois limites de decisão, o l_i (limite inferior) e l_s (limite superior).

Considerando um tamanho n de amostras, provenientes de k grupos contendo m sementes, teremos que o tamanho da amostra será igual ao produto de seus constituintes, ou seja, $n = mk$ e o seu total acumulado será $\sum_{i=1}^k X_i \leq l_s$ devendo-se tomar a decisão de rejeitar H_1 e aceitar H_0 , considerando assim o lote com a porcentagem de infecção abaixo do nível de tolerância e conseqüentemente, liberado para sua comercialização com assegurada qualidade sanitária. Se, $\sum_{i=1}^k X_i \geq l_s$, deve-se rejeitar H_0 e aceitar H_1 , considerando o lote infectado e, por sua vez, condenado para uso como semente. No entanto, se o total acumulado estiver entre o limite inferior e superior $l_i < \sum_{i=1}^k X_i < l_s$, o analista deverá continuar amostrando.

As retas de decisão sobre a liberação ou condenação do lote são representadas pelos seguintes modelos matemáticos:

$$li = b + an \quad e \quad ls = c + an$$

onde:

$$a = \frac{\ln\left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)} \quad b = \frac{\ln\left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)} \quad c = \frac{\ln\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)}$$

O estudo do tamanho médio da amostra para um TRSP para a porcentagem de infecção de sementes em função de p ($TMA_{(p)}$), pode ser obtido a partir da expressão:

$$TMA_p = \frac{P_p \cdot (b - c) + c}{p - a}$$

onde: $P_p = \frac{\left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^W - 1}{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^W - \left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^W}$ é a aceitação de $H_0: p=p_0$

Os valores de p e W estão associados pela expressão:

$$p = \frac{1 - \left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)^w}{\left(\frac{p_1}{p_0}\right)^w - \left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)^w}$$

A variável W é considerada auxiliar, assim uma tabela com valores de $TMA_{(p)}$ em função de p pode ser obtida atribuindo-se valores à W em um intervalo adequado, o que é um recurso adequado para facilitar os cálculos.

2.6.5 Amostragem sequencial no controle de qualidade sanitária de sementes

Mesmo quando um método é incorporado as Regras para Análise de Sementes, é sujeito a exames contínuos para verificação de seu desempenho e adequação, de modo a indicar aperfeiçoamentos a virem ser implementados.

A ISTA e a Association of Official Seed Analysts (AOSA), buscando sempre a adequação a uniformidade e a verificação do desempenho de seus métodos, empregam desde a década de 80, análises estatísticas baseadas na amostragem

sequencial para aprimoramento de seus métodos para avaliação a qualidade fisiológica das sementes; no entanto, ainda são raros os estudos para seu uso na determinação da qualidade sanitária das sementes.

A redução dos custos mediante obtenção de amostras representativas do lote sempre foi o objetivo do processo de amostragem. Esta redução será mais provável se o processo possibilitar o emprego de amostras de tamanho variável em função da qualidade do lote, e os testes possibilitarem que as sementes sejam prontamente avaliadas, evitando assim processos subsequentes de beneficiamento e armazenamento de lotes condenados. A importância da amostragem sequencial desta forma, está na possibilidade de redução do tamanho da amostra do teste, igualdade de riscos na tomada de decisão e confiança nos dados obtidos (SANTANA, 1994).

A amostragem sequencial tem se mostrado mais rápida e confiável que a amostragem convencional (FERNANDES, 2002) e, de acordo com BARBOSA (1992), caracteriza-se por utilizar número variável de unidades amostrais, ao contrário da amostragem convencional que utiliza número fixo de unidades amostrais. Na amostragem sequencial, a avaliação pode classificar rapidamente a população do organismo tratado em grandes categorias como baixa, média ou alta, ou ainda indicar a necessidade de adoção de alguma medida de controle ou não, por exemplo. O tamanho da amostra não é constante, dependendo do tamanho da população (KOGAN & HERZOG, 1980). Assim, a decisão de terminar a amostragem e tomar uma decisão depende, em cada etapa, dos resultados obtidos até então e, por este motivo, a amostragem sequencial requer, em média, amostras com um terço, ou menos, do tamanho que seria utilizado com a amostragem de tamanho fixo (WALD, 1947).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Camilo Castelo Branco – Campus de Fernandópolis e pela UNESP-Botucatu em conjunto com o departamento de fitopatologia da Universidade de Lavras.

3.2 Obtenção das sementes

As sementes comerciais de feijão da categoria Certificada 1 (C1), cultivar Pérola, e soja da categoria Certificada 1 (C1), cultivar IAC Foscarin, (safra 2012/2013) utilizadas no experimento foram fornecidas pela Coordenadoria de Assistência técnica Integral (CATI) - Núcleo de Produção de Sementes de Fernandópolis (NPS/FE) e coletadas na unidade por um amostrador da empresa credenciado. As “sementes salvas” de feijão das variedades Pérola e Bolinha foram obtidas diretamente de produtores e provenientes de áreas com histórico de incidência de *S.sclerotiorum* na região de Fernandópolis-SP.

3.3 Plano de amostragem

3.3.1 Obtenção das amostras simples

Para verificação da homogeneidade do lote para a *Sclerotinia sclerotiorum*, foi realizado o teste de heterogeneidade para sementes acondicionadas em recipientes (teste do valor H e teste do valor R). Para tanto, as amostragens nos lotes de sementes seguiram o esquema abaixo (Figura 1), respeitando as Regras de análise de sementes, que recomenda a coleta de 30 amostras simples totais para pilhas de lotes de 600 sacas de 25Kg cada (BRASIL, 2009).

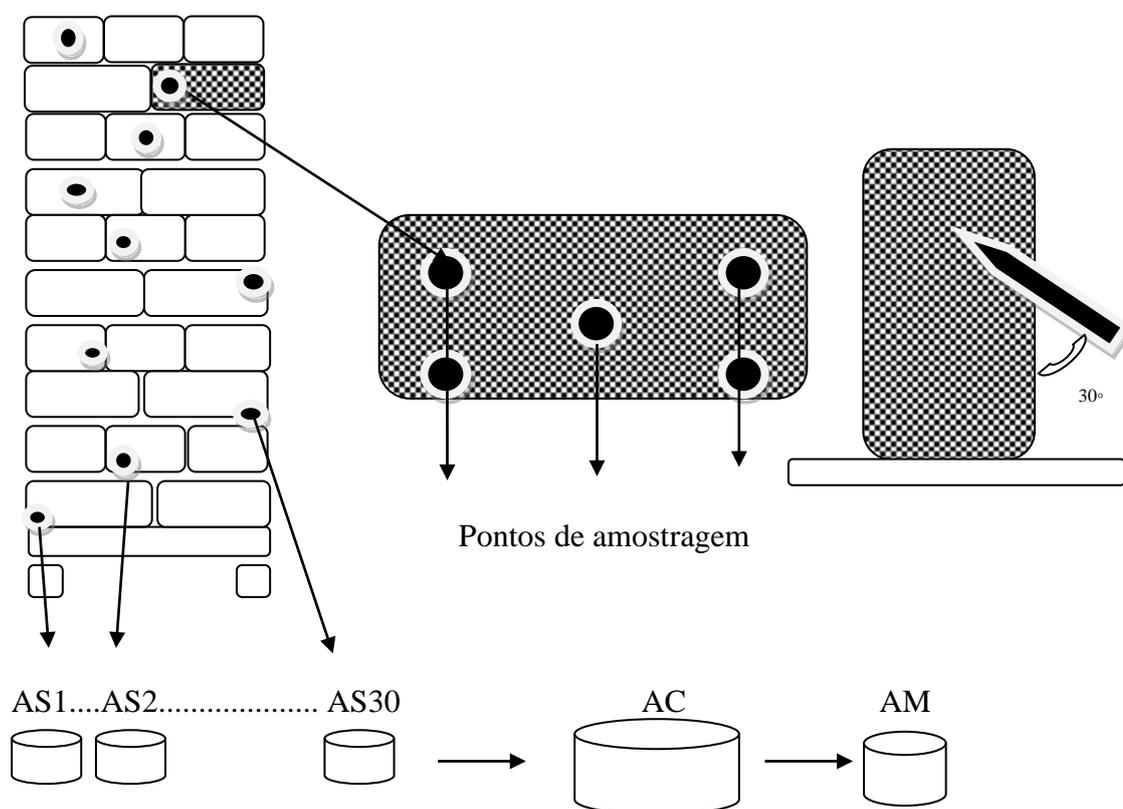


Figura 1: Plano de amostragem dos lotes de sementes para obtenção de amostras.

Foram amostrados três lados da pilha com emprego de um calador simples inclinado a 30°, totalizando dez sacos por lado. Os pontos de amostragem das sacas para obtenção das amostras simples (AS) seguiram o esquema em intensidade de 2 posições de ponto por lado. No total, para cada variedade, foram obtidas 30 amostras

simples de 2 Kg cada, sendo as amostras acondicionadas em sacos de papel trifoliolados e armazenadas a 12°C e 45% de umidade relativa do ar.

3.3.2 Obtenção da amostra média e de trabalho

As sementes da AS que restaram após análises para avaliar a presença ou ausência de *Sclerotinia sclerotiorum* foram somadas e deram origem a uma amostra composta (AC) do lote. A amostra média (10Kg), foi obtida após sucessivas passagens da amostra composta pelo difusor tipo Dinamarques e armazenadas em 5 sacos de 2Kg cada, sob as condições descritas, até sua utilização para as determinações em laboratório.

3.4 Avaliações preliminares

As amostras dos lotes de sementes tiveram seus perfis fisiológico e sanitário caracterizados mediante os Índices de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação e Teste do Papel de Filtro:

a) Teste de germinação: todas as amostras de sementes foram submetidas ao teste de germinação em laboratório, conduzido com quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em rolo de papel germitest umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato e mantidas em germinador tipo BOD, regulado a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (Brasil, 2009). A avaliação do teste foi realizada no nono dia após a instalação do experimento para as sementes de feijão e no oitavo dia para as sementes de soja, sendo os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais.

b) Teste do papel de filtro: as sementes foram dispostas individualmente sobre camada de papel de filtro umedecido (3 discos sobrepostos), mantendo-se distanciadas 1-2 cm uma das outras, acondicionadas em placas de Petri. Os recipientes foram colocados sob lâmpadas de luz fluorescente branca, a distância de 30-40 cm, em câmaras com fotoperíodo de 12 horas pelo período de 7 dias a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Brasil, 2009). As sementes foram examinadas individualmente com auxílio de um estereomicroscópio e microscópio ótico quando necessário para confirmar a identidade dos

fungos em nível de espécie. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos.

c) Índices de Velocidade de Germinação das plântulas (IVG): é um índice calculado a partir de dados de contagem de plantas germinadas e que tem por objetivo estabelecer as diferenças na velocidade de germinação de acessos, grupos ou lotes de sementes. Nesse experimento foram observadas plantas germinando até o nono dia para feijão e oitavo dia para soja, e o índice calculado segundo Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Em que:

IVG = índice de velocidade de germinação.

G_1 , G_2 e G_n = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem.

N_1 , N_2 e N_n = número de dias da instalação do teste à primeira, à segunda e à última contagem.

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x + 100}$ e submetidos à análise de variância pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.5 Teste da hipótese de presença - ausência do patógeno no lote

Primeiramente, testou-se o ajuste dos dados obtidos para a porcentagem de sementes infectadas pelo fungo à distribuição binomial positiva, cuja função probabilística, conforme Johnson & Kotz (1969), é dada por:

$$P_x = \left(\frac{k!}{x!(k-x)!} \right) \cdot p^x \cdot q^{(k-x)}$$

onde:

k = um número inteiro e positivo;

x = número de vezes que o evento ocorre.

As fórmulas de recorrência para calcular as probabilidades de x ocorrências são:

$$P_0 = q^k$$

$$P_x = \frac{p}{q} \cdot \frac{(k-x+1)}{x} \cdot P(x-1) \quad x = 1, 2, 3, \dots, k$$

onde:

p = probabilidade de uma semente qualquer da unidade amostral ser atacada pelo fungo;
 q = probabilidade de uma semente qualquer da unidade amostral não ser atacada pelo fungo;
 k = número máximo de sementes infectadas na unidade amostral.

O ajuste das distribuições de frequências foi verificado através do teste qui-quadrado (X^2) dado por:

$$X^2 = \frac{(FOi - FEi)^2}{FEi}$$

onde:

FOi e FEi = frequência observada e esperada, respectivamente na i -ésima classe.

Para a realização do teste qui-quadrado fixou-se uma frequência esperada mínima igual a 0,005. O número de graus de liberdade associado à estatística X^2 foi dado por:

$$G.L. = N_c - N_p - 1$$

onde:

N_c = número de classes da distribuição de frequências;
 N_p = número de parâmetros estimados na amostra.

O critério do teste foi de rejeitar o ajuste da distribuição estudada a 5% de probabilidade quando:

$$X^2 > \chi^2 (N_c - N_p - 1, \alpha = 0,05).$$

Para a avaliação do modelo matemático, foi utilizada a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes naturalmente infectadas nas amostras simples pelos seguintes métodos abaixo descritos:

a) Método de Incubação de Rolo de Papel: consistiu na utilização do rolo de papel de germinação (Germitest ®), 28 x 37,5 cm, o qual foi previamente esterilizado em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada água esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Cada rolo foi constituído de três folhas de papel de germinação: duas sob as sementes e uma cobrindo-as. Foi realizado o exame laboratorial de 400 sementes, distribuídas em oito rolos com 50 sementes para cada rolo, que posteriormente foram incubadas no germinador a temperatura de 20 °C, sob

condições de 100% de umidade relativa e regime de escuro contínuo. As avaliações foram realizadas após 14 dias de incubação por observação visual da formação de escleródios. Quando não foi possível a sua observação, plântulas infectadas e sementes mortas (circundadas por micélio característico de *Sclerotinia sclerotiorum*) foram transferidas para caixas plásticas do tipo Gerbox®, contendo duas folhas de papel de filtro previamente umedecido com água na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato. Após três dias de incubação a 20 °C e, sob regime de 12 horas de luz por 12 horas de escuro contínuo, foi observada a formação de escleródios nas sementes e plântulas;

b) Método Neon-S: sua composição consistiu de BDA (200g de batata, 20 g de dextrose e 20g de ágar/ litro), 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol e manitol com potencial osmótico de – 1,0 MPa. O pH final foi ajustado para 4,6 com HCl e NaOH. Posteriormente, o mesmo foi autoclavado a 1 atm (120 °C) por 20 minutos, obtendo-se um meio de coloração azul que foi vertido em placas de Petri. Em seguida, foram tomadas aleatoriamente 10 sementes e dispostas em placa com o meio Neon-S, totalizando 40 placas com 400 sementes. As placas foram distribuídas em câmaras de incubação a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. As leituras foram realizadas por um período de oito dias, tendo seu início no terceiro dia após a montagem do teste. O teste foi considerado o positivo quando ao redor da semente era observado o crescimento de um halo amarelo-avermelhado, indicando a presença de *S. sclerotiorum*. Procedeu-se, concomitantemente, análise das sementes ao microscópio estereoscópico quanto ao crescimento de micélio característico em redor das sementes.

Para a caracterização das amostras, a análise estatística para cada teste foi feita, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) de probabilidade.

3.6 Determinação do tamanho da amostra necessária à detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* para teste de sanidade de sementes.

3.6.1 Obtenção e multiplicação do isolado fúngico

Escleródios de *S. sclerotiorum* obtidos de culturas hospedeiras do patógeno severamente atacadas.

As estruturas de sobrevivência do patógeno foram submetidas a desinfecção superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 5 min, lavado três vezes em água destilada e transferidas para placas de Petri contendo meio BDA (200g de batata, 20 g de dextrose e 20g de ágar/ litro). As placas foram mantidas em câmara de incubação a temperatura de 20 ± 2 ° C no escuro, por sete dias. Discos de 9 mm de diâmetro cortados das fronteiras das colônias crescentes foram transferidos para as placas de Petri contendo BDA e incubados sob as mesmas condições relatadas anteriormente, por um período de cinco a sete dias, obtendo-se assim, culturas puras.

3.6.2 Inoculação das sementes

Culturas puras de *S. sclerotiorum* foram transferidas para placas de Petri contendo meio de BDA e incubadas durante sete dias em câmara tipo B.O.D. a temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Findo este tempo, as sementes foram depositadas em camada simples sobre a cultura do fungo e mantidas durante 48 horas no escuro, conforme descrito por Botelho (2011).

3.6.3 Avaliação da sensibilidade do teste Neon na recuperação de *S. sclerotiorum* em sementes inoculadas artificialmente.

Para verificar a sensibilidade do teste, amostras de sementes de feijão e soja das cultivares Pérola (“salva”), Pérola (comercial) e Bolinha (“salva”) e soja, foram inoculadas com sementes infectadas na proporção de 1/100, 1/200, 1/300.....1/1000, respectivamente, variando o número de sementes infectadas de 1 para 10 e submetidas ao teste Neon conforme já descrito.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$) de probabilidade.

3.6.4 Determinação do tamanho da amostra para *S. sclerotiorum*

A amostragem sequencial foi utilizada para determinação do número de sementes necessária para verificar com precisão a infestação do lote por *S.*

sclerotiorum. Para a detecção do patógeno foi empregado o teste (NEON), já descrito anteriormente, para sementes natural e artificialmente infectadas, sendo esta última infectada na proporção de 1/100 a 1/1000 sementes, obtendo-se assim níveis de infecção do lote variando de 0,01 a 0,001%, respectivamente.

Os riscos de α e β de se tomar decisões erradas foram pré-fixados em 5%, isto é, $\alpha = \beta = 0,05$, devido 5% de probabilidade de erro ser um limiar comum.

Para sementes de feijão e de soja, os valores de p_0 e p_1 , foram estabelecidos em 1% e 0,5 %, respectivamente, por serem valores compatíveis com os padrões de tolerância estabelecidos para *Sclerotinia sclerotiorum*.

As retas de decisão sobre a liberação ou condenação do lote são representadas pelos seguintes modelos matemáticos:

$$li = b + an \quad e \quad ls = c + an$$

onde:

$$a = \frac{\ln\left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)} \quad b = \frac{\ln\left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)} \quad c = \frac{\ln\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)}{\ln\left(\frac{p_1(1-p_0)}{p_0(1-p_1)}\right)}$$

O estudo do tamanho médio da amostra para a porcentagem de infecção de sementes em função de p (TMA_p), pode ser obtida a partir da expressão:

$$TMA_p = \frac{P_p \cdot (b - c) + c}{p - \alpha}$$

onde: $P_p = \frac{\left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^W - 1}{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^W - \left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^W}$ é a aceitação de $H_0: p=p_0$

Os valores de p e W estão associados pela expressão:

$$p = \frac{1 - \left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)^w}{\left(\frac{p_1}{p_0}\right)^w - \left(\frac{1-p_0}{1-p_1}\right)^w}$$

A variável W é considerada auxiliar, assim uma tabela com valores de $TMA_{(p)}$ em função de p pode ser obtida atribuindo-se valores à W em um intervalo adequado, o que é um recurso adequado para facilitar os cálculos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação da heterogeneidade do lote

Os resultados para determinação da heterogeneidade dos lotes de feijão e de soja quanto à porcentagem de germinação, encontram-se na Tabela 1.

Os valores do teste H dos lotes, considerando as amostras simples retiradas, foram de 1,02, 0,81, 0,65 e 0,19 para as cultivares de feijão, cultivares Pérola (sementes C1), Pérola (“sementes salvas”) e Bolinha (“sementes salvas”), e de soja, cultivar IAC-Foscarin (sementes C1), respectivamente, enquanto o valor de H tabelado para verificação da heterogeneidade dos lotes em nível de 1% de probabilidade é de 1,10 (BRASIL, 2009). O teste do valor R revelou, para a categoria de teste de germinação em nível de 1% de probabilidade e as amplitudes máximas toleradas, valores de 20, 24, 23 e 18 também de modo respectivo para as sementes de feijão, cultivares Pérola (sementes C1), Pérola (“sementes salvas”) e Bolinha (“sementes salvas”), e de soja, cultivar Foscarin (sementes C1).

Os resultados analíticos para verificação da heterogeneidade dos lotes das espécies e cultivares estudados mostraram que os mesmos devam ser considerados não heterogêneos, com base na porcentagem de plântulas normais do teste de germinação, em função da ausência de significância pelos testes dos valores H e R.

Tabela 1. Porcentagem de plântulas normais do teste de germinação para verificação da heterogeneidade dos lotes de sementes de feijão e de soja.

Amostras simples	Feijão			Soja
	cv. Pérola sementes C1	cv. Bolinha “sementes salvas”	cv. Pérola “sementes salvas”	cv. Foscarin sementes C1
1	87,0	81,5	74,0	92,0
2	87,5	82,0	73,0	90,5
3	90,0	77,0	86,5	90,0
4	95,5	76,5	79,0	91,5
5	89,5	85,0	80,0	89,5
6	89,5	80,5	78,0	95,0
7	88,5	80,5	78,0	91,0
8	87,5	82,0	76,5	86,5
9	86,5	77,0	77,0	88,5
10	85,5	78,0	74,0	91,5
11	86,5	76,5	80,0	85,5
12	87,5	86,5	80,0	92,5
13	86,0	75,5	83,5	89,0
14	88,5	78,0	83,5	92,5
15	88,0	87,0	87,5	91,0
16	86,0	84,5	77,0	90,0
17	80,5	79,5	84,5	93,0
18	83,5	90,5	79,5	95,0
19	83,0	85,0	84,5	94,5
20	88,0	79,5	81,5	89,5
21	87,0	88,0	84,5	90,0
22	84,5	84,5	79,0	93,5
23	94,0	81,5	79,0	93,5
24	87,5	81,5	78,0	91,0
25	86,5	82,5	80,0	93,0
26	94,5	86,5	76,0	94,5
27	82,0	81,0	86,0	89,0
28	83,0	83,0	83,0	92,5
29	84,5	79,0	83,0	94,0
30	80,25	82,0	88,0	91,5
\bar{X}	86,955	81,733	81,217	91,367
H	1,02 ^{NS(1)}	0,65 ^{NS}	0,81 ^{NS}	0,19 ^{NS}
R	6,75 ^{NS}	7,50 ^{NS}	7,50 ^{NS}	4,75 ^{NS}
R _t	20 ⁽¹⁾	23	24	18
H _t	1,10 ⁽²⁾			

^{NS} Não significativo, ⁽¹⁾ Valores de R tabelados (BRASIL, 2009), ⁽²⁾ Valores de H tabelados (BRASIL, 2009).

Assim, com a indicação de que os lotes tem atributos característicos semelhantes, podem ser eles utilizados para as análises padronizadas em laboratório, conforme Brasil (2009).

Na Tabela 2 são dispostos os dados qualitativos fisiológicos das sementes certificadas C1 de feijão e de soja e de “sementes salvas” de feijão utilizadas na pesquisa. As sementes C1 de feijão, cv.Pérola, tiveram germinação e vigor (IVG) superiores ao de “sementes salvas” das cultivares Pérola e Bolinha, verificando-se, ainda, ausência de diferença estatística entre estas últimas.

Tabela 2. Valores médios obtidos nas determinações preliminares para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijão e de soja. Fernandópolis-SP, 2013.

Cultivares	Germinação %*	IVG
Feijão-cv Pérola-sementes C1	86,95 a **	8,39 a
Feijão-cv Bolinha-“sementes salvas”	81,73 b	7,85 b
Feijão-cv Pérola-“sementes salvas”	81,22 b	7,59 b
F	0,15	0,58
CV (%)	2,05	4,03
Soja-cv IAC Foscarin-sementes C1	91,37	8,77
F	0,20	0,71
CV (%)	1,37	3,48

* Dados transformados; ** Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As diferenças significativas entre os lotes de sementes de feijão são reveladoras da importância do uso de sementes comerciais para implantação das lavouras, ao invés de “sementes salvas”. Plantios sucessivos de sementes de mesma origem (“sementes salvas”) acarretam perdas de produtividade pela gradual redução da qualidade, tanto genética quanto fisiológica, e elevação da ocorrência de impurezas, de microrganismos e de misturas varietais, com prejuízos aos produtores, aos consumidores e ao ambiente.

Os resultados obtidos para a análise da qualidade fisiológica das sementes de soja da cultivar IAC-Foscarim (Tabela 2) permitem constatar sua alta qualidade, ficando nitidamente clara a importância fundamental de se utilizar semente de origem conhecida, que culminam com o estabelecimento da população de plantas requerida pela cultivar, maior velocidade de emergência e desenvolvimento das plantas, culminando no fechamento das entrelinhas rapidamente, o que resulta também no controle eficiente das ervas daninhas e contribui para que sejam alcançados níveis altos de produtividade.

A cultura do feijoeiro, segundo Menten (1995) e Machado (2000), é sujeita a uma ampla variedade de patógenos, grande parte dos quais com efeitos negativos à qualidade fisiológica das sementes produzidas e o inóculo presente nelas poderá resultar em aumento das doenças no campo e sua introdução em áreas livres de patógenos. Os resultados da análise sanitária dos lotes revelada pelo método de incubação pelo Papel-de-Filtro são apresentados na Tabela 3. Nitidamente, foram menores as incidências de patógenos em sementes comerciais, categoria C1, em relação às verificadas em “sementes salvas”, não chegando a comprometer a qualidade das sementes.

Tabela 3. Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão e de soja. Fernandópolis-SP, 2013.

Fungos/Feijão	cv Pérola sementes C1	cv Pérola “sementes salvas”	cv Bolinha “sementes salvas”
<i>Phoma</i> spp.	0	1	0,5
<i>Fusarium</i> spp.	0,25	2	1
<i>Aspergillus</i> spp.	2	13,5	9,75
<i>Penicillium</i> spp.	3	5	8,5
<i>Rhizopus</i> spp.	6	11	7,75
Fungos/Soja	cv Foscarin – sementes		
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0		
<i>Phomopsis sojae</i>	5		
<i>Fusarium</i> spp.	1,75		
<i>Aspergillus</i> spp.	0,75		
<i>Penicillium</i> spp.	6		

Os fungos recuperados das sementes C1 de soja, cultivar IAC-Foscarin, são coincidentes aos relatados por Bracini et al. (2000), Machado (2000), Goulart (2005), Henning (2009), Henneberg (2011a), Sousa (2011) e Barros e Juliatti (2012) como os mais frequentes gêneros em sementes de soja. Estas espécies infectam as sementes interna ou externamente ao tegumento, sendo na maioria dos casos, responsáveis pela baixa germinação das sementes e, como consequência, tem-se a produção de sementes de soja com reduzida qualidade fisiológica, ressaltando-se que a incidência dos patógenos veiculados por essas sementes estão dentro dos níveis toleráveis.

4.2 Teste da hipótese de presença - ausência do patógeno no lote

Na Tabela 4 são dispostos os dados correspondentes à presença-ausência de *S. sclerotiorum*, conforme fórmula descrita por Bernoulli (ANDRADE e OGLIARI, 2007), que seguiram o modelo de distribuição binomial positiva e pode ser adotado para elaboração de planos de amostragem sequencial com a finalidade de detecção do referido patógeno em lotes de sementes.

Os resultados verificados neste trabalho (Tabela 5) para infecção natural das sementes pelo teste Neon-S para as cultivares de feijão (0,25%, amostra -12 cv. Pérola, “sementes salvas”) e pelo método do Rolo de Papel (0,25%, amostras 19 e 26, cv. Pérola, “sementes salvas”) vem ao encontro dos observados por Tu (1988), Peres (1996), Hoffman et al. (1998), Yang (1998), Nasser et al. (1999), Parisi (2006), Henning (2009),

Tabela 4. Teste do qui-quadrado de aderência das frequências observadas às frequências esperadas, pela distribuição binomial, para presença de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja.

Amostras Simples	Binomial Positiva								G.L.
	NEON-S				Rolo de Papel				
	cv. Pérola sementes C1	cv. Bolinha “sementes salvas”	cv. Pérola “sementes salvas”	cv. Foscarin sementes C1	cv. Pérola sementes C1	cv. Bolinha “sementes salvas”	cv. Pérola “sementes salvas”	cv. Foscarin sementes C1	
1	2,0 ^{ns(1)}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
2	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
3	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
4	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
5	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
6	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
7	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
8	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
9	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
10	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
11	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
12	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	198,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
13	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
14	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
15	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
16	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
17	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
18	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
19	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	198,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
20	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
21	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
22	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
23	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
24	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
25	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
26	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	198,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
27	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
28	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
29	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398
30	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	2,0 ^{ns}	398

(1)^{ns}= não significativo

Botelho (2011), Hennerbeg (2011a) e Teles (2012), ou seja, baixos índices de recuperação dopatógeno (0,25 a 2%) pelos métodos tradicionais de detecção.

Teles (2012), avaliando a recuperação de patógenos pelos testes Neon-S e Rolo de Papel em sementes de feijão, detectou níveis médios de infecção variando de 0 a 1,58%, observando diferenças na eficiência do teste quanto a recuperação do patógeno em sementes infectadas naturalmente de um mesmo campo, porém de safras diferentes.

As diferenças de incidência e recuperação do patógeno nas sementes observadas na literatura podem ocorrer devido à vários fatores intrínsecos e

Tabela 5. Porcentagem de sementes infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja obtidos através de dois testes de detecção. Fernandópolis-SP, 2013.

Amostra Simples	NEON -S				ROLO DE PAPEL			
	cv.Pérola sementes C1	cv. Bolinha “sementes salvas”	cv. Pérola “sementes salvas”	cv. Foscarin sementes C1	cv.Pérola sementes C1	cv. Bolinha “sementes salvas”	cv. Pérola “sementes salvas”	cv. Foscarin sementes C1
1	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS*}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
2	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
3	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
4	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
5	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
6	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
7	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
8	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
9	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
10	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
11	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
12	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
13	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
14	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
15	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
16	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
17	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
18	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
19	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0 ^{NS}
20	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
21	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
22	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
23	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
24	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
25	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
26	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0 ^{NS}
27	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
28	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
29	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
30	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}

*^{NS} Não significativo pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

extrínsecos à semente, conforme Yorinori (1982) e Machado, (2000), e na falta de precisão na amostragem, segundo Carvalho (2011).

A detecção de *S. sclerotiorum* na forma micelial verificada neste trabalho, é de extrema importância, pois caracteriza a contaminação de sementes que deveriam ser descartadas e, no entanto, são reutilizadas pelo produtor na safra seguinte, potencializando o aumento da área infectada dentro da propriedade, ou de outras áreas produtoras devido à venda ilegal como “sementes salvas”. Cabe lembrar que Steadman (1983), correlacionando a ação do vínculo deste patógeno às sementes com os potenciais danos futuros nos campos de produção, observou que esta poderia originar aproximadamente 2.000.000 de ascósporos (inóculo inicial) através da germinação dos

escleródios aderidos ou misturados a elas. Também Nasser et al. (1999) ressaltaram que apenas uma semente infectada é capaz de originar 625 focos primários da doença em um campo de 250.000 plantas/ha, evidenciando, assim, o problema do comércio ilegal de sementes e da utilização de “sementes salvas” pelo produtor.

Conforme a Tabela 6, foi constatada a sensibilidade do teste Neon-S à presença do patógeno *S. sclerotiorum* ao ser detectado 100% das sementes infectadas artificialmente, independente da proporção empregada, fato que confirma a eficiência deste meio semi-seletivo quanto ao seu objetivo. Resultados semelhantes também foram observados por outros autores, porém sem diferenciação de nível de infecção (NAPOLEÃO, et al., 2006; HENNERBEG, 2011a; BOTELHO, 2011). A capacidade do método em acusar a presença do patógeno em baixas porcentagens de infecção nas sementes é, por si só, relevante. Contudo, os dados verificados de sementes infectadas naturalmente são irrisórios, comparativamente aos constatados em sementes artificialmente inoculadas; nestas, o teste Neon é sempre sensível.

Segundo a ISTA (2013), a falta dos devidos cuidados quando da amostragem e da manipulação das amostras em laboratório constitui o principal fator a determinar erros e discrepâncias entre resultados de análises de sanidade de sementes. Assim, a amostragem tradicional de sementes de lotes infectados por fungos, como *S. sclerotiorum*, pode não ser representativa e vir a indicar um lote como isento quando na realidade está infectado pelo patógeno (HENNING et al., 2009).

4.3 Determinação do tamanho da amostra necessária à detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* para teste de sanidade de sementes.

No tabela 7 são apresentados os valores calculados para os limites inferiores (l_i) e superiores (l_s), adotando-se os números anteriormente mencionados $p_0 = 0,5\%$ e $p_I = 1\%$, cujas fórmulas são dadas a seguir:

$$\alpha = \frac{\text{Ln} \frac{1 - 0,005}{1 - 0,01}}{\text{Ln} \frac{0,01 (1 - 0,005)}{0,005 (1 - 0,01)}} = 0,007216 \quad b = \frac{\text{Ln} \frac{1 - 0,05}{0,05}}{\text{Ln} \frac{0,01 (1 - 0,005)}{0,005 (1 - 0,01)}} = 4,21728$$

Tabela 6. Avaliação da sensibilidade do teste Neon na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* para diferentes índices de incidência. Fernandópolis-SP, 2013.

Cultivares	Nº de sementes	Porcentagem de recuperação das sementes infectadas											
		Número de sementes inoculadas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
cv. Pérola sementes C1	100	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	200	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	300	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	400	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	500	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	600	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	700	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	800	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	900	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	1000	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
cv. Bolinha “sementes salva”	100	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	200	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	300	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	400	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	500	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	600	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	700	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	800	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	900	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	1000	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
cv. Pérola “sementes salva”	100	0 ^{NS*}	100 ^{NS}										
	200	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	300	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	400	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	500	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	600	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	700	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	800	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	900	1 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	1000	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
cv. Foscarin sementes C1	100	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	200	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	300	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	400	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	500	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	600	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	700	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	800	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	900	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
	1000	0 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}

*NS= Não significativo pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

$$c = \frac{\text{Ln} \frac{0,05}{1 - 0,05}}{\text{Ln} \frac{0,01(1 - 0,005)}{0,005(1 - 0,01)}} = -4,21728$$

$$l_i = -4,21728 + 0,007216n \quad \text{e} \quad l_s = 4,21728 + 0,007216n$$

Logo, se $n = 100$ tem-se $l_i = -3$ e $l_s = 5$ e, neste caso, os valores negativos devem ser considerados não determinados (ND).

Para os quatro lotes estudados foram tomadas amostras em grupos de 100 sementes com subsequente aplicação do teste de detecção pelo meio semi-seletivo NEON e feita a comparação do resultado com os limites de decisão do plano de amostragem sequencial. A tomada de decisão só se inicia a partir de 700 sementes analisadas quanto a presença – ausência do patógeno nos lotes de sementes. Conforme a Tabela 7 e Figura 2, nova amostra deverá ser retirada e reavaliada quando o número de sementes potencialmente infectadas estiver entre os dois limites. Quando estiver abaixo do limite inferior o lote, deverá ser aceito, e se estiver acima o lote deverá ser rejeitado e considerado infectado com *S. sclerotiorum*.

Tabela 7. Valores calculados dos limites de decisão do plano de amostragem sequencial para $p_0=0,01$, $p_1=0,005$ e $\alpha = \beta=5\%$ para grupos de sementes de tamanho $m=100$. Fernandópolis-SP, 2013.

Número de grupos de sementes testadas	Número total de sementes	Limite inferior	Limite superior
1	100	ND*	5
2	200	ND	6
3	300	ND	6
4	400	ND	7
5	500	ND	8
6	600	ND	9
7	700	ND	9
8	800	1	10
9	900	2	11
10	1000	3	12

*= Não determinado.

Outra função importante é a que fornece o tamanho médio esperado de amostra, para a decisão sobre aceitação de H_0 é denotado por $E_p(N)$ e depende de p , através da expressão:

$$E_p(N) = \frac{P(p) \cdot (b - c) + c}{p - \alpha}$$

Graficamente, pode ser representado, conforme a Figura 2.

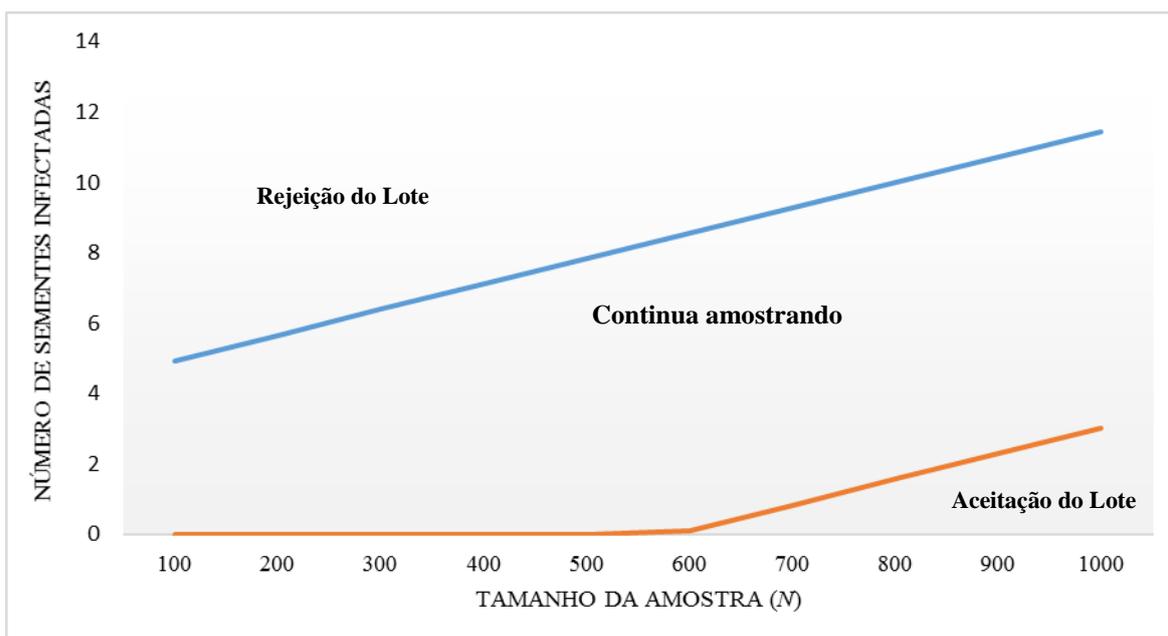


Figura 2. Linhas de decisão do plano de amostragem sequencial com parâmetros $p_0 = 0,005$; $p_1 = 0,01$ e $\alpha = \beta = 0,05$.

Esta função permite expressar o número esperado de amostras como função de p . Por outro lado, se pretendido a fixação do tamanho da amostra, é recomendado o máximo valor esperado para o tamanho médio esperado de amostra, no plano de amostragem correspondente.

O tamanho médio de amostra necessário para se tomar a decisão sobre o lote usando o TSRP é dado pelas fórmulas:

$$P(p) = \frac{\left\{ \frac{(1 - \beta)^w - 1}{\alpha} \right\}}{\left\{ \left(\frac{1 - \beta}{\alpha} \right)^w - \left(\frac{\beta}{1 - \alpha} \right)^w \right\}}$$

Os valores de p e w estão associados pela expressão:

$$p = \frac{1 - \left(\frac{1 - p_1}{1 - p_o}\right)^w}{\left(\frac{p_1}{p_o}\right)^w - \left(\frac{1 - p_1}{1 - p_o}\right)^w}$$

Uma tabela com os valores de $E_p(N)$ pode ser obtida atribuindo-se valores à W no intervalo de -6 à 6. Os valores podem ser vistos na Tabela 8 e o comportamento do tamanho médio de amostra em função de p , a probabilidade de infecção do lote está ilustrado na Figura 3.

Como observado na Figura 3, o número esperado de amostras $E_p(N)$ do teste da razão da verossimilhança, para proporção de sementes infectadas com pelo menos uma com *S. sclerotiorum*, deve ser maior que o tradicional (de 400 sementes), que é considerável aceito, pois é neste intervalo (p de 0,005 e 0,01) em que é encontrada maior dificuldade em classificar os lotes como condenados ou liberados para comercialização com base na proposta de tolerância “zero” conforme Machado (1994) e Menten (1997). Se a infestação corresponder a 1% das sementes, então o tamanho esperado de amostra é de aproximadamente 430 sementes, porém, a tomada de decisão apenas deve se iniciar a partir de 700 sementes analisadas para maior precisão no destino do lote, segundo o plano de amostragem. Para média de infestação 0,005 uma decisão seria tomada após examinada 900 sementes. Desta forma, para lotes de sementes infectados ($p > 0,01$), o tamanho da amostra diminui à medida que este aumenta, em outras palavras, o analista necessitará de menor quantidade de sementes para tomar uma decisão sobre o lote.

O tamanho real da amostra para testes de sanidade, segundo Carvalho et al. (2011), depende da frequência de ocorrência do patógeno nas sementes. Trabalhos que determinem o tamanho real de uma amostragem para detecção de fungos em análises de rotina são raros e, especificamente para *S. sclerotiorum*, inexistentes.

Todos os testes de sanidade de sementes são baseados no teste de germinação quanto a utilização de 400 sementes para avaliar a presença de patógenos infectantes às sementes. Pelos resultados obtidos da amostragem sequencial (Tabela 9), foi possível demonstrar que este número é insuficiente para recuperação de *S. sclerotiorum*; pelo teste Neon foram necessárias 8 tomadas consecutivas de 100 sementes para a tomada de decisão sobre o destino do lote.

Tabela 8. Tamanho médio da amostra (TMA) em função dos valores atribuídos a W no intervalo de -6 a 6. Fernandópolis-SP, 2013.

W	p	$P(p)$	$TMA(p)$
-6	0,0879	0,0000	47,9
-5	0,0750	0,0000	56,3
-4	0,0623	0,0000	67,7
-3	0,0503	0,0001	83,8
-2	0,0393	0,0028	107,3
-1	0,0296	0,0500	142,7
1	0,0148	0,9500	285,4
2	0,0098	0,9972	429,1
3	0,0063	0,9999	670,2
3,5	0,0050	1,0000	848,4
4	0,0039	1,0000	1082,5
5	0,0023	1,0000	1800,4
6	0,0014	1,0000	3069,0

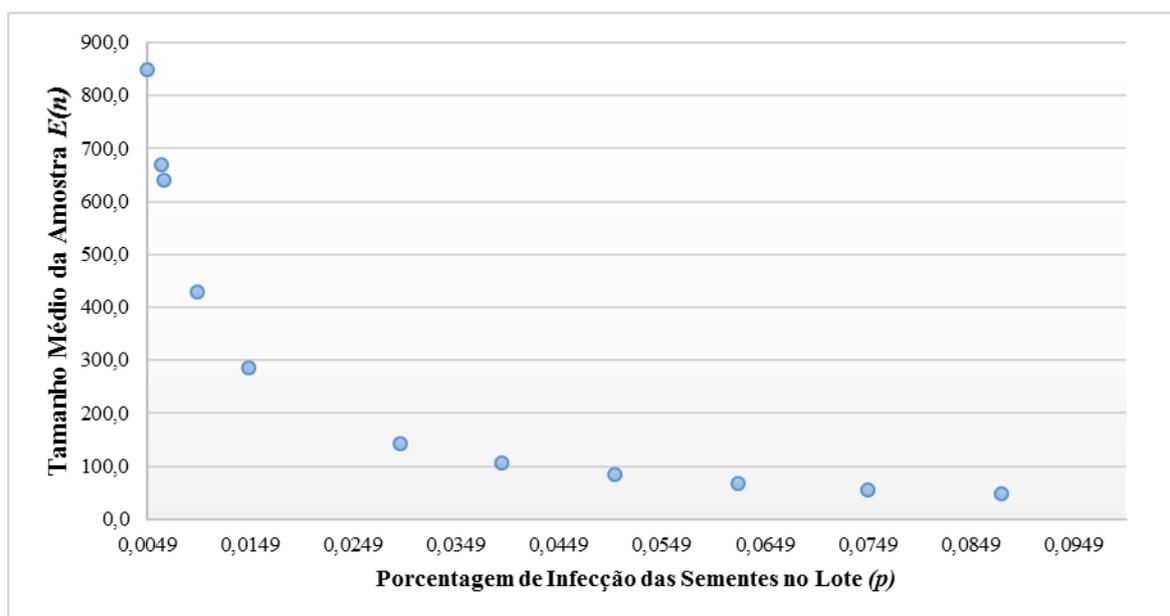


Figura 3. Curva do tamanho médio de amostra do plano de amostragem sequencial para os parâmetros $p_0 = 0,005$; $p_I = 0,01$ e $\alpha = \beta = 5\%$.

Os lotes de sementes aceitos careceram da submissão de 10 grupos de 100 sementes para a decisão de liberá-los a comercialização, sem risco de infecção de novas áreas. Quando inoculados artificialmente, foi verificado que o tamanho da amostra necessária para detecção do patógeno aumenta quando este encontra-se disperso no lote com um maior número da população. Isto é naturalmente lógico, porém se levarmos em consideração que este patógeno é monocíclico, e portanto apresenta baixo índice de infecção e esporulação em relação a outros fungos contaminantes de sementes, é relevante

a comprovação de que este necessita de um número maior de sementes para sua detecção em testes de rotina, e não apenas 400 sementes como padronizado, evitando-se assim resultados falsos negativos.

Em conformidade com Henning et al. (2009), que encontrou apenas oito sementes infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em um lote de 10400 sementes, ou seja, 0,076% de infecção do patógeno, os resultados obtidos para o tamanho da amostra no presente trabalho assinala um mínimo de 1000 sementes, e não mais do que 10000, a serem analisadas quando se deseja encontrar 1 semente infectada no lote.

A curva característica de operação $CCO(p)$ é a representação gráfica da função operatória característica que fornece a probabilidade de tomar uma decisão correta para um determinado nível de infecção, aceitando ou rejeitando o lote de sementes. Segundo Bányai (1978), citado por Santana (1994), é possível verificar através dela a confiabilidade do teste sequencial empregado quando comparado ao atualmente utilizado teste de tamanho fixo ($n = 400$ sementes).

A curva característica de operação está representada na Figura 4. Foi constatado que quando a média é $p \geq 0,01$, ou seja, 1% das sementes infectadas por *S. sclerotiorum*, o teste tem 95% de probabilidade de aceitar H_0 e, portanto, rejeitar o lote; por sua vez, quando a média é de $p=0,005$, ou seja, 0,5% de o fungo estar presente superficialmente no tegumento ou nos tecidos internos da semente, e não ser detectado pelo teste. Quando o teste apresenta $p = 0\%$ de probabilidade de aceitar H_0 , isto é, a probabilidade de aceitação do lote é de 100%.

Cabe lembrar que a amostragem sequencial não objetiva determinar a infecção do lote, mas esclarecer se este encontra-se ou não dentro dos padrões de qualidade instituídos (SANTANA,1994). Deste modo, se na prática pretender-se fixar o tamanho da amostra, é recomendado a utilização de seu máximo valor para o tamanho médio esperado da amostra, a fim de se obter uma decisão confiável sobre a presença-ausência do agente patogênico e garantir a qualidade sanitária dos lotes para o produtor e consumidor.

A determinação do tamanho médio da amostra é o primeiro passo na busca por adequação dos métodos de detecção, visando sua eficiência para tomada de decisão sobre o destino de lotes, assegurando a qualidade sanitária ao produtor e consumidor de sementes, além de restringir a disseminação do patógeno para áreas isentas e diminuir o potencial de inóculo onde a doença já ocorre.

Tabela 9. Número de sementes necessário no plano de amostragem sequencial para a decisão de aceitar ou rejeitar o lote, em função da presença de *Sclerotinia sclerotiorum* nas sementes de feijão e soja. Fernandópolis, 2013.

Lotes		Total de sementes testadas	Total de sementes com <i>S. sclerotiorum</i>	Resultado
Naturalmente Infectadas	cv.Pérola sementes C1	1000	0	Aceito
	cv. Bolinha “sementes salva”	1000	0	Aceito
	cv.Pérola “sementes salva”	800	1	Rejeitado
	cv. Foscarin sementes C1	1000	0	Aceito
Artificialmente Infectadas	1:100	100	1	
	1:200	200	1	
	1:300	200	1	
	1:400	300	1	
	1:500	300	1	
	1:600	500	1	
	1:700	700	1	
	1:800	800	1	
	1:900	900	1	
	1:1000	1000	1	

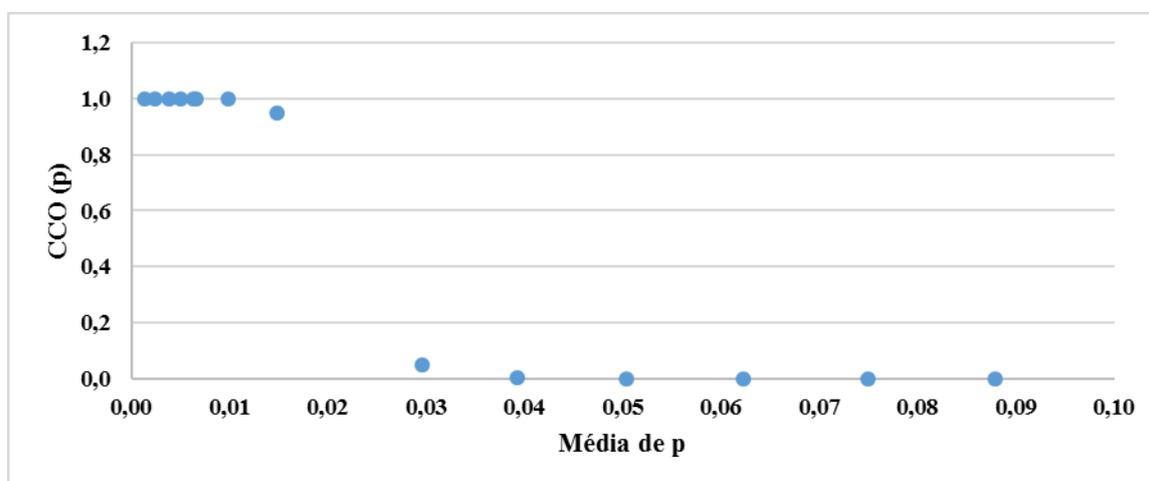


Figura 4. Curva característica de operação CCO(p) do teste de verossimilhança para população total de *Sclerotinia sclerotiorum*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevação da incidência do mofo-branco nas áreas de cultivo de soja e de feijão no Brasil é atribuída, principalmente, à utilização de sementes contaminadas por escleródios do patógeno causador aderidos ou misturados a elas, produzidas sem os devidos controles de qualidade sanitária, ou de “sementes salvas” e “piratas”.

Diante deste cenário, a necessidade de estudos sobre *S. sclerotiorum* em soja e em feijão, de maneira mais integrada e em maior profundidade, tornou-se uma prioridade dos atuais programas de apoio públicos e privados envolvidos em pesquisa e produção de sementes das referidas espécies. O projeto de pesquisa, como foi a proposta desta tese, teve como objetivo avaliar um plano de amostragem sequencial de sementes de soja e de feijão na detecção de *S. sclerotiorum* e verificar a sensibilidade de testes padronizados na recuperação do patógeno.

Por se tratar de um patógeno categorizado no Brasil como uma praga não quarentenária (PNRQ), a diagnose de *S. sclerotiorum* em associação com sementes requer métodos rápidos, eficazes e precisos para que sejam adotados nos programas de certificação do país. Os estudos desenvolvidos revelaram que este fungo pode ser recuperado através dos métodos Neon-S e Rolo de Papel, sendo estes sensíveis na detecção da forma micelial do mesmo. Porém, a quantidade de sementes utilizada nos

testes de sanidade preconizada pelo MAPA, em número de 400, foi baseada naquela empregada para realização do teste de germinação e pode não corresponder à mínima necessária para determinar a real infecção de um lote por *S. sclerotiorum* na forma miceliogênica. Neste trabalho, os resultados observados demonstraram que para detecção de níveis micelianos até 0,01% deste patógeno pelos métodos Neon e Rolo de Papel são necessárias, no mínimo, 800 sementes de soja ou de feijão, e para níveis de 0,005% de infecção devem ser submetidas aos testes 1000 sementes, no mínimo. A utilização destas quantidades de sementes para este tipo de diagnose busca contribuir a um mais efetivo controle de qualidade de sementes de soja e de feijão quanto ao referido agente causal.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho foi concluído que:

- 1.O plano de amostragem sequencial de sementes de soja e de feijão para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* na forma micelial foi eficiente, desde que 800 e 1.000 sementes sejam avaliadas, considerando incidências de 0,01 e 0,005%, respectivamente;
- 2.Os métodos Neon e Rolo de Papel foram sensíveis na detecção micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e de feijão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego-California: Elsevier Academic Press 5th Edition, 2005. v.1, p.546-552.

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

ANDRADE, D.F; OGLIARI, P.J. **Estatística para as Ciências Agrárias e Biológicas (com noções de experimentação)**. Editora da UFSC, 2007. p.432.

ANSELME, C.; CHAMPION, R. Bean anthracnose – *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum Lindemuthianum*. In: **ISTA Handbook in seed health testing**. Zeurich: Internacional Seed Testing Association (ISTA), 1981-1982.

BALARDIN, R. S.; MENEGHETTI, R. C.; DALLAGNOL, L. J. Soja - Doenças fúngicas, da haste e foliares. **Plantio Direto**, Passo Fundo - RS, v. 35, p. 31-36, 2005.

BANZATTO, D. A., KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. Ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247p.

BÁNYAI, J.; BARABÁS, J. **HANDBOOK ON STATISTICS IN SEED TESTING**. **Association International of Seed Testing**, 2002. p.84. Disponível em <<http://www.world-seed-project.org/upload/prj/product/stahandbk2002.pdf>> Acesso: 17nov. 2013.

BARBOSA, J.C. A amostragem seqüencial, In: FERNANDES, O.A.; CORREIA, A.C.B.; de BORTOLI, S.A. (ed.), **Manejo integrado de pragas e nematóides**. Jaboticabal: FUNEP,1992. p. 205-211.

BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período 2001-2008. **Bioscience Journal**. v. 28, n.1, p.77-86.2012.

BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; BRACCINI, M. DO C. L.; SCAPIM, C. A.; MOTTA, I. DE SÁ. Germinação e sanidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) colhidas em diferentes épocas. **Acta Scientiarum**, v.22, n. 4, p. 1017-1022, 2000.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais. Epidemiologia e controle econômico**. São Paulo, Ceres, 1996. 289p.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda, 2005. v.2, p.376-399.

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

BOTELHO, L. da S. **Deteção, Transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

BOLAND, G. J. White mold. In: **Compendium of Bean Diseases**, 2nd Edition. APS Press, MN., 2005.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Numbers and distribution of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to white mold of white bean (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Botany**, v.66, p. 247-252, 1988a.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Relationships between the spatial distribution and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to sclerotinia stem rot of soybean. **Plant Pathology**, v. 37, p. 329-336, 1988b.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.9, p. 218-224, 1987.

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

_____. Lei de proteção de cultivares. Lei n.º 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de abril de 1997.

BRUSTOLIN, R.; PEDRON, L.; DE ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; ALFF, R. Sementes de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum*: fonte de inóculo e transmissão. **Tropical Plant Pathology**, n. 38, p. 41, 2012.

CALAÇA, H.; KREYCI P. **Situação atual e perspectivas do uso de produtos químicos no manejo do “mofo branco”**. In: Encontro Internacional de Mofo Branco. Ponta Grossa –Paraná. 16-19 julho de 2012. CD-ROM.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 1990.

CARDOSO, J.E. Mofo branco. In: Sartorato, A.; Rava, C.A. (Eds.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília. EMBRAPA-SPI. 1994. p.111-122.

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

CARVALHO, M.L.M.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; MUNIZ, J.A. **Manual do amostrador de sementes**. Associação Brasileira de Tecnologia de Semente, Comitê de Vigor de Sementes. Lavras-MG, 2011. 143p.

CARREGAL, L.H.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. **Saiba mais sobre Mofo Branco**. 2005. Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?ID=2065>> Acesso em: 5 ago.2013.

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

CRATO, F. F. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente**. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2013.83p.

COCKERELL, V.; ROBERTS, A. Results of seed health proficiency teste round 08-SH H.vul., Detection of *Ustilago nuda* on *Hordeum vulgare*. ISTA - **News Bulletin**, n. 143, Switzerland, october 2011. p. 38-43.

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

CONAB. Companhia Nacional de Safra Brasileira –. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**, Brasília: Conab, 2011. 40 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11\[1\].pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11[1].pdf)> Acesso em: 12 out. 2013.

Couper, G. 2001. **The biology, epidemiology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* on carrots in North East Scotland**. Ph.D. thesis, Department of Plant and Soil Science, University of Aberdeen. Aberdeen, Scotland, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

DILLARD, H. R., LUDWIG, J. W., AND HUNTER, J. E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. **Plant Disease**, v. 79, p.411-415. 1995.

ELLIS, R.H.; WHITEHEAD, J. Open, truncated and triangular sequential seed testing procedures. **Seed Science and Technology**, n. 15, p. 1-17. 1987.

EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO. **Sistemas de Produção do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais**. Pedro Marques da Silveira
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/irrigacao.htm>, Nº.5. ISSN 1679-8869. Versão eletrônica Dezembro/2005.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2011**. - Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. 255p.

FAIAD, M.G.R.; RAMOS, V.R.; WETZEL, M.M.V. Patologia de espécies florestais do cerrado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos**: João Pessoa, 2004. p. 36-42.

FERNANDES, M.G. **Distribuição espacial e amostragem seqüencial dos principais noctuídeos do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Jaboticabal, 2002. 140p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2002.

FERRAZ, C.L.L.; CAFÉ FILHO, A.C. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.364-369, 1998.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P. de. Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade – Serie sementes. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2007. 12 p. (EMBRAPA- CNPSO. **Circular técnica**, 40)

FREITAS, R.A. Patologia de semente de feijão. 2005. Disponível em: <<http://orbita.starmedia.com/~fitopatologia/patofeijao.htm>>. Acesso: 03 de julho 2013.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção e importância**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. 58p.

GOULART, A.C.P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1467- 1473, 2001.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: EMBRAPA AGROPECUARIA OESTE, 2005.

GÖRGEN, C.A.; CIVARDI, E. A.; RAGAGNIN, V. A.; SILVEIRA NETO, A. N. da; CARNEIRO, L. C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.10, p. 1102-1108, 2010.

GÖRGEN, C.A. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.10, p.1102-1108, 2009.

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

HENNEBERG, L. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.763-768,2012.

HENNEBERG, L. **Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de soja**. Tese (Doutorado - Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná-Curitiba, 2011. 76p.

HENNEBERG, L.; JACCOUD FILHO, D. S.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; PANOBIANCO, M. Importância da detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. **Informativo ABRATES**. v. 21, n. 3, p. 41-45, 2011.

HENNING, A. A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2005. 52 p. (EMBRAPA-CNPSO – Documentos, 264).

HENNING, A. A. Manejo de doenças da cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo ABRATES**, v.19, n.1, p.09- 12, 2009.

HENNING, A.A.; BERGONSI, J.S. Comparação dos métodos de papel de filtro e meio de neon na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em sementes de soja. **Resumos da XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - São Pedro, SP**, 2011. p. 226-227.

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

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

HUANG, H.C.; HOES, J.A. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia sclerotiorum* wilt of sunflower. **Plant Disease**, v. 64, p.81–84, 1980.

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Pod rot of dry peas due to infection by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**.v. 76, p. 597–600, 1992.

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; HUANG, J.W. Epidemiological significance of pollen in fungal diseases. Recent Res. Dev. **Plant Pathology**, v.2, p. 91–109, 1998.

INDEX FUNGORUM. *Sclerotinia sclerotiorum*. Switzerland, 2013. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>> Acesso: 16 junho de 2013.

INGLIS, G.D.; BOLAND, G.J. The micro-flora of bean and rapeseed petals and the influence of the microflora of bean petals on white mold. **Can. J. Plant Pathol.** v.12, p. 129–134, 1990.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA Method Validation for seed testing**. –Switzerland, 2007. 70p. Disponível em: <<http://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTAMethodValidationforSeedTesting-V1.01.pdf> > Acesso: 30 maio 2013.

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. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília.
Resumos: Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010, p. 226-228.

JOHNSON, N.L.; KOTZ, S. A new family of probability distributions with applications to Monte Carlo studies. **J. Amer. Statist. Ass.**, v.75, p. 276-279,1969.

JULIATTI, F. C. ; CAIRES, A. M.; JULLIATTI, B. C. M.; BORIN, M. R.; Filho, D. J. S. Reação de genótipos de soja transgênicos e convencionais à podridão branca da haste. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 4, 2013. p. 921-931.

KIMATI, H. Doenças de feijoeiro – *Phaseolus vulgaris* L. In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 297-318.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternative para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2. p.276-279, 2000.

KOGAN, M.; HERZOG, D.C. Sequential sampling. In: KOGAN, M.; HERZOG, D.C. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, 1980, p.65-97.

LAEMMLEN, F. *Sclerotinia Diseases*. UNIVERSITY OF CALIFORNIA Agriculture and Natural Resources P U B L I C A T I O N. 2001.5p.

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

LIMA JUNIOR, M. J.V. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. UFAM - Manaus-Amazonas, Brasil. 2010, 146p.

LIMA, B.; REY, M. S.; FARIAS, C. R. J. de.; BRANCÃO, M. F.; PIEROBOM, C. R. Qualidade sanitária de sementes de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 182, 2004.

LIMA, E.F.; CARVALHO, J.M.F.C.; CARVALHO, L.P.; COSTA, J.N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 10, p.105-115, 1985.

LOBO JÚNIOR, M.; COBUCCI, T. Efeito da qualidade e do tratamento de sementes no controle de podridões radiculares e podridão do feijoeiro comum cv. Pérola. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos...** João Pessoa, 2004. p. 183.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC, 1988.

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N.M. E NAKAGAWA, J. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 522-588.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.229-263, 1994.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA). 2002.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C; ALVES, M.C. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso de restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 77-81, 2003.

MACHADO, J.C.; POZZA, E.A. Razão e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005.p.375-399.p

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176–177, 1962.

MANOSSO NETO, M.O.; JACCOUD-FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Efeito de diferentes épocas de semeadura da cultura da soja e sua relação com a incidência do Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY, 23, 2010, Cuiaba. **Resumo**. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, 2010. v. 35, supl., p. 28.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade de sementes**, Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. Basserdorf: International Seed Testing Association; 2003.

MENEZES, J.R. Controle integrado de doenças em culturas irrigadas por pivô central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 270-71, 1995.

MENEZES, J.R. Testes de sanidade de sementes de feijão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 395-405.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos às sementes. In: **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: FEALQ. p. 115–136. 1991.

MENTEN, J. O. M. **Prejuízo causado por patógenos associados às sementes in Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p. 115-136.

MENTEN, J.O.M. Situação dos padrões de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.86-89, 1997.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to Statistical Process Control**, John Wiley & Sons, New York, 1985.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of Sclerotia and Apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from Infected Soybean Seed and Its Control by Fungicide Seed Treatmet. **Plant Disease**, Illinois, v. 83, p. 1113-1115, 1999.

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; CAF, FILHO, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 180-182, 2006.

REIS, E. M.; CASA, R.T.; GAVA, F. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.10, n.2, p.145-150, 2011

REIS, A.; COSTA, H.; LOPES, C. A. Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças - **Comunicado Técnico**, n. 45, 5 p. 2007.

REIS, A.; NASCIMENTO, WM. New apiaceous hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* in the Cerrado region of Brazil. **Hortic. Bras.**, Mar 2011, vol.29, no.1, p.122-124.

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

ROHATGI, V. K. **An Introduction to Probability Theory and Mathematical Statistics**. New York: Wiley, 1976. 684p.

SANTANA, D. G. **Adaptação do teste do pH do exsudato e viabilidade do uso da amostragem sequencial na rápida definição sobre o destino de lotes de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Lavras: UFLA. 1996. 79p.

SINCLAIR, J.B. Soybean seed pathology. In: YORINORI, J.T.; SINCLAIR, K.B.; MEHTA, Y.R.; MOHAN, S.K. **Seed pathology, problems and progress**. Londrina: IAPAR, 1979. p. 274.

SILVA, F. P. M. da; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; GARCEZ, F. R. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa phytopathol**, v. 37, n. 32011, 2011.

SILVA, G. C.; GOMES, D. P.; KRONKA, A. Z.; MORAES, M. H. Qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 2008.

SILVA, M. A. D.; SILVA, W. R. Comportamento de fungos e de sementes de feijoeiro durante o teste de envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.3, p. 599-608, 2000.

SILVEIRA, P.M.; STONE, L.F. **Cultivo de feijão irrigado na região nordeste de Minas Gerais**. Disponível em: <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrigadoNoroesteMG/irrigacao.htm>>, Acesso em: 10 mar.2005.

SILVEIRA, P.M., **Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrigadoNoroesteMG/irrigacao.htm>>. Sistemas de Produção, n.5. ISSN 1679-8869. Versão eletrônica. Dezembro/2005.

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

- SOMDA, I.; SANOU, J.; SANON, P. Seed-Borne Infectin of Farmer-Saved Maize Seeds by Pathogenic Fungi and Therir Transmission to Seedlings. **Plant Pathology Journal**. v. 7, n. 1, p. 98-103, 2008.
- SOUSA, T. P.; NASCIMENTO, I. O.; MAIA. C. B.; MORAIS, J.; BEZERRA, G. A.; BEZERRA, J. W. T. Incidência de fungos associados a sementes de soja transgênica variedade Brs Valiosa rr. **Agroecossistemas**, v. 3, n. 1, p. 52-56, 2011.
- SCHWARTZ, H. F.; J. R. STEADMAN. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v.68, p.383-388, 1978.
- SPIEGEL, M.R. Teoria elementar da amostragem. In: SPIEGEL, M.R. **ESTATÍSTICA**. Rio de Janeiro, Editora: McGraw-Hill do Brasil, 1970. p.233-256.
- STEADMAN, J.R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, p. 346-350, 1983.
- STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.68-70, 1994.
- SUTTON, D. C.; DEVERALL, B. J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v.32, n. 3, p. 251-261, 1983.
- TELES, H. de F. **Qualidade de sementes de soja e incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary em função do beneficiamento e armazenamento**. 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- TOLEDO-SOUZA, E.D. de; SILVEIRA, P.M. da; LOBO JUNIOR, M.; CAFÉ FILHO, A.C. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.971-978, 2008.
- TU, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.
- Tu, J. C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**. v.73, p. 281-285, 1989.
- TURKINGTON, T.K.; MORRALL, R.A.A. Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: the influence of inoculum variation over the flowering period and canopy density. **Phytopathology**, v.83, p. 682–689, 1993.
- VECHIATO, M. H.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y.; CHIBA, S. Efeito do tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com fungicidas no controle de *Macrophomina*

phaseolina e na emergência de plântulas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 83–88, 2000.

VENETTE, J. Sclerotinia spore formation, transport and infection. In: **Proceedings of the Sclerotinia Workshop**. 21 January 1998. Fargo, North Dakota, USA, 1998.

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

VIEIRA, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PERES, A.P.; MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.770-773, 2001.

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

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

YORINORI, J.T. Doenças da soja no Brasil. In: MIYSAKA, S.; MEDINA, J.C. eds. **A soja no Brasil Central**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1982. p.301-350.

YORINORI, J. J.; FEKSA, H. Importância da Podridão da soja (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: Reunião de Pesquisa da Soja Região Central do Brasil, 2001, Londrina-. **Resumo**. Londrina:EMBRAPA-SOJA, 2001. p. 119. (documento 157)

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

WALD, A. **Sequential Analysis**. New York : John Wiley and Sons, 1947. 212p.

WALD, A.; WOLFOWITZ, J. Optimum Character of the Sequential Probability Ratio Test. **The Annals of Mathematical Statistics**. v.19, n. 3, p. 293-446, 1948.

WORKNEH, F.; YANG, X.B. Prevalence of sclerotinia stem rot of soybeans in the north-central Unites States in relation to tillage, climate, and latitudinal positions. **Phytopathology**. v. 90, p.1375-1382, 2000.