

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE *Paspalum guenoarum* ARECH. ECÓTIPO “AZULÃO”: CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E CONTROLE

BRUNO FROSI GASPARETTO
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Março, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Frosi Gasparetto, Bruno
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE
Paspalum guenoarum ARECH. ECÓTIPO "AZULÃO":
CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E CONTROLE / Bruno
Frosi Gasparetto. -- 2017.
66 f.

Orientador: Carolina Bremm.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Forrageira nativa. 2. Fungicidas. 3. Sanidade.
4. Germinação. 5. Vigor. I. Bremm, Carolina, orient.
II. Título.

BRUNO ERCSI GASPARETTO
Engenheiro Agrônomo

DISSERTAÇÃO


Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de


MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 29.03.2017
Pela Banca Examinadora


Homologado em: 19.05.2017
Por

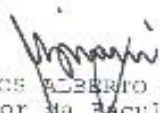

CAROLINA BREMM
PPG Zootecnia/UFERS
Orientadora


PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
PPG Fitotecnia/UFERS


RAFAEL GOMES DIONELLO
PPG Fitotecnia/UFERS


CARLOS ROBERTO DA SILVA PEDROSO
PPG Zootecnia/UFERS


CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

*A todos aqueles que me ajudaram a alcançar este objetivo, **AGRADEÇO.***

*Ao meu pai,
João Carlos Gasparetto*

*Ao meu irmão,
Lauro Frosi Gasparetto*

*À minha namorada,
Elisa Helena Lorencet*

*Pelo incentivo e encorajamento infinitos, **OFEREÇO.***

*À minha mãe,
Aneli Frosi Gasparetto (in memorian)*

*Por abrir mão de seus sonhos para a realização dos meus, **DEDICO.***

AGRADECIMENTOS

Deus, pelo conforto espiritual e por estar sempre do meu lado em todos os momentos.

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Lúcia Brandão Franke e Profa. Dra. Carolina Bremm pela confiança, paciência, orientação e oportunidades concedidas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA), pela oportunidade para a realização do Mestrado.

Ao Agrônoma - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, pela cooperação, apoio financeiro e condições excelentes oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valmir Duarte por apoiar a realização deste estudo.

À Dra. Camila Cristina Lage de Andrade pelo empenho, orientação, disponibilidade e simpatia.

Ao Dr. Rodrigo Lopes pelas contribuições científicas, conhecimento compartilhado e amizade.

Ao Prof. Dr. José Antônio Martinelli pelas relevantes informações técnicas, colaboração e amizade.

À Profa. Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros pelo incentivo, contribuição pessoal e acadêmica.

Aos colegas pesquisadores do DPFA e todos os amigos de Porto Alegre, pela amizade e bom convívio ao longo destes anos de mestrado.

À minha família, pelo estímulo constante, encorajamento e grandes exemplos.

Ao Sr. Antônio David Farina Filho e família, pelo investimento, generosidade e amizade.

À Fapergs pelo apoio científico e concessão da bolsa de pesquisa.

FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE *Paspalum guenoarum* ARECH. ECÓTIPO “AZULÃO”: CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E CONTROLE¹

Autor: Bruno Frosi Gasparetto
Orientadora: Carolina Bremm

RESUMO – O objetivo deste estudo foi determinar as espécies de fungos fitopatogênicos presentes em sementes de *P. guenoarum* Arech. ecótipo “Azulão”, bem como, verificar a sensibilidade *in vitro* dos fungos isolados a diferentes fungicidas e avaliar a eficiência do tratamento químico no controle de fungos e no desempenho fisiológico das sementes. Cinco lotes de sementes (2011, 2012, 2013, 2014 e 2015), obtidos de área experimental na EEA/UFRGS, foram analisados quanto à qualidade física e fisiológica através dos testes de umidade, pureza, germinação e vigor (PCG, IVG e TZ). Para a avaliação da qualidade sanitária fez-se o isolamento dos fungos fitopatogênicos associados às sementes pelo método de “blotter test”. A patogenicidade dos fungos encontrados foi avaliada por inoculação de plântulas, através de suspensões de conídios. Os fungos fitopatogênicos foram caracterizados através de análise morfológica e molecular. Para a caracterização molecular utilizou-se o espaçador interno de transcrição de rDNA [*primers* ITS1 / ITS4] e o gene RNA polimerase II (RPB2) [*primers* 5f2 / 7cr]. Por meio de ensaios de fungitoxicidade *in vitro*, estudou-se a sensibilidade dos isolados fúngicos detectados nas sementes, testando-se quatro fungicidas (Carboxina + Tiram, Cabendazim + Tiram, Metalaxil-M + Fludioxonil e Tiofanato-metílico) e cinco concentrações (1; 2,5; 5; 10 e 30 ppm), determinando-se a DL₅₀. Os fungicidas mais eficientes foram avaliados no tratamento das sementes, somente no lote 2015. Os lotes 2014 e 2015 apresentaram maior porcentagem de germinação e vigor. As espécies de fungos fitopatogênicos mais frequentes nos lotes de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” são *Bipolaris micropus*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium incarnatum* e *Phoma herbarum*. Em condições *in vitro*, o fungicida Carboxina + Tiram inibe com alta eficácia (DL₅₀ < 1 ppm) o crescimento micelial dos fungos *F. incarnatum*, *C. geniculata* e *B. micropus*, ao passo que Metalaxil + Fludioxonil inibe com alta eficácia os fungos *P. herbarum*, *C. geniculata* e *B. micropus*. O tratamento químico com os fungicidas Carboxina + Tiram, Metalaxil-M + Fludioxonil e a combinação de ambos os produtos nas sementes de *P. guenoarum* é eficiente no controle de *B. micropus*, *C. geniculata*, *F. incarnatum* e *P. herbarum* e promove melhor desempenho fisiológico.

Palavras-chave: forrageira nativa, fungicidas, sanidade, vigor

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66 p.) Março, 2017.

***Paspalum guenoarum* ARECH. ECOTYPE "AZULÃO" SEED-BORNE FUNGI: CHARACTERIZATION, PATHOGENICITY AND CONTROL¹**

Author: Bruno Frosi Gasparetto

Advisor: Carolina Bremm

ABSTRACT - This study was aimed to determine the phytopathogenic fungi species present in *P. guenoarum* Arech seeds. "Azulão" ecotype, as well as to verify the *in vitro* sensitivity of the isolated fungi to different fungicides and to evaluate the efficiency of the chemical treatment in the control of fungi and the physiological performance of the seeds. Five seed lots (2011, 2012, 2013, 2014 and 2015), obtained from the experimental area of the EEA / UFRGS, were analyzed for physical and physiological quality by means of moisture, purity, germination and vigor tests (PCG, IVG and TZ). For the evaluation of the sanitary quality, the phytopathogenic fungi associated to the seeds were isolated by the blotter test method. The pathogenicity of the fungi found was evaluated by inoculation of seedlings by conidial suspensions. Phytopathogenic fungi were characterized by morphological and molecular analysis. The internal transcription spacer of rDNA [primers ITS1 / ITS4] and RNA polymerase II (RPB2) [primers 5f2 / 7cr] was used for the molecular characterization. The sensitivity of the fungal isolates detected in the seeds was evaluated using four fungicides (Carboxin + Thiram, Cabendazim + Thiram, Metalaxyl-M + Fludioxonil and Thiophanate-methyl) and five concentrations (1; 2,5; 5; 10 and 30 ppm), the LD₅₀ being determined. The most efficient fungicides were evaluated in the treatment of seeds only in lot 2015. The lots 2014 and 2015 presented a higher percentage of germination and vigor. The species of phytopathogenic fungi most frequent in seed lots of *P. guenoarum* ecotype "Azulão" are *Bipolaris micropus*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium incarnatum* and *Phoma herbarum*. *In vitro* conditions, the fungicide Carboxin + Thiram inhibits the mycelial growth of the fungi *F. incarnatum*, *C. geniculata* and *B. micropus* with high efficacy (LD₅₀ < 1 ppm), whereas Metalaxyl + Fludioxonil inhibits with high efficacy the fungi *P. herbarum*, *C. geniculata* and *B. micropus*. The chemical treatment with the fungicides Carboxin + Thiram, Metalaxyl-M + Fludioxonil and the combination of both products in the seeds of *P. guenoarum* is efficient in the control of *B. micropus*, *C. geniculata*, *F. incarnatum* and *P. herbarum* and promotes better physiological performance.

keywords: native forage, fungicides, sanity, vigor

¹Master of Science dissertation in Forrage Science – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66 p.) March, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.	<i>Paspalum guenoarum</i> Arech. ecótipo “Azulão”.....	15
2.2.	Importância da qualidade fitossanitária das sementes.....	16
2.3.	Técnicas de determinação de fungos em sementes.....	18
2.4.	Fungos fitopatogênicos em sementes forrageiras.....	20
2.5.	Tratamento químico de sementes.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1.	Identificação dos lotes de sementes.....	24
3.2.	Avaliação da qualidade física e fisiológica dos lotes.....	25
3.2.1.	Pureza.....	25
3.2.2.	Grau de umidade.....	25
3.2.3.	Teste de germinação.....	25
3.2.4.	Primeira contagem de germinação.....	25
3.2.5.	Índice de velocidade de germinação.....	26
3.2.6.	Teste de tetrazólio.....	26
3.2.7.	Delineamento experimental e análise estatística.....	26
3.3.	Isolamento e caracterização de fungos fitopatogênicos associados às sementes.....	26
3.3.1.	Obtenção dos isolados.....	26
3.3.1.1.	Delineamento experimental.....	28
3.3.2.	Teste de patogenicidade.....	28
3.3.3.	Caracterização molecular dos isolados.....	29
3.3.4.	Caracterização morfológica dos isolados.....	29
3.4.	Controle químico de fungos associados às sementes.....	30
3.4.1.	Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	30
3.4.2.1.	Delineamento experimental e análise estatística.....	31
3.4.2.	Tratamento de sementes com fungicidas.....	32
3.4.2.1.	Teste de sanidade.....	32
3.4.2.2.	Teste de germinação.....	32
3.4.2.3.	Delineamento experimental e análise estatística.....	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1.	Avaliação da qualidade física e fisiológica dos lotes.....	34
4.2.	Isolamento e caracterização de fungos fitopatogênicos associados às sementes.....	36
4.2.1.	Obtenção dos isolados.....	36
4.2.2.	Teste de patogenicidade.....	38
4.2.3.	Caracterização molecular dos isolados.....	39
4.2.4.	Caracterização morfológica dos isolados.....	39
4.3.	Controle químico de fungos associados às sementes.....	41
4.3.1.	Fungitoxicidade <i>in vitro</i>	41
4.3.2.	Tratamento de sementes com fungicidas.....	49
5.	CONCLUSÕES.....	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Descrição dos fungicidas utilizados no controle de fungos fitopatogênicos associados às sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”	30
TABELA 2.	Fungicidas utilizados no tratamento das sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”	32
TABELA 3.	Grau de umidade (U), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes dormentes (SD), sementes mortas (SM), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) de sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”, em função do ano de colheita.....	34
TABELA 4.	Coeficientes de correlação simples entre o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) de sementes de <i>P. guenoarum</i> ecótipo “Azulão”, em função do tempo de armazenamento dos lotes de sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”	36
TABELA 5.	Incidência (%) de fungos em cinco lotes de sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”, avaliada através do método do papel de filtro modificado.....	37
TABELA 6.	Patogenicidade de isolados fúngicos associados às sementes, 15 dias após a inoculação em plântulas de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão”	38
TABELA 7.	Resumo da análise de variância para crescimento micelial (mm) <i>in vitro</i> de fungos fitopatogênicos associados às sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão” em função da concentração (ppm) de quatro fungicidas comerciais.....	41
TABELA 8.	Crescimento micelial (mm) <i>in vitro</i> de fungos fitopatogênicos associados às sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão” em função da concentração (ppm) de quatro fungicidas comerciais.....	43
TABELA 9.	Incidência (%) de fungos fitopatogênicos em sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão” tratadas com fungicidas, avaliada pelo método de plaqueamento em meio BDA.....	49

TABELA 10. Germinação (G), plântulas anormais (PA), sementes mortas (SM), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Paspalum guenoarum</i> ecótipo “Azulão” submetidas a tratamento com fungicidas, sob condições de laboratório.....	50
--	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Temperatura média mensal (TM), precipitação mensal (PM) e normais (TN, PN) na Estação Experimental Agronômica da UFRGA, Eldorado do Su/RS. A) Lote 2011; B) Lote 2012; C) Lote 2013; D) Lote 2014; E) Lote 2015; F) Umidade relativa do ar no período de pós-antese até a colheita das sementes..... 24
- FIGURA 2. Avaliação dos fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, por meio do “Blotter test” com congelamento. A- Distribuição das sementes no substrato papel de filtro; B- Incubação em câmara de crescimento; C- Crescimento micelial observado nas sementes..... 27
- FIGURA 3. Teste de patogenicidade de fungos em plântulas de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”. A- Obtenção de plântulas em caixas tipo *gerbox*; B- Transferência para bandejas acondicionadas em casa de vegetação; C- Aplicação de suspensões de conídios..... 28
- FIGURA 4. Crescimento micelial de fungos obtidos em sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, em meio BDA. A- *Bipolaris micropus*; B- *Fusarium incarnatum*; C- *Curvularia geniculata*; D- *Phoma herbarum*..... 40
- FIGURA 5. Características morfológicas de fungos detectados em sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”. A- Conídios de *Bipolaris micropus*; B- Monofiálide e macroconídio de *Fusarium incarnatum*; C- Conídios de *Curvularia geniculata*; D- Conídios de *Phoma herbarum*; E- Picnídio de *Phoma herbarum*..... 40
- FIGURA 6. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium incarnatum*, em função de diferentes fungicidas..... 44
- FIGURA 7. Crescimento micelial de *Fusarium incarnatum* em meio BDA contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D)..... 45
- FIGURA 8. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Phoma herbarum*, em função de diferentes fungicidas..... 45
- FIGURA 9. Crescimento micelial de *Phoma herbarum* em meio BDA

- contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D)..... 46
- FIGURA 10. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Curvularia geniculata*, em função de diferentes fungicidas..... 46
- FIGURA 11. Crescimento micelial de *Curvularia geniculata* em meio BDA contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D)..... 47
- FIGURA 12. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Bipolaris micropus*, em função de diferentes fungicidas..... 48
- FIGURA 13. Crescimento micelial de *Bipolaris micropus* em meio BDA contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D)..... 48
- FIGURA 14. Resultados do teste de germinação com sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, 21 dias após o início do teste. A- Plântulas saudáveis e vigorosas obtidas após o tratamento das sementes com fungicidas. B e C- Plântulas anormais e sementes mortas, infectadas ou muito deterioradas pela ação de fungos fitopatogênicos..... 51

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é uma das atividades primárias de maior importância econômica para a região sul do Brasil. No Rio Grande do Sul, a produção animal com base em pastagens naturais representa uma importante opção de uso sustentável do Bioma Pampa (Nabinger et al., 2009). Neste contexto, várias espécies se destacam pelo bom valor forrageiro, dentre elas, *Paspalum guenoarum* Arech. ecótipo “Azulão”.

Devido as suas características agronômicas, produtividade e composição química, o ecótipo “Azulão” tem sido utilizado em programas de seleção e melhoramento genético, desenvolvidos no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DPFA/UFRGS), com vistas à seleção de recombinantes desejáveis (Pereira et al., 2011; Pereira et al., 2015). Em complemento, a linha de pesquisa em Ecologia, Produção e Tecnologia de Sementes Forrageiras direciona seus estudos para práticas que melhorem a produção e a qualidade das sementes utilizadas nesses programas.

A semente é utilizada como forma de propagação do potencial genético de *P. guenoarum*. Neste sentido, entre os vários atributos envolvidos no controle de qualidade de sementes selecionadas, destaca-se a condição fitossanitária e fisiológica das mesmas, que por sua vez, exerce influência sobre a germinação, desenvolvimento de plântulas, longevidade e produtividade das espécies forrageiras (Fernandes et al., 2005; Vechiato & Aparecido, 2008).

Em laboratório, o teste de germinação é um importante parâmetro de avaliação da qualidade fisiológica das sementes (Brasil, 2009). No entanto, em avaliações realizadas durante testes de germinação de lotes de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, tem-se observado alta incidência de fungos, podridão de sementes e morte de plântulas 3 a 4 dias após a germinação, o que pode ser um indicativo da presença de fungos fitopatogênicos nas sementes. Dentre os sintomas causados por esses organismos, destaca-se lesões foliares em plantas adultas. Durante visitas ao campo de produção de sementes, há indicativos de que fungos fitopatogênicos estejam interferindo no potencial genético das mesmas.

Dentre os agentes patogênicos, os fungos são os mais ativos, e englobam o maior número de espécies associadas às sementes (Brasil, 2009). Em gramíneas forrageiras, fungos fitopatogênicos a exemplo de *Alternaria* sp., *Drechslera* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. tem sido comumente associados ao decréscimo nos padrões de germinação e vigor das sementes, além de redução da longevidade das mesmas sob armazenamento (Almeida & Reis, 2009; Medina et al., 2009; Marchi et al., 2010). Esse fato gera a necessidade de controlar tais fungos, a fim de evitar prejuízos na produtividade das pastagens.

Neste contexto, o diagnóstico fitossanitário, com base em análises de detecção e determinação de patógenos que constituam ou possam constituir ameaças à qualidade das sementes, serve de orientação para a tomada de decisões quanto ao produto e/ou manejo mais adequado a ser utilizado no cultivo em questão.

Embora vários autores (Vechiato & Aparecido, 2008; Mallmann et al., 2013; Santos et al., 2014) tenham detectado fungos fitopatogênicos associados à sementes de espécies forrageiras, até o momento, não há relatos sobre a ocorrência de fungos em sementes de *P. guenoarum*, a patogenicidade destes e o controle mais eficiente.

Partindo-se do pressuposto de que fungos associados às sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” reduzem a qualidade sanitária e fisiológica das mesmas, com base em observações preliminares realizadas em laboratório, o presente estudo teve como objetivos: 1) determinar as espécies de fungos fitopatogênicos presentes em cinco lotes de sementes; 2) verificar a sensibilidade *in vitro* dos fungos isolados a diferentes fungicidas; 3) avaliar a eficiência do tratamento químico no controle de fungos e no desempenho fisiológico das sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Paspalum guenoarum* Arech. ecótipo “Azulão”

O gênero *Paspalum* compreende mais de 400 espécies tropicais e subtropicais de ocorrência natural em várias regiões do mundo, especialmente na América do Sul, apontado como o centro de origem e diversificação de boa parte das espécies deste gênero (Batista & Godoy, 1998). Muitas dessas espécies estão presentes em abundância em pastagens naturais do Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Brasil, onde representam algumas das melhores gramíneas forrageiras (Valls, 1980; Allen & Valls, 1987; Oliveira, 1995).

Segundo Valls (1992), estão referidas aproximadamente 130 espécies de *Paspalum* no Brasil, agrupadas em diferentes grupos taxonômicos (Chase, 1929). Entre as espécies referidas, 62 ocorrem nos campos naturais do estado do Rio Grande do Sul (Boldrini et al., 2008), boa parte delas com características químicas e morfológicas importantes para a pecuária de corte do estado (Costa & Scheffer-Basso, 2003; Baréa et al., 2007).

Dentre os grupos taxonômicos de *Paspalum*, o grupo Plicatula é o mais importante no Brasil e na América do Sul, sendo conhecido por suas características agrônomicas, que servem de fonte de alimentação para animais silvestres e domesticados (Meireles et al., 2013). A alta adaptabilidade e a ampla variabilidade genética em caracteres de interesse forrageiro são as principais características das espécies que compõe o grupo (Pereira et al., 2012; Cidade et al., 2013). Entre estas espécies, é comum a presença de populações geneticamente únicas, constituindo verdadeiros “ecótipos” (Prates, 1970). Esse é o caso da espécie *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”.

Trata-se de uma gramínea forrageira perene, de hábito cespitoso, com plantas robustas de coloração verde-azulada, podendo alcançar de 0,8 a 2,0 m de altura; possui bainhas maiores que os entrenós, geralmente glabras; lâmina foliar glabra, plicada nas margens, com nervura central esbranquiçada; inflorescência formada por 6 racemos; antécio castanho escuro brilhante; floresce e sazona de março a abril (Barreto, 1974; Paim & Nabinger, 1982). No Rio Grande do Sul, a espécie ocorre nas formações vegetais da Depressão Central, Campos de Cima da Serra, Planalto e Encosta da Serra do Sudeste (Barreto, 1974).

De acordo com Pereira et al. (2012), dentre as características que evidenciam seu bom valor forrageiro, a espécie apresenta altos níveis de produção de matéria seca total ($15.995 \text{ kg/ha}^{-1}$), matéria seca de folhas ($11.218 \text{ kg/ha}^{-1}$), alta digestibilidade, aceitabilidade e tolerância as baixas temperaturas. Steiner (2005), avaliando genótipos de *P. guenoarum* e *P. notatum*, verificou que o Azulão produziu teores médios de 15% de proteína bruta. A boa produção de forragem no período de outono-inverno, período de maior carência alimentar do rebanho sul-brasileiro, também é citada por pesquisadores como importante característica agrônômica desta espécie (Otegui et al., 2005; Steiner, 2005; Sawasato, 2007). Motta (2014), avaliando caracteres agrônômicos em vinte híbridos interespecíficos do gênero *Paspalum*, para a obtenção de cultivares melhoradas geneticamente, constatou superioridade na produção de forragem

do “Azulão” em relação aos demais genótipos, confirmando o resultado encontrado por Pereira et al. (2012).

Lopes et al. (2016), avaliando o manejo de cortes consecutivos na produção e qualidade de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, obtiveram, nos tratamentos com zero e um corte, a maior produção de sementes (850,3 kg/ha⁻¹ e 784,9 kg/ha⁻¹, respectivamente). No mesmo trabalho, para o segundo ano de produção de sementes, os mesmos tratamentos apresentaram os maiores valores de germinação (79,3 e 75,0%, respectivamente). Otegui et al. (2005) obtiveram porcentagens de germinação de 58% e 64,75% nos melhores tratamentos, ao comparar efeitos de luz e temperatura na germinação de sementes de *P. guenoarum*.

A semente é a principal forma de propagação e distribuição dos avanços genéticos de muitas espécies vegetais, inclusive as do gênero *Paspalum*. Segundo Lopes & Franke (2011), dentre as características importantes de uma planta forrageira, a capacidade de produzir sementes viáveis é de extrema importância para a sua propagação. Trabalhos realizados com *Paspalum* apontam baixa capacidade de produção de sementes viáveis e multiplicação comercial limitada pela falta de estudos sobre a influência das práticas de manejo na qualidade das sementes produzidas (Pizarro, 2000; Soster, 2009; Lopes & Franke, 2011).

A produção de sementes é um processo complexo e condicionado por uma série de fatores. Batista & Godoy (1998), avaliando a capacidade de produção de sementes de acessos de *Paspalum*, dentre eles *P. guenoarum*, observaram variabilidade quanto à capacidade fisiológica de produção de sementes viáveis, destacando-se, para época de florescimento, germinação das sementes, tolerância à presença de patógenos e vigor das plântulas no estabelecimento a campo. Pinto et al. (1984), apontaram a baixa qualidade das sementes viáveis como uma das principais causas da espécie *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” não ter boa difusão.

2.2. Importância da qualidade fitossanitária das sementes

Na produção de sementes, além do rendimento, deve-se considerar a qualidade das sementes produzidas (Bahry, 2007). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, regulamenta e fiscaliza através de normas e padrões de identidade, qualidade, produção e a comercialização de sementes de espécies forrageiras em todo o território nacional (MAPA, 2008).

O termo “qualidade das sementes” envolve um conjunto de atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. Esses atributos determinam a capacidade da semente originar um estande uniforme, constituído de plantas de alta produtividade, vigorosas, livre de pragas e doenças (Popinigis, 1985). As informações referentes à qualidade são obtidas em testes específicos conduzidos em laboratórios de análise de sementes, a partir de amostras que representem o lote que se deseja analisar (Brasil, 2009).

De acordo com Bevilaqua & Pierobom (1995), a utilização de sementes de baixa qualidade é um dos principais fatores que afetam a formação das pastagens. Dentre os fatores associados à qualidade das

sementes, a presença de patógenos constitui um dos principais limitantes na produção de plantas forrageiras.

A importância dos problemas fitossanitários vem sendo reconhecida de forma crescente no controle de qualidade de sementes (Silva, 2014). De modo geral, a semente possui papel importante na disseminação de patógenos de plantas forrageiras. Lucca-Filho (2003) relata que este conhecimento deve ser aprofundado, visto que agentes patogênicos veiculados pelas sementes acabam sendo introduzidos nos campos de produção de forragem, onde em muitas situações, podem ocasionar perdas econômicas significativas.

Segundo Teixeira et al. (1997), microrganismos patogênicos veiculados por sementes podem associar-se às mesmas de diferentes maneiras, contaminando-as, superficialmente, ou colonizando os seus tecidos internos. Em decorrência disso, patógenos podem ser introduzidos em áreas livres ou até mesmo o acúmulo destes pode ser observado em áreas já infestadas (Russomano et al., 2000; Oliveira et al., 2012). Esse efeito é notório em áreas de produção de forragem, e tende a ser agravado através de semeaduras consecutivas com sementes infectadas (Vechiato et al., 1997). Segundo Menten (1995), quanto maior é a incidência desses patógenos nas sementes, maiores serão os focos no campo.

Conforme Henning (2004), além da introdução de importantes patógenos no campo, o inóculo presente na semente pode resultar em aumento progressivo de uma determinada doença, podendo refletir negativamente no valor comercial da cultura. Segundo Ito & Tanaka (1993), além das características de transmissão e suas consequências epidemiológicas, certos patógenos presentes nas sementes podem ocasionar efeitos diretos, tais como, redução do potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento, rendimento e produtividade das sementes.

A condição sanitária das sementes no momento da germinação é um aspecto fundamental a ser considerado (Silva et al., 2007). Bevilaqua & Pierobom (1995) ressaltam que a presença de microrganismos, após o ponto de maturação fisiológica, ou no armazenamento das sementes, também representa uma ameaça à sanidade das mesmas, podendo causar redução no poder germinativo, menor desenvolvimento de plântulas nos primeiros estádios e, posteriormente, do rendimento das plantas (Pedroso, 2009). Segundo Fernandes (2005), o inóculo presente na semente pode causar impacto significativo no desenvolvimento das plantas, produção de sementes e persistência das forrageiras no campo, o que tende a trazer sérios prejuízos aos pecuaristas.

O potencial germinativo das sementes é avaliado pelo teste de germinação (Brasil, 2009). Este teste, além de oferecer as condições ideais para o desenvolvimento das sementes, também fornece condições ideais para a presença de microrganismos patogênicos, como fungos e bactérias (Ferraz & Calvi, 2010). Em casos como este, lotes de sementes podem ser eliminados por não atingirem índices satisfatórios de germinação, o que diminui a oferta de sementes no mercado (Oliveira et al., 2012).

Castellani et al. (1996) salientam que a presença de fungos nas sementes pode reduzir a capacidade germinativa de um lote e ocasionar problemas na interpretação dos resultados de testes de germinação,

conduzidos em condições de laboratório. Outros danos decorrentes da associação de patógenos com sementes incluem a morte em pré-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas e caules, deformações, como hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (Neergaard, 1979).

A detecção de patógenos em sementes é imprescindível para a utilização de sementes não infectadas por patógenos. O teste de sanidade é um importante procedimento utilizado para avaliar a qualidade sanitária de um determinado lote de sementes, sendo efetuado através de diferentes métodos capazes de apontar a necessidade e orientar o seu tratamento em casos onde há presença de agentes patogênicos (Botelho et al., 2008). Segundo Henning (2004), além de fornecer informações para a avaliação do valor cultural, a análise da sanidade das sementes pode indicar as causas da baixa germinação, comum em amostras com altos índices de infecção.

Dentre os agentes patogênicos, os fungos são os mais ativos, e englobam o maior número de espécies associadas às sementes (Brasil, 2009). O inóculo fúngico pode ser veiculado através da semente, na forma de micélio e/ou de esporos, sendo que a taxa de transmissão depende da quantidade e localização do inóculo na semente (Neergaard 1979, Tanaka & Machado, 1985). Além disso, em associação às sementes, os fungos destacam-se pela capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais, devido a produção de estruturas de resistência (Kruppa & Russomanno, 2009).

Segundo Vechiato et al. (2010), dentre os fatores que limitam a qualidade e a produtividade das pastagens, estão as doenças causadas por fungos. Logo, a utilização de métodos de detecção acurados constituem ferramentas importantes no processo de identificação e no controle da introdução e disseminação destes agentes patogênicos (Vechiato & Aparecido, 2008).

2.3. Técnicas de determinação de fungos em sementes

A determinação de fungos associados às sementes é de grande valor para a diagnose de doenças e para a melhor compreensão de um determinado patógeno. A opção de uma determinada técnica, dentre as vários existentes, depende das características do patógeno a ser analisado, das condições disponíveis e dos objetivos do teste (Neergaard, 1979).

Os métodos mais utilizados para detecção de fungos mitospóricos ou anamórficos, recomendados pela *International Seed Testing Association* – ISTA, em sementes de gramíneas forrageiras são: método do papel de filtro (*blotter test*), papel de filtro modificado com congelamento (*deep freezer*) e método do plaqueamento em meio ágar sólido.

Tradicionalmente, o método do papel de filtro é o mais utilizado em análises sanitárias de lotes de sementes. Segundo Lucca-Filho (2006) o método é utilizado para todos os tipos de sementes, com a vantagem de detectar um grande número de fungos. Dentre as variações deste método, para sementes forrageiras e cereais, o congelamento rápido facilita a leitura e favorece o desenvolvimento de certos fungos como: *Fusarium*, *Dreschlera*, *Septoria* e *Phoma*, entre outros (Henning, 2004).

O método de incubação das sementes em meio nutritivo com ágar, conhecido como meio BDA (batata-dextrose-ágar), também constitui ferramenta importante para a análise da qualidade sanitária de sementes. O meio BDA é geralmente utilizado em casos onde o *blotter test* não oferece condições adequadas para o crescimento e esporulação de patógenos específicos (Henning, 2004). Este método é capaz de detectar a presença de hifas, corpos de frutificação e esporos, independentemente de estarem localizados na superfície ou no interior das sementes (Oliveira et al., 2012).

Nos métodos tradicionais, a identificação e caracterização de fungos é realizada com base em características morfológicas, como tipo de frutificação, tamanho, forma e cor de esporos (Brasil, 2009). Entretanto, a análise de características morfológicas e culturais podem não ser suficientes para uma caracterização precisa das espécies, uma vez que alguns caracteres podem apresentar similaridade entre espécies dentro do mesmo gênero (Menezes et al., 2010). Esta condição pode ser observada, por exemplo, no gênero *Cercospora*, onde várias espécies apresentam similaridade com relação ao tamanho de conídios (Welles, 1933). Além disso, a dificuldade de cultivo *in vitro* de espécies e incapacidade de quantificar com precisão o patógeno limitam a utilização destes métodos (Goud & Termorshuizen, 2003).

Com o advento da biologia molecular, novas ferramentas baseadas em relações filogenéticas e variações de táxons trouxeram maior precisão e confiabilidade para a identificação e caracterização de espécies fúngicas (Hibbett et al., 2007). Técnicas moleculares desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o sequenciamento de DNA, têm sido ferramentas úteis na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos. Segundo Majer et al. (1996), os marcadores moleculares constituem ferramentas importantes para a identificação e caracterização genética de populações de fitopatógenos.

Dentre os marcadores moleculares utilizados, destaca-se o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que atua entre os genes 18S e 28S do rDNA e que pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões (White et al., 1990). Essa região é altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico (Samuels & Seifert, 1995; Fungaro, 2000; Chen et al., 2004). Outros marcadores tais como fator de alongação (EF1-alfa), β -tubulina, actina, calmodulina e histona também são utilizados no sequenciamento de fungos.

Vários trabalhos utilizando o sequenciamento da região ITS confirmaram diferenças genéticas importantes em genótipos morfologicamente indistintos (Goodwin, Dunkle & Zismann, 2001; Somai et al., 2002). Analisando relações filogenéticas em isolados de *Fusarium solani* por meio do sequenciamento da região ITS, O'Donnell & Gray (1995) sugeriram a existência de espécies distintas classificadas dentro deste complexo. Manamgoda et al. (2012) descobriram que não há limite morfológico claro entre os gêneros *Bipolaris* e *Curvularia* e algumas espécies apresentam morfologia intermediária. Os mesmos autores recomendam a utilização de uma análise combinada de genes para a identificação definitiva de espécies.

Apesar das várias pesquisas conduzidas, muitas em fases avançadas, até o momento, nenhuma técnica molecular para determinação de fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoraum* é conhecida.

2.4. Fungos fitopatogênicos em sementes forrageiras

Dentre os microrganismos associados às sementes, os fungos estão entre os principais causadores de doenças em plantas forrageiras. Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por causar perdas frequentes no rendimento e na qualidade das sementes (Lucca-Filho, 1999). De acordo com Neergaard (1979), os fungos podem provocar aborto, deformações e redução de tamanho, podridões, descolorações e necroses, com impacto direto na redução da viabilidade e da germinação das sementes.

Schafer & Kotanen (2003) verificaram que fungos fitopatogênicos são prejudiciais à germinação e estabelecimento de plantas no campo em quatro espécies de gramíneas. Em sementes de azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam.), Lucca-Filho (1999) detectou grande quantidade de fungos reduzindo o número de plantas por área, dentre eles, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera oryzae* e *Pyricularia grisea*.

No Bioma Pampa, sementes de espécies nativas, como no caso de *Paspalum notatum*, frequentemente apresentam baixo poder germinativo, muitas vezes relacionado a presença de fungos fitopatogênicos (Aguiar et al., 2013). Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia* e *Geniculosporium* são os mais comumente encontrados em sementes de *P. notatum* (Aguiar et al., 2013). Segundo Fonseca & Martuscello (2010), a principal doença fúngica em *P. notatum* é o Ergot, causado por *Claviceps paspali*, que reduz a produção de sementes na variedade Argentina (Pensacola).

Bahry et al. (2007), avaliando a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho, observaram, através do teste de sanidade, alta incidência de fungos e bactérias nas sementes. Em trabalho realizado por Bevilaqua & Pierobom (1995) com sementes de aveia preta, produzidas na região sul do Rio Grande do Sul, os fungos encontrados com maior frequência foram *Helminthosporium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Nigrospora* sp. e *Curvularia* sp., sendo que dos gêneros que causam prejuízos a emergência das plântulas, apenas *Helminthosporium* sp. e *Phoma* sp. ocorreram em elevadas incidências.

Com relação a fungos que infectam sementes de gramíneas cultivadas, como no caso da braquiária, importantes patógenos têm sido detectados, como *Claviceps maximensis* e *Ustilago operta*, agentes etiológicos da mela-das-sementes e do carvão, respectivamente (Marchi et al., 2007; Marchi et al., 2008). Fungos potencialmente patogênicos como *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp., e fungos considerados secundários ou de armazenamento como *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium*

sp. e *Trichoderma* sp. também são relatados com frequência em sementes de braquiária (Vechiato, 2004; Fernandes et al., 2005; Marchi et al., 2006).

Vechiato & Aparecido (2008) relatam que os fungos dos gêneros *Alternaria*, *Exserohilum*, *Curvularia*, *Phoma* e *Fusarium*, comumente associados às sementes de *Urochloa* e *Panicum*, são considerados potencialmente patogênicos às diferentes espécies e cultivares destes gêneros de gramíneas forrageiras. Lasca et al. (2004) observaram evidências da transmissão de *Phoma* sp. e *Curvularia* sp. em sementes de braquiária. O gênero *Curvularia* é apontado por Prabhu et al. (1999) como causador de mancha nas folhas e nas glumas em gramíneas.

Em trabalho realizado por Mallmann et al. (2013), a análise sanitária indicou elevada incidência de fungos fitopatogênicos em sementes de *Brachiaria* sp. e *Panicum maximum*, com predominância de *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. Estes constituem os fungos fitopatogênicos mais comuns nos campos de produção de sementes de forrageiras nos estados de Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP). Neste sentido, os altos níveis de incidência de fungos fitopatogênicos reduzem a viabilidade das sementes (Neergaard, 1979), outros com crescimento rápido e agressivo como *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. podem promover a morte da semente antes mesmo da germinação (Menten, 1995).

Michalski et al. (2007) observaram a transmissão de *Bipolaris* sp. e *Fusarium* sp. das sementes de *Panicum maximum* infectadas naturalmente para a raiz e o sistema basal das plântulas até 50 dias após a semeadura. Cook (1985) alerta que diferentes espécies de *Fusarium* são capazes de infectar grandes quantidades de sementes de um dado lote, podendo ocorrer falhas na germinação ou originar plântulas com sintomas de fusariose. Para Mantovanelli et al. (1991), em trigo, a incidência de fungos *Helminthosporium* sp. não afetou a germinação de sementes, no entanto *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. e *Phoma* sp. reduziram o vigor das sementes.

A inexistência de padrões de qualidade sanitária para a comercialização das sementes, assim como a falta de produtos registrados para tratamento das mesmas são apontados como fatores responsáveis pela ampla dispersão dos fungos patogênicos, contribuindo para o aumento da incidência de doenças nas pastagens (Guimarães et al., 2006).

2.5. Tratamento químico de sementes

O tratamento de sementes é uma ferramenta para a proteção desde a germinação até a fase inicial de desenvolvimento, com impacto direto na produtividade dos cultivos.

De modo geral, o tratamento de sementes consiste na aplicação de substâncias químicas que preservem ou aperfeiçoem o desempenho das sementes, permitindo que as culturas expressem todo seu potencial genético e tem sido eficiente contra fitopatógenos (Menten & Moraes, 2010).

A eficiência do tratamento de sementes depende do tipo e localização do patógeno, do vigor da semente e da disponibilidade de substâncias e processos adequados (Menten & Moraes, 2010). O tratamento

químico de sementes é uma das práticas agrícolas mais simples e econômicas recomendadas no controle preventivo de fungos patogênicos. De acordo com Goulart (2000), a utilização de fungicidas é um dos métodos de mais baixo custo no manejo integrado de doenças de plantas, não só com o interesse de eliminar os patógenos associados às sementes, mas também proteger as sementes e plântulas, durante sua fase inicial de desenvolvimento, de agentes patogênicos presentes na semente e no solo.

De modo geral, fungicidas persistentes e estáveis são aplicados, principalmente, através de molhamento rápido das sementes. Existem equipamentos cada vez mais sofisticados, para o tratamento rápido e adequado das sementes. Normalmente, o tratamento de sementes com fungicidas é realizado imediatamente antes da semeadura, mas pode ser realizado ao final do beneficiamento (Menten & Moraes, 2010).

Carvalho & Nakagawa (2000) ressaltam que o tratamento das sementes com fungicidas faz-se importante no controle de fitopatógenos presentes tanto nas sementes como no solo, além de evitar a introdução ou disseminação de patógenos transmitidos pelas mesmas. Segundo Balardin & Loch (1987), maiores percentuais de germinação e emergência das plântulas podem ser obtidos através do tratamento químico das sementes, uma vez que a infecção primária é retardada e o inóculo de patógenos radiculares e do solo são reduzidos.

Existem fungicidas registrados para 16 culturas, eficientes contra 70 fungos, incluindo agentes causais de podridão de sementes, plântulas, raízes e colo, murchas, mofo branco, manchas, oídios, ferrugens e caries/carvões (Menten & Moraes, 2010). Os mesmos autores referem que a mistura de fungicidas de diferentes modos de ação tem sido recomendada permitindo aumentar o número de alvos a serem controlados e o manejo de resistência prolongando o tempo de vida dos ativos.

Em gramíneas forrageiras, vários trabalhos têm sido conduzidos com o intuito de avaliar a eficiência da utilização de fungicidas no tratamento químico de sementes. Guerra & Costa (2012), avaliando a eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. BRS Piatã, observaram efeito significativo na redução do aparecimento de doenças nos estágios iniciais de desenvolvimento vegetativo desta forrageira. Da mesma forma, Silva et al. (2002) observaram que patógenos importantes para cultura da aveia-branca (*Avena sativa* L.) e que são transmitidos pelas sementes são controlados pelo tratamento com fungicidas, como thiram, triadimenol e carboxin-thiram, garantindo melhor emergência, desenvolvimento das plântulas e alteração da microbiota (fungos, bactérias e actinomicetos).

Em trabalho realizado por Lasca et al. (2001), os fungicidas thiram e carboxin + thiram apresentaram eficiência no controle de fungos em sementes de trigo. Do mesmo modo, estes fungicidas foram eficientes no controle de fungos associados às sementes de *Brachiaria decumbens*, entre eles, *Fusarium* spp., *Curvularia* sp. e *Phoma* sp. (Lasca et al. 2004).

Migliorini (2012) observou que o uso dos fungicidas carboxina + thiram e metalaxil-m + fludioxonil foi importante para reduzir ou erradicar os fungos fitopatogênicos associados às sementes de canola. Os fungicidas fludioxonil + metalaxyl-M, fludioxonil + metalaxyl-M incolor e thiram foram

eficientes no controle dos fungos *Penicillium* spp., *Alternaria tenuis*, *Phoma sorghina*, *Curvularia lunata* e *Drechslera turcica*, em sementes de sorgo (Pinto, 2004).

Os fungicidas thiram + thiabendazol, thiram e carboxin + thiram, promoveram maior emergência de plântulas de *Brachiaria decumbens*, mediante o tratamento das sementes (Lasca et al., 2004). Dias & Toledo (1993) verificaram que os fungicidas captan, thiram, thiabendazol e iprodione + thiram, contribuíram para uma melhor germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* escarificadas. Gotardo (2003) observou que as sementes de girassol tratadas com os fungicidas Vitavax-Thiram[®] e Maxim[®] proporcionaram maiores valores médios de velocidade de emergência em relação às sementes sem tratamento.

Em trabalho realizado por Schuch et al. (2006), o tratamento de sementes com o fungicida carboxina + tiram resultou em aumento da percentagem de germinação, para a avaliação realizada imediatamente após o tratamento, bem como foi eficiente na diminuição da incidência dos principais fungos associados às sementes de arroz, dentre eles, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Gerlachia* sp., *Drechslera* spp., *Curvularia* sp. e *Phoma* sp.

Conforme Santos (2009), pesquisas para avaliar a eficiência dos benefícios do tratamento químico de sementes, e a busca de novos fungicidas visando a melhoria da qualidade das sementes produzidas e comercializadas são constantes e de grande importância para empresas e produtores que atuam neste segmento. Esses estudos permitirão identificar e sugerir novas alternativas de fungicidas, assim como verificar os inúmeros benefícios que os mesmos podem trazer.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação dos lotes de sementes

Foram avaliados cinco lotes de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, representando cinco safras diferentes (2011, 2012, 2013, 2014, e 2015). As sementes foram produzidas na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – EEA/UFRGS, no município de Eldorado do Sul, RS (30°05'52" S, 51°39'08" W e altitude de 32 m). Os dados climáticos durante o desenvolvimento da cultura, nos cinco anos, foram obtidos de uma estação meteorológica localizada a 30 m da área experimental (Figura 1).

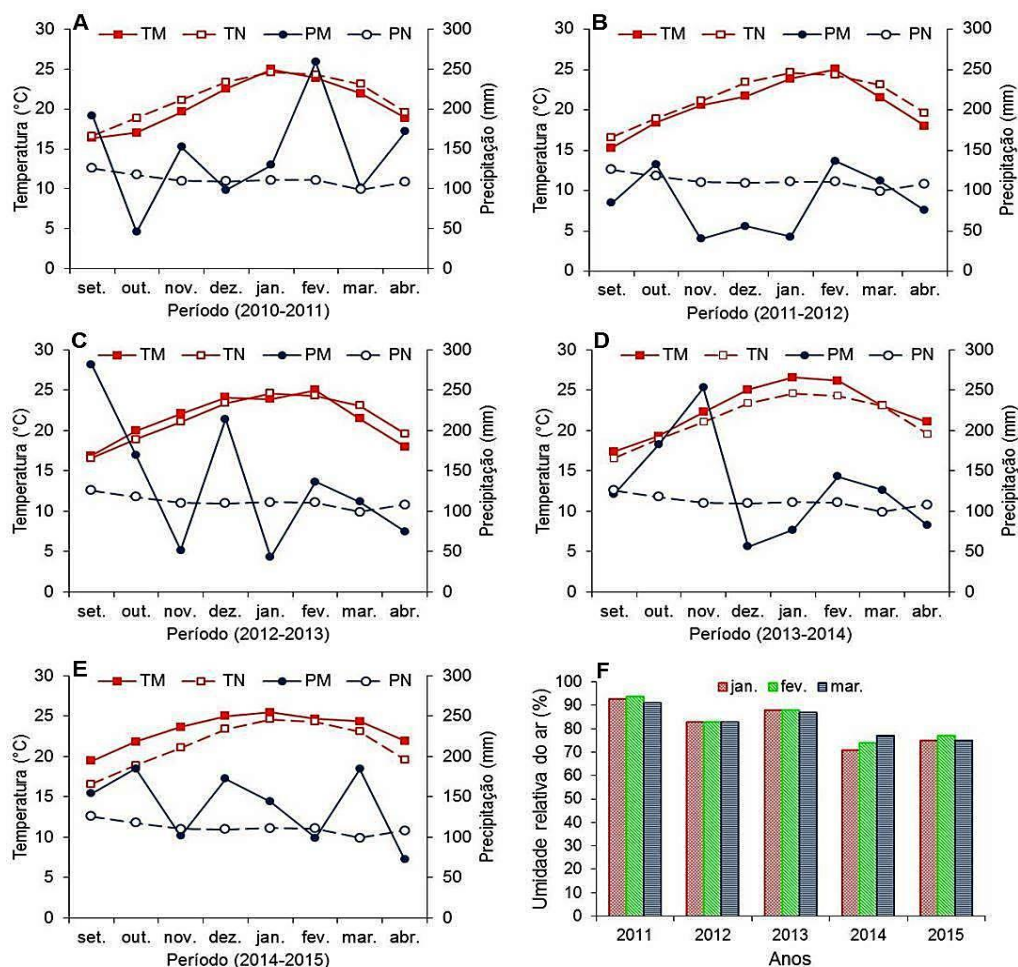


FIGURA 1. Temperatura média mensal (TM), precipitação mensal (PM) e normais (TN, PN) na Estação Experimental Agronômica da UFRGA, Eldorado do Su/RS. A) Lote 2011; B) Lote 2012; C) Lote

2013; D) Lote 2014; E) Lote 2015; F) Umidade relativa do ar no período de pós-antese até a colheita das sementes.

O manejo do campo de produção iniciava no mês de outubro estendendo-se até a colheita das sementes em março. Após a colheita e beneficiamento das sementes, os lotes 2013, 2014 e 2015 foram embalados em sacos de papel “kraft” e acondicionados em câmara fria ($10\text{ °C} \pm 2$; $40 \pm 5\%$ UR, aproximadamente), enquanto os lotes 2011 e 2012 permaneceram embalados em sacos de papel em condição ambiente ($25\text{ °C} \pm 5$; $60 \pm 10\%$ UR, aproximadamente) até 2013, quando passaram para câmara fria com os demais lotes.

3.2. Avaliação da qualidade física e fisiológica dos lotes

Os experimentos foram conduzidas no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA) da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, RS.

3.2.1. Pureza

A análise de pureza foi realizada utilizando-se dez gramas de sementes de cada lote (sementes beneficiadas), separando a amostra em três frações (sementes puras, outras sementes e material inerte) e posteriormente pesadas em balança de precisão, conforme prescrito nas Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009). Os dados foram expressos em porcentagem.

3.2.2. Grau de umidade

Foi determinado pelo método da estufa a $105 \pm 3\text{ °C}$ durante 24 h, em duas subamostras com aproximadamente $4,5 \pm 0,5\text{ g}$ de sementes para cada lote (Brasil, 2009). Os dados foram expressos em porcentagem.

3.2.3. Teste de germinação

Foi realizado com quatro repetições de 100 sementes por lote, distribuídas em caixas plásticas tipo “gerbox” ($11 \times 11 \times 3,5\text{ cm}$), tendo como substrato duas folhas de papel tipo “germitest” esterilizado e umedecido com solução de KNO_3 a 0,2%, na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato não hidratado, seguido de sete dias de pré-esfriamento ($5\text{-}10\text{ °C}$). Após o pré-tratamento, as caixas foram acondicionadas em germinador do tipo “BOD”, sob regime alternado de temperatura e luz ($20\text{ °C}/16\text{ h}$ no escuro e $30\text{ °C}/8\text{ h}$ com luz). A luz foi fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes (20 W; 1060 lm) localizadas no interior do germinador. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes dormentes e sementes mortas obtidas no vigésimo primeiro dia (Brasil, 2009).

3.2.4. Primeira contagem de germinação

Foi realizada considerando o número de plântulas normais no sétimo dia do teste de germinação (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.2.5. Índice de velocidade de germinação

Foi obtido segundo a fórmula proposta por Maguire (1962), a partir do próprio teste de germinação, computando-se diariamente o número de sementes com protrusão radicular até o vigésimo primeiro dia.

$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$. Onde, G1, G2 e Gn = nº de plântulas normais na 1ª contagem, 2ª e última, respectivamente. N1, N2 e Nn = no de dias de semeadura à 1ª, 2ª e última contagem.

3.2.6. Teste de tetrazólio

Foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), em Porto Alegre, RS.

Utilizou-se 200 sementes de cada lote, subdivididas em quatro repetições de 50 sementes. Estas foram seccionadas longitudinalmente e medianamente, através do embrião, e imediatamente submersas em solução de tetrazólio (2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio) a 0,5%, em recipientes plásticos mantidos por 24 horas em BOD a 30 °C, no escuro, para coloração. Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. Os embriões foram individualmente examinados e, de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, foram individualmente classificados em viáveis e inviáveis (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por lote para todas as variáveis avaliadas, com exceção do grau de umidade, no qual foram utilizadas duas repetições. A análise de variância (teste F) foi realizada por meio do PROC GLM do Statistical Analysis System™ program, version 9.1.3 (SAS Institute, Inc.). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. A matriz de correlação de Pearson foi realizada através do PROC CORR (SAS Institute, Inc.), com intuito de verificar relações existentes entre as variáveis avaliadas. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e de homogeneidade de variância, que não indicaram a necessidade de transformação ($P > 0,05$).

3.3. Isolamento e caracterização de fungos fitopatogênicos associados às sementes

3.3.1. Obtenção dos isolados

As análises sanitárias foram realizadas no Laboratório Agrônômica - Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, localizado em Porto Alegre, RS.

A avaliação dos fungos fitopatogênicos associados às sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” foi realizada através do método do papel de filtro modificado com congelamento “blotter test” (Brasil, 2009) (Figura 2). Foram utilizadas caixas acrílicas do tipo “Gerbox” (11 × 11 × 3,5 cm), desinfestadas com álcool 70%, contendo em seu interior duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram submetidas à desinfestação em uma sequência de solução de álcool (70%), por 30 segundos, hipoclorito de sódio (1%), por 3 minutos e, posteriormente, água destilada esterilizada.

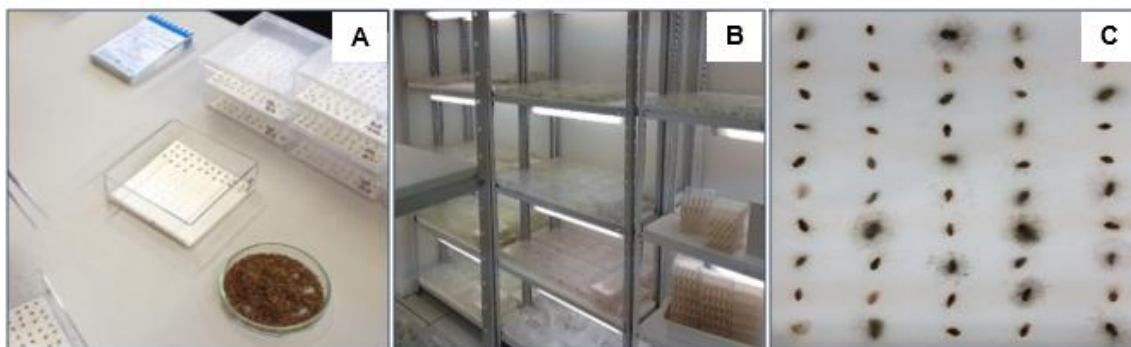


FIGURA 2. Avaliação dos fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, por meio do “Blotter test” com congelamento. A- Distribuição das sementes no substrato papel de filtro; B- Incubação em câmara de crescimento; C- Crescimento micelial observado nas sementes.

As sementes foram dispostas individualmente (Figura 2-A) e, posteriormente, acondicionadas em câmara incubadora pelo período inicial de 24 horas, 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (Figura 2-B). Logo após, foram colocadas em congelador (-20 °C) por 24 horas, com a finalidade de paralisar o processo germinativo. Após esse período, as sementes retornaram à condição de incubação inicial, tal como descrito anteriormente, por mais 5 dias.

A avaliação foi realizada examinando-se individualmente as sementes sob microscópio estereoscópico, aos sete dias após a incubação. Quando necessário, lâminas foram preparadas e visualizadas em microscópio de luz. Os fungos encontrados foram determinados ao nível de gênero, com base em suas características morfológicas, comparando-se com a literatura disponível, e quantificada a incidência (porcentagem de sementes portadoras do fungo).

Os fungos considerados potencialmente fitopatogênicos encontrados na superfície das sementes (Figura 2-C) foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas em

câmara tipo BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Culturas monospóricas dos isolados obtidos foram realizadas e preservadas em microtubos armazenadas a 4 °C, e em papel filtro a -20 °C. Os isolados foram depositados na Coleção Micológica (CML), localizada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil.

3.3.1.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições de cada lote. Cada unidade experimental foi constituída de um “Gerbox” com 50 sementes.

3.3.2. Teste de patogenicidade

O experimento foi realizado no Laboratório de Cereais de Inverno do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, RS.

A patogenicidade dos fungos detectados no teste de sanidade de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” foi avaliada por meio de inoculações no substrato, colo e parte aérea de plântulas.

Para a obtenção das plântulas, as sementes foram desinfestadas, conforme descrito no item anterior, e semeadas em caixas tipo “Gerbox” (Figura 3-A). Dez dias após, as plântulas aparentemente sadias foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido (EPS) (45 x 30 x 10 cm, com 56 células) contendo substrato comercial Carolina Soil® esterilizado (Figura 3-B), mantidas em casa de vegetação por 20 dias até o momento da inoculação (Figura 3-C). Foram inoculadas 56 plântulas por tratamento/isolado. As inoculações foram realizadas com suspensão de 10⁵ conídios/mL (Figura 3-D). Os isolados fúngicos obtidos na análise sanitária dos lotes foram reativados em placas de Petri contendo meio BDA, incubadas por sete dias em BOD, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas inoculadas foram acondicionadas em câmara úmida escura (100% UR) e temperatura de 25 °C, por 48 horas. Após este período, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento até o momento das avaliações, 15 dias após a inoculação.

As plântulas que apresentaram algum sintoma foram colocadas em câmara úmida e meio BDA para observação de estruturas fúngicas e re-isolamento do fungo. Estes foram re-isolados em meio de cultura BDA e os postulados de Koch foram comprovados.

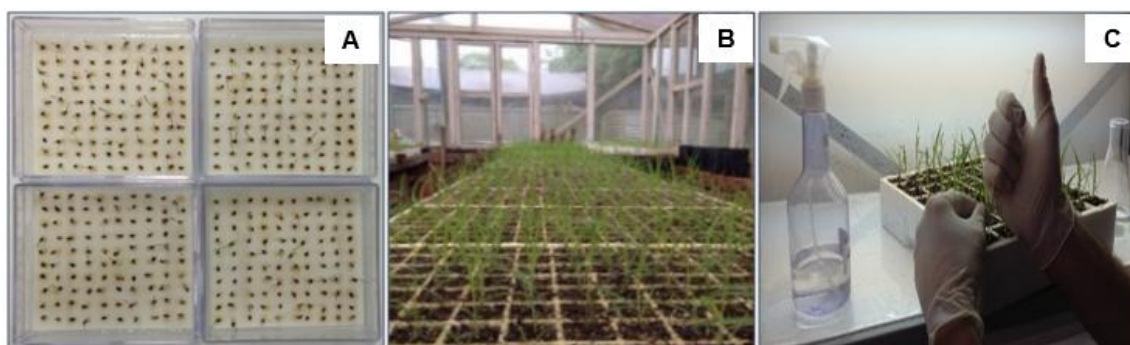


FIGURA 3. Teste de patogenicidade de fungos em plântulas de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”. A- Obtenção de plântulas em caixas tipo *gerbox*; B- Transferência para bandejas acondicionadas em casa de vegetação; C- Aplicação de suspensões de conídios.

3.3.3. Caracterização molecular dos isolados

As análises foram conduzidas no Laboratório Agrônomo - Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, localizado em Porto Alegre, RS.

Para a extração do DNA dos isolados selecionados no experimento de patogenicidade, discos de micélio (5 mm) de cada isolado crescido em meio de cultura BDA foram transferidos para *erlenmeyers* de 100 mL contendo extrato de malte 2% líquido e incubados a temperatura de 25 °C, 12 h/12 h de fotoperíodo por 3 dias. Posteriormente, os micélios foram filtrados e lavados com água destilada estéril para remoção do meio de cultura, congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C. A extração do DNA genômico foi realizada, utilizando 100 mg de crescimento fúngico homogeneizado com o kit DNA Wizard (Promega, Madison, USA), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA foi mensurado em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, New Hampshire, USA).

Inicialmente, parte da sequência gênica do *translation elongation factor 1- α* (EF1- α) foi determinada para todos os isolados coletados utilizando o par de primers EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') e EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998). As condições da reação foram 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 10 min. Para o gene *internal transcribed spacers* (ITS) foram utilizados o par de primers ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). As condições da reação foram 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 10 min. Para o gene da *RNA polymerase II second largest subunit* (RPB2) foram utilizados o par de primers 5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (5'- CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3') (O'Donnell et al., 2007; Liu et al., 1999). As condições da reação foram 94 °C por 90 segundos, seguidas por 40 ciclos a 94 °C, por 30 segundos, 55 °C, por 90 segundos, 68 °C por 2 minutos e 68 °C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% e submetidos à purificação utilizando o GenElute PCR clean-up Kit (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto da reação de PCR foi enviado para a Genewiz, EUA. O método de Sanger foi utilizado no sequenciamento dos genes EF1- α , ITS e RPB2.

Os eletroferogramas gerados foram analisados, utilizando-se o programa BioEdit e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI), com o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

3.3.4. Caracterização morfológica dos isolados

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em Lavras, MG.

A caracterização morfológica baseou-se no tamanho e forma dos conídios e conidióforos de cada um dos isolados patogênicos. As estruturas foram analisadas a partir da montagem de lâminas semi-permanentes com lactofenol. Para cada isolado mediu-se o comprimento (μm) e a largura (μm) de 30 esporos. As observações e medições das dimensões das estruturas foram feitas em microscópio de luz Axio Observer Z1 Zeiss[®] (Germany) com magnitude de 40X. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2. O equipamento foi calibrado utilizando-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss[®]).

3.4. Controle químico de fungos associados às sementes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cereais de Inverno do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, RS.

3.4.1. Fungitoxicidade *in vitro*

Foram avaliados quatro fungicidas comerciais de diferentes grupos químicos (Tabela 1), utilizados no tratamento de sementes, conforme informações técnicas para trigo e triticales – safra 2016 / 9^a Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales.

TABELA 1. Descrição dos fungicidas utilizados no controle de fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”.

Ingrediente ativo	Produto comercial	Grupo químico	Modo de ação	Formulação	Concentração do i.a (g/kg ou g/L)
Carbendazim + Tiram	Derosal Plus [®]	Benzimidazol + Dimetilditiocarbamato	Sistêmico + protetor	SC ¹	150 + 350

Metalaxil-M + Fludioxonil	Maxim XL [®]	Fenilpirrol + Acilalaninato	Sistêmico + protetor	SC	10 + 25
Carboxina + Tiram	Vitavax-Thiram [®]	Carboxanilida + Dimetilditiocarbamato	Sistêmico + protetor	SC	200 + 200
Tiofanato Metílico	Cercobim 700 WP [®]	Benzimidazol	Sistêmico	PM ²	700

¹SC = suspensão concentrada. ²PM = pó molhável.

Para a produção de inóculo, fragmentos de micélio de culturas puras de cada isolado (*Bipolaris micropus*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium incarnatum* e *Phoma herbarum*) foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar e estreptomicina (BDA + S) e posteriormente incubados sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo (25 °C e 12 h luz branca fluorescente/ 12 h escuro), durante sete dias.

Para o preparo do meio de cultura com fungicida, cada produto comercial foi adicionado ao meio de cultura BDA, conforme descrito por Mondal et al. (2005) e Frare (2005). Os produtos utilizados foram diluídos em água destilada autoclavada, sob fluxo laminar. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque I para cada fungicida, de 1 g de i.a do produto comercial em 1 L de água, obtendo-se a concentração de 1 ppm. A partir desta solução estoque, foram realizadas diluições em série, sendo transferidas para 1 L de meio BDA fundente (45 - 47 °C), obtendo-se assim, meios nas concentrações de 1; 2,5; 5; 10 e 30 ppm dos fungicidas.

Discos de micélio de 4 mm de diâmetro de crescimento fúngico foram transferidos para o centro de uma placa de Petri contendo meio BDA adicionado de estreptomicina (BDA + S). Os controles consistiram de discos de micélio colocados em placas de Petri contendo apenas BDA + S (tratamento controle = 0 ppm). As placas foram incubadas 25 °C e fotoperíodo 12 h/ 12 h.

As avaliações foram realizadas quando a colonização das placas do tratamento controle chegou próximo ao diâmetro total das placas (70 x 15 mm), levando de cinco a sete dias, variando conforme o isolado. Com o auxílio de um paquímetro digital, os diâmetros da colônia de cada placa de Petri foram mensurados, comparando-os com o crescimento médio das testemunhas. O valor da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculado de acordo com Menten et al. (1976).

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha (0 ppm)} - \text{Crescimento do tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha (0 ppm)}} \times 100$$

Análises de regressão correlacionando porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) e concentrações dos fungicidas (transformadas em funções exponenciais e logarítmicas) foram realizadas para cada fungo, sendo calculada a DL₅₀ (dose necessária para inibir o crescimento fúngico em 50%).

3.4.1.1. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, organizado em esquema fatorial 4 x 4 x 6 (Fungicida x Fungo x Concentração), com dez repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o software *Statistical Analysis System* versão 9.1.3 (SAS Institute, Inc.). Foram testados modelos de regressão linear e não linear (logarítmico e exponencial) entre crescimento micelial (y) e dose do fungicida (x) para estimar a DL₅₀. A escolha do modelo melhor ajustado para os diferentes fungicidas levou em conta a significância (P<0,05) e o coeficiente de determinação (R²). Foi utilizado o programa estatístico JMP (v.12).

3.4.2. Tratamento de sementes com fungicidas

Após obter os resultados da fungitoxicidade *in vitro*, foi realizado o teste *in vivo* com o objetivo de validar a utilização desses resultados. Para tanto, dois fungicidas selecionados pelo critério de melhor desempenho *in vitro* (DL₅₀ < 1 ppm) foram aplicados no tratamento de sementes com incidência fúngica natural, com o intuito de avaliar a ação dos mesmos sobre os fungos fitopatogênicos associados naturalmente às sementes de *P. guenoarum*. Para a realização desse experimento, foram utilizadas somente as sementes do lote 2015, levando-se em consideração a representatividade deste em relação aos fungos encontrados no teste de sanidade.

Os fungicidas utilizados no tratamento das sementes e as respectivas doses (mL p.c.) encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2. Fungicidas utilizados no tratamento das sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”.

Ingrediente ativo	Produto comercial	Dose mL p.c./100 kg de sementes
Testemunha (sem fungicida)	-	-0-
Carboxina + Tiram	Vitavax-Thiram [®]	300
Metalaxil-M + Fludionoxil	Maxim XL [®]	300
Mistura (Carboxina + Tiram) + (Fludionoxil + Metalaxil-M)	Vitavax-Thiram [®] + Maxim XL [®]	150 + 150

Foram utilizadas 100 g de sementes para cada tratamento. A aplicação dos fungicidas às sementes foi realizada em recipiente *erlenmeyer* com dois litros de capacidade, adicionando-se o volume de calda correspondente ao peso das sementes. O recipiente foi agitado até a completa cobertura das sementes pelos fungicidas. Em seguida, as sementes tratadas foram submetidas aos testes de sanidade e de germinação (Brasil, 2009).

3.4.2.1. Teste de sanidade

Foi efetuado através do método de plaqueamento das sementes em meio batata-dextrose-ágar com adição de estreptomicina (BDA + S) (Brasil, 2009). Foram avaliadas 400 sementes por tratamento, dispostas em placas de Petri e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento, sob temperatura de 25 °C e regime alternado de luz (12 h no escuro e 12 h com luz). Completando-se os sete dias de incubação, as sementes foram examinadas individualmente sob microscópio estereoscópico e quando necessário, com microscópio composto. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de sementes portadoras de fungos fitopatogênicos.

3.4.2.2. Teste de germinação

Foram avaliadas 400 sementes por tratamento, distribuídas em caixas plásticas tipo “gerbox” (11 × 11 × 3,5 cm), tendo como substrato duas folhas de papel tipo “germitest” esterilizado e umedecido com solução de KNO₃ a 0,2%, na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato não hidratado, seguido de sete dias de pré-esfriamento (5-10 °C). Após o pré-tratamento, as caixas foram acondicionadas em germinador do tipo “BOD” sob regime alternado de temperatura e luz (20 °C/16 h no escuro e 30 °C/8 h com luz). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas obtidas no vigésimo primeiro dia. O vigor das sementes foi avaliado através da primeira contagem de germinação (PCG), considerando o número de plântulas normais no sétimo dia do teste de germinação, e pelo índice de velocidade de germinação (IVG), a partir do próprio teste de germinação (Brasil, 2009).

3.4.2.3. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 100 sementes para o teste de germinação e 40 repetições de dez sementes para o teste de sanidade. A análise de variância e o teste F foram realizados por meio do PROC GLM do Statistical Analysis System™ program, version 9.1.3 (SAS Institute, Inc.), onde foram comparados os efeitos de tratamento (fungo, fungicida e concentração). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e de homogeneidade de variância, que não indicaram a necessidade de transformação ($P > 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da qualidade física e fisiológica dos lotes

O teor de umidade das sementes variou entre os lotes ($P < 0,05$), apresentando valores de 11,2 a 12,9%, com amplitude de 1,7% (Tabela 3). Segundo Marcos Filho (2005), esta diferença não compromete a comparação entre os lotes (limite recomendável de 2%), tendo em vista a obtenção de resultados consistentes. Nenhum dos lotes apresentou percentual de pureza abaixo do padrão indicado para a espécie (60%) (MAPA, 2008) (Tabela 3).

TABELA 3. Grau de umidade (U), pureza (P), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes dormentes (SD), sementes mortas (SM), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) de sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, em função do ano de colheita.

Lotes	U (%)	P (%)	Germinação			
			PN (%)	PA (%)	SD (%)	SM (%)
2011	11,2 c	99,8 a	0 d	0 d	0 b	100 a
2012	11,8 b	99,9 a	36 c	4 cd	1 ab	59 b
2013	11,2 c	99,7 a	58 b	7 cb	1 ab	35 c
2014	12,7 a	99,6 a	75 a	13 b	2 ab	10 d
2015	12,9 a	99,9 a	76 a	17 a	2 a	5 e
CV (%)	0,62	0,88	7,67	27,79	72,74	9,03
F	224,31**	0,10ns	285,69**	30,87**	3,69**	360,91**

DMS	0,29	0,34	7,97	3,79	4,20	8,56
Lotes	Vigor					
	PCG (%)	IVG	TZ (%)			
2011	0 e	0,0 e	0 e			
2012	19 d	11,8 d	34 d			
2013	37 c	12,7 c	62 c			
2014	43 b	13,9 b	85 b			
2015	49 a	14,4 a	98 a			
CV (%)	8,65	1,48	8,41			
F	274,87**	5956,11**	266,83**			
DMS	6,60	0,33	9,81			

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ** Significativo a 5% pelo teste F. ^{ns} Não significativo.

Os maiores percentuais de PN foram observados nos lotes 2014 e 2015 ($P < 0,05$), seguidos pelo lote 2013 (Tabela 3), ambos atendendo aos padrões mínimos para a produção e comercialização de sementes de *P. guenoarum* (50%), conforme Instrução Normativa nº 30, de 21 de maio de 2008 (MAPA, 2008). Os valores de germinação fora dos padrões mínimos foram observados nos lotes 2011 e 2012. A colheita das sementes do lote 2011 foi precedida de precipitações acima da média e alta umidade relativa do ar (Figura 1). Segundo Carvalho & Nakagawa (2000), estresses climáticos, oriundos das oscilações de umidade decorrentes de chuva, associados a temperaturas elevadas no período de maturação fisiológica (pré colheita) e a colheita, são as principais causas da perda de potencial fisiológico das sementes, o que foi observado neste trabalho. Além disso, os lotes 2011 e 2012 foram armazenados em condições não controláveis até o ano de 2013, o que possivelmente contribuiu com o baixo desempenho fisiológico dos mesmos (Tabela 3).

Apesar do grau de umidade das sementes ser menor, houve uma redução na qualidade fisiológica dos lotes 2011, 2012 e 2013 que apresentaram valores decrescentes nos percentuais de germinação (PN), vigor (PCG, IVG e TZ) e aumento nos percentuais de sementes mortas (SM). Essa queda pode estar relacionada com as más condições de armazenamento e o tempo prolongado do mesmo. Embora a deterioração seja um processo inevitável mesmo em condições adequadas, condições do ambiente e tempo de armazenamento prolongados aceleram esse processo. Segundo Marcos Filho (2005), após a maturidade, o potencial fisiológico das sementes pode permanecer relativamente inalterado durante curto período de tempo ou decrescer rapidamente, com velocidade e intensidade determinadas pelas condições do ambiente e das práticas de manejo. A redução na qualidade é, em geral, traduzida pelo decréscimo nos percentuais de germinação, aumento de plântulas anormais, redução no vigor das plântulas e morte das sementes (Toledo et al., 2009).

A constatação de fungos durante o teste de germinação pode ter colaborado na redução do potencial de germinação e vigor das sementes. Durante o período de incubação das sementes no germinador, nas condições

ideais para a máxima germinação, a umidade relativa do ar, a umidade da semente e a temperatura elevam-se, proporcionando condições favoráveis para a aceleração dos processos bioquímicos ativadores da germinação (Bewley & Black, 1994; Taiz & Zeiger, 2009). No entanto, nestas circunstâncias, a ação de fungos que contribuem para a deterioração das sementes também se beneficiam (Kapoor et al., 2011). A perda da viabilidade ocasionada pela presença de fungos nas sementes é relatada por diversos autores (Anjos et al., 2004; Silva et al., 2007; Almeida & Reis, 2009; Marchi et al., 2010; Mallmann et al., 2013; Santos et al., 2014).

Castellani et al. (1996) relataram que a presença de fungos pode reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes e apresentar problemas, por exemplo, na interpretação dos resultados dos testes de germinação conduzidos em condições de laboratório. De fato, no presente trabalho, notou-se elevada incidência de fungos nas sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, dificultando a avaliação da qualidade fisiológica dos lotes.

Houve redução no percentual de sementes dormentes (SD) ao longo do armazenamento, entretanto este percentual pode ser considerado baixo até mesmo porque as sementes foram submetidas ao pré-tratamento de superação da dormência com KNO_3 . A expressão da dormência está ligada a causas fisiológicas nas sementes recém-colhidas, que são progressivamente suprimidas com o tempo de armazenamento (Munhoz et al., 2009).

Através da análise de correlação de Pearson, nota-se que os testes de vigor (PCG, IVG e TZ) apresentaram correlações positivas e significativas entre a maioria deles com a germinação (G) (Tabela 4). Foi possível estabelecer associações positivas ao nível de 1% de probabilidade entre PCG x G ($r= 0,78$), PCG x IVG ($r= 0,78$), IVG x TZ ($r= 0,73$), e 5% de probabilidade entre IVG x G e IVG x TZ ($r= 0,54$ e $r= 0,73$, respectivamente). Nos testes de G, PCG e IVG a existência de correlação positiva e significativa era, de certa forma, esperada, pois, apesar de avaliar diferentes aspectos da qualidade fisiológica das sementes, foram conduzidos simultaneamente e com as mesmas amostras.

TABELA 4. Coeficientes de correlação simples entre o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, em função do tempo de armazenamento dos lotes de sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”.

	G	PCG	IVG	TZ
G	–	0,78**	0,54*	0,52*
PCG		–	0,78**	0,33ns
IVG			–	0,73**
TZ				–

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t ($P < 0,01$). * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t ($P < 0,05$). ^{ns} Não significativo.

Embora a PCG e o teste de TZ sejam considerados indicativos de vigor, o primeiro é um teste fisiológico e o segundo, bioquímico, e sua associação neste estudo não foi significativa ($r= 0,33$). Delouche & Baskin (1973) afirmaram que o processo de redução da velocidade de germinação não é um dos primeiros eventos que ocorrem internamente nas sementes, sendo assim, podem não detectar os eventos iniciais da redução da qualidade fisiológica das sementes. Contudo, sabe-se que sementes em avançado processo de deterioração, podem germinar com velocidade mais baixa.

4.2. Isolamento e caracterização de fungos fitopatogênicos associados às sementes

4.2.1. Obtenção dos isolados

Foram obtidos cinco isolados de fungos associados às sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”, sendo eles, *Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. (Tabela 5).

TABELA 5. Incidência (%) de fungos em cinco lotes de sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, avaliada através do método do papel de filtro modificado.

Fungos	Lotes				
	2011	2012	2013	2014	2015
<i>Bipolaris</i> sp.	0,0	0,0	0,0*	0,75	21,0
<i>Chaetomium</i> sp.	1,0	1,0	0,25	0,0	0,0
<i>Curvularia</i> sp.	0,0	0,0	0,5	8,0	10,0
<i>Fusarium</i> sp.	0,0	0,0	1,25	0,75	2,5
<i>Phoma</i> sp.	0,0	0,0	0,5	2,0	12,0
Total (%)	1,0	1,0	2,5	11,5	42,5

* Médias provenientes de oito repetições.

De modo geral, observou-se um crescente aumento nos percentuais de incidência de fungos nas sementes de *P. guenoarum* ao longo das safras (Tabela 5). Nas sementes das safras 2011 e 2012, detectou-se apenas o fungo *Chaetomium* sp., com incidência de 1,0% em ambas. Na safra 2013, as maiores incidências foram de *Fusarium* sp. (1,25%), *Curvularia* sp. (0,5%), *Phoma* sp. (0,5%) e *Chaetomium* sp. (0,25%), enquanto que na safra 2014, foram de *Curvularia* sp. (8,0%), *Phoma* sp. (2,0%), *Fusarium* sp. (0,75%) e *Bipolaris* sp. (0,75%). Em 2015, observou-se que as maiores incidências foram de *Bipolaris* sp. (21%), *Phoma* sp. (12%), *Curvularia* sp. (10,0%) e *Fusarium* sp. (2,5%).

Dentre os fungos detectados, *Bipolaris* sp. apresentou incidência de 0,0% a 21,0% (média 4,2%). Para *Chaetomium* sp., a incidência variou de 0,0% a 1,0% (média 0,45%). *Curvularia* sp. apresentou incidência de 0,0% a

10,0% (média 3,75%). No caso de *Fusarium* sp., a incidência foi de 0,0% a 2,5% (média 0,8%). Para *Phoma* sp., a incidência variou de 0,0% a 12,0% (média 2,9%).

Chama a atenção na Tabela 5, a alta incidência de fungos no lote 2015. Trata-se de uma área que vinha sendo utilizada com *P. guenoarum* por mais de quatro anos e isto pode ter ocasionado um incremento do potencial de inóculo. Segundo Campbell & Madden (1990), o uso contínuo da mesma área de cultivo onde há presença de fungos fitopatogênicos favorece a sobrevivência, manutenção e aumento do potencial de inóculo. Menten (1995), também comenta que quanto maiores os focos de fungos fitopatogênicos no campo, maiores serão as incidências nas sementes.

Também as condições climáticas favoráveis a presença de fungos no campo de produção, tais como a umidade relativa do ar e altas temperaturas (Figura 1), podem ter favorecido o aumento do potencial de inóculo ao longo das safras de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”.

De maneira geral, o aumento dos níveis de incidência de fungos potencialmente fitopatogênicos às sementes constitui motivo de preocupação, pois, enquanto alguns fungos são capazes de reduzir a viabilidade das sementes, outros, com crescimento rápido e agressivo como *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. podem promover a morte da semente antes mesmo da germinação (Menten, 1995). Existe, portanto, a necessidade avaliar a presença desses fungos em sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”.

4.2.2. Teste de patogenicidade

A recuperação dos fungos a partir de sintomas, quando da inoculação dos mesmos em plântulas de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” é mostrado na Tabela 6.

TABELA 6. Patogenicidade de isolados fúngicos associados às sementes, 15 dias após a inoculação em plântulas de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”.

Fungo	Re-isolamento
<i>Fusarium</i> sp.	+
<i>Curvularia</i> sp.	+
<i>Phoma</i> sp.	+
<i>Bipolaris</i> sp.	+
<i>Chaetomium</i> sp.	-

(+) Fungo patogênico, (-) Fungo não patogênico.

Os fungos *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. foram recuperados de plântulas que apresentaram sintomas (Tabela 6). Esses fungos são considerados importantes patógenos de espécies gramíneas forrageiras (Marchi et al., 2010; Mallmann et al., 2013; Silva et al., 2014).

O isolado *Chaetomium* sp. não apresentou sintomas em plântulas inoculadas (Tabela 6), contrariando as expectativas, visto que o potencial fitopatogênico desse fungo foi relatado em outras espécies agrícolas (Freire,

2006; Silva-Lobo et al., 2006; Aquino et al., 2009). As plântulas do tratamento-controle permaneceram assintomáticas.

Nas plântulas inoculadas com *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. e *Phoma* sp., os sintomas caracterizaram-se por manchas foliares amareladas seguidas de necrose dos tecidos. Os sintomas causados por *Fusarium* sp. foram lesões nas raízes das plântulas, evoluindo para o colo e em seguida causando a morte das mesmas.

Os resultados obtidos no presente estudo complementam aqueles relatados por outros pesquisadores. Segundo Lasca et al. (2004), fungos dos gêneros *Curvularia* e *Phoma*, quando presentes em sementes de *Brachiaria decumbens*, podem afetar a emergência e provocar a morte de plântulas. Michalski et al. (2007) observaram que os fungos *Bipolaris* sp. e *Fusarium* spp. foram capazes de infectar naturalmente a raiz e o sistema basal de plântulas de *Panicum maximum* até 50 dias após a semeadura. A presença do patógeno no embrião da semente é a maneira mais eficiente de se garantir a infecção da plântula que dela será originada (Neergaard, 1976; Menten, 1991; Tanaka & Machado, 1985).

4.2.3. Caracterização molecular dos isolados

Os fungos fitopatogênicos tiveram a caracterização molecular confirmada por meio do sequenciamento de genes conservados. Observou-se que *Bipolaris* sp. (CML 3600) apresentou 99% de identidade com *Bipolaris micropus* (Drechsler) Shoem. (Número de acesso no GenBank HE792935.1) utilizando o gene ITS. *Fusarium* sp. (CML 3601) apresentou 99% de identidade com *Fusarium incarnatum* (Roberge) Sacc. (KF255542.1) utilizando o gene RPB2. *Curvularia* sp. (CML 3602) apresentou 99% de identidade com *Cochliobolus geniculatus* R. R. Nelson (KF590040.1) forma perfeita de *Curvularia geniculata*, utilizando o gene ITS. *Phoma* sp. (CML 3599) apresentou 100% de similaridade com *Phoma herbarum* Westend. (KT319052.1) utilizando o gene ITS.

Os quatro isolados estudados tiveram identificação molecular confirmada pelos dados moleculares aqui analisados, pois apresentaram no máximo 1% de divergência em relação as sequências depositadas no GenBank. Nilsson et al (2008) apontaram que 2% é uma margem aceitável para divergências intraespecíficas em Ascomycota em sequências da região ITS.

Este é o primeiro relato de *B. micropus*, *F. incarnatum*, *C. geniculata* e *P. herbarum* em sementes de *P. guenoarum* Arech. no Brasil. Os resultados obtidos irão contribuir para o enriquecimento de dados genéticos de fungos fitopatogênicos associados às sementes de *P. guenoarum* ecótipo "Azulão". As sequências geradas neste estudo foram depositadas no GenBank para posteriores consultas que sem dúvida irão auxiliar novas pesquisas de taxonomia e filogenia.

4.2.4. Caracterização morfológica dos isolados

A espécie *Bipolaris micropus* apresentou crescimento micelial que variou de branco para marrom e, uma vez maduro, de verde escuro para preto (Figura 4-A). Foram observados conídios de cor marrom pálido, cilíndricos e retos, medindo entre 32-57 μm (média 47 μm) de comprimento por 16-21 μm (média 19 μm) de largura (Figura 5-A). Os conidióforos mediram entre 300-670 μm (490 μm) de comprimento por 6,8-8,9 μm (média 7,7 μm) de largura.

Na espécie *Fusarium incarnatum*, a coloração das colônias variou de branco a creme com focos de micélio aéreo branco espalhados pela colônia (Figura 4-B). Foram observados macroconídios ligeiramente curvados medindo entre 17-31 μm (média 24 μm) de comprimento por 2,4-4,1 μm (média 3,4 μm) de largura (Figura 5-B), e microconídios em conidióforos aéreos (blastoconídios) medindo entre 9,3-16 μm (média 13 μm) de comprimento por 2,5-3,4 μm (média 3 μm) de largura. Os conidióforos são pouco ramificados com fiálides curtas e largas. Os clamidósporos são esféricos, medindo 4,7-16 μm (média 10 μm) de diâmetro.

A espécie *Curvularia geniculata* apresentou colônias com crescimento micelial verde escuro tornando-se com o tempo preto-acinzentado (Figura 4-C). Os conidióforos mediram entre 212-272 μm (média 246 μm) de comprimento por 4,7-5,9 μm (média 5,3 μm) de largura. Os conídios mediram entre 17-25 μm (média 20,5 μm) de comprimento por 12-9 μm (média 14 μm) de largura, com células basais e apicais castanho pálido e células intermediárias marrom ou marrom escuro (Figura 5-C).

As colônias de *Phoma herbarum* apresentaram micélio aéreo esverdeado, com pigmento avermelhado exsudado no ágar (Figura 4-D). Os conídios hialinos mediram entre 7,9-11,5 μm (média 9,4 μm) de comprimento por 4,7-7,1 μm (média 5,7 μm) de largura (Figura 4-D), sendo produzidos em picnídios esféricos com dimensões de 100-250 μm (média 135 μm) por 105-240 μm (média 150 μm) de diâmetro (Figura 5-E).

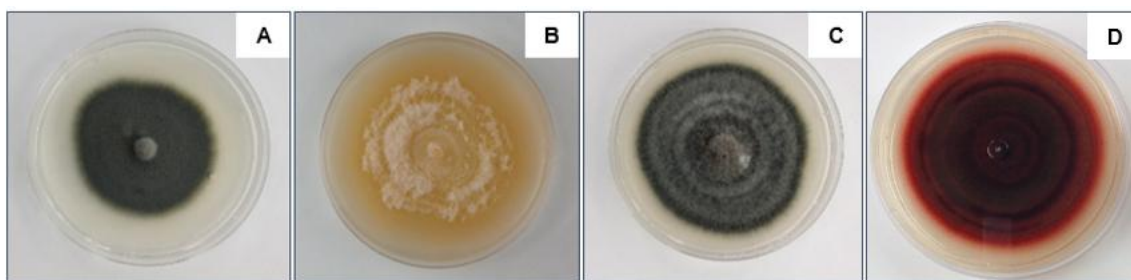


FIGURA 4. Crescimento micelial de fungos obtidos em sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo "Azulão", em meio BDA. A- *Bipolaris micropus*; B- *Fusarium incarnatum*; C- *Curvularia geniculata*; D- *Phoma herbarum*.

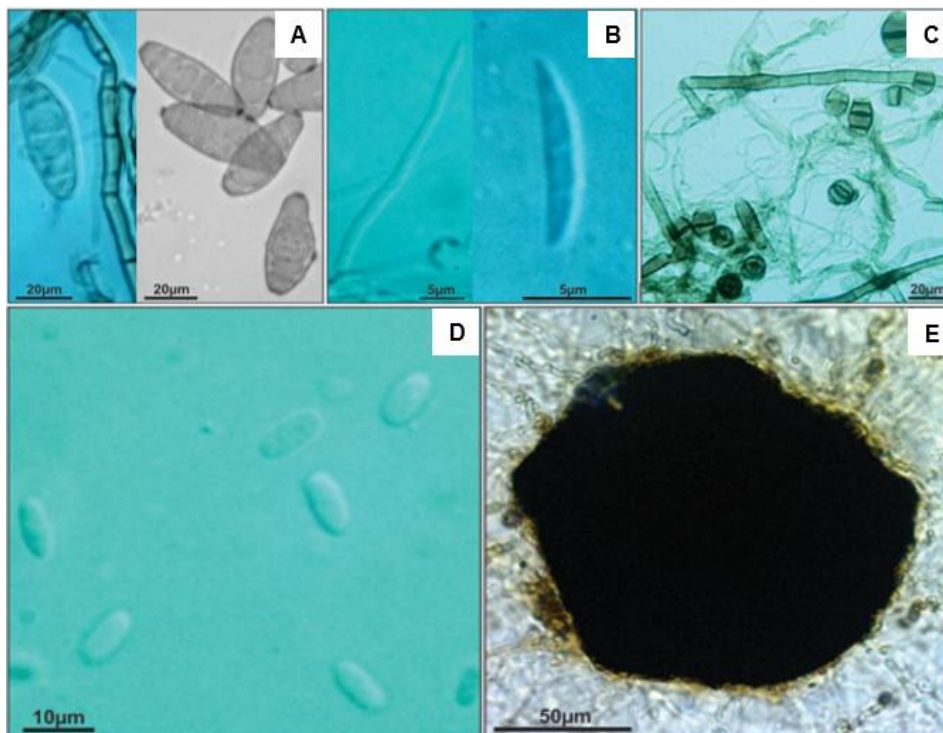


FIGURA 5. Características morfológicas de fungos detectados em sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”. A- Conídios de *Bipolaris micropus*; B- Monofiálide e macroconídio de *Fusarium incarnatum*; C- Conídios de *Curvularia geniculata*; D- Conídios de *Phoma herbarum*; E- Picnídio de *Phoma herbarum*.

4.3. Controle químico de fungos associados às sementes

4.3.1. Fungitoxicidade *in vitro*

Verificou-se o efeito significativo ($P < 0,05$) da interação tripla indicando que os três fatores (fungo, fungicida e concentração) estão interagindo ou são dependentes, com um dos fatores influenciando na ação dos outros dois (Tabela 7).

A concentração (C), fungicida (FG) e a interação $F \times FG$ foram as fontes de variação que mais influenciaram na expressão do crescimento micelial das colônias (maiores valores de quadrado médio), mostrando que existe diferença entre os isolados estudados, quanto à sensibilidade aos fungicidas testados (Tabela 7).

Como era esperado, os fungicidas apresentaram potenciais de inibição crescente em função do aumento da concentração do ingrediente ativo, diferindo estatisticamente da testemunha ($P < 0,05$), que apresentou o maior crescimento micelial em relação as diferentes concentrações (Tabela 8). Constata-se que o efeito dos fungicidas sobre o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos foi dependente das doses utilizadas, sendo que doses mais altas inibiram consideravelmente o crescimento micelial das colônias.

TABELA 7. Resumo da análise de variância para crescimento micelial (mm) *in vitro* de fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão” em função da concentração (ppm) de quatro fungicidas comerciais.

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio
		Diâmetro (mm)
Fungo (F)	3	5397,2638**
Fungicida (FG)	3	16875,6480**
Concentração (C)	5	76994,1228**
F x FG	9	7034,9195**
F x C	15	557,6021**
FG x C	15	1867,0371**
F x FG x C	45	579,3020**
Resíduo	864	13,5396
Total	959	-

**Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Analisando o crescimento micelial de *F. incarnatum*, observam-se diferenças ($P < 0,05$) na inibição das colônias em função dos fungicidas bem como para suas respectivas concentrações (Tabela 8). Na comparação entre fungicidas, observa-se que o tratamento com Carboxina + Tiram foi o mais eficiente na concentração de 1 ppm, diferindo dos demais tratamentos ($P < 0,05$), inibindo 75,08% do crescimento das colônias, em relação à testemunha. Na menor concentração dos demais fungicidas (1 ppm), não foi atingido 50% de inibição do crescimento micelial (Tabela 8). Com relação ao tratamento com Carbendazim + Tiram, houve um eficiente controle desse fungo quando foram aplicadas concentrações superiores a 2,5 ppm.

Com relação às espécies *P. herbarum*, *C. geniculata* e *B. micropus* constata-se que o tratamento com Metalaxil-M + Fludioxonil, nas concentrações de até 5 ppm já são suficientes para a inibição do crescimento micelial *in vitro* desses fungos (Tabela 8). Concentrações acima de 5 ppm, embora eficientes no controle destas espécies, podem ser consideradas dosagens excessivas e causar fitotoxicidade às sementes.

A maior eficácia de inibição de crescimento micelial em *P. herbarum*, foi na concentração de 1 ppm de Metalaxil + Fludioxonil (Tabela 8), inibindo 79,52% do crescimento das colônias. Para os demais fungicidas, houve inibição de 50% do crescimento micelial em relação ao controle somente na concentração de 5 ppm (Tabela 8). Em estudos envolvendo outras gramíneas, como a cana-de-açúcar, *P. herbarum* está entre as espécies de fungos mais comuns associadas às sementes (Martins et al., 2009). De acordo com estes autores, estudos devem ser realizados para se estabelecer tratamentos químicos a fim de diminuir a ocorrência de doenças e os índices de morte de plântulas no campo.

Para *C. geniculata*, o fungicida Metalaxil + Fludioxonil foi altamente eficaz, inibindo 90,07% do crescimento das colônias, com o uso da

concentração de 1 ppm (Tabela 8). Por outro lado, o fungicida Carbendazim + Tiram foi considerado o tratamento menos eficiente, sendo necessário 30 ppm para a inibição de 50% do crescimento micelial (Tabela 8).

A concentração de 1 ppm de Metalaxil + Fludioxonil foi capaz de inibir 89,44% do crescimento micelial de *B. micropus* em relação a testemunha (0 ppm). Para os fungos fitopatogênicos *P. herbarum*, *C. geniculata* e *B. micropus* verificou-se que Metalaxil-M + Fludioxonil foi significativamente ($P < 0,05$) mais eficiente na inibição do crescimento micelial em praticamente todas as concentrações avaliadas, à exceção das concentrações de 10 e 30 ppm, onde não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) em relação à Carboxina + Tiram (Tabela 8).

A DL_{50} corresponde à dose letal capaz de inibir 50% dos esporos viáveis de um fungo, sendo usualmente adotada como um padrão mais sensível de comparação da toxicidade de uma substância (Hassal, 2011).

Considerando o crescimento micelial avaliado por meio do diâmetro (mm) das colônias de *F. incarnatum*, a maior eficiência foi obtida com Carboxina + Tiram, apresentando uma DL_{50} de 0,0004 ppm (Figuras 6 e 7). A menor inibição do crescimento micelial foi observada com o uso de Metalaxil + Fludioxonil, com uma DL_{50} 2,8532 ppm. No entanto, os demais fungicidas testados inibiram o crescimento das colônias com doses inferiores a 1,5 ppm (Figuras 6 e 7). Efeito semelhante foi observado por Martins (2006), utilizando os fungicidas Carboxina + Tiram e Carbendazim + Tiram na inibição de três isolados de fungos do gênero *Fusarium*. No mesmo estudo, o fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil foi considerado altamente eficiente no controle de isolados de fungos do gênero *Fusarium*, porém com espécies diferentes da estudada no presente trabalho ($DL_{50} < 1$ ppm).

TABELA 8. Crescimento micelial (mm) *in vitro* de fungos fitopatogênicos associados às sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão” em função da concentração (ppm) de quatro fungicidas

Fungicida	<i>Fusarium incarnatum</i>					
	0 ppm	1 ppm	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm
	Médias (mm)*					
Carboxina + Tiram	65,4 aa-AB ¹	16,3 cb-C	12,1 db-B	5,6 bc-C	3,0 bcd-B	0,0 bd-B
Tiofanato-metilico	66,1 aa-A	39,8 ab-C	14,9 bc-C	6,3 bd-C	2,5 de-C	2,5 be-B
Carbendazim + Tiram	64,3 aa-B	32,7 bb-C	2,4 cc-D	0,0 cc-D	0,0 bc-D	0,0 bc-B
Metaxil + Fludioxonil	63,7 aa-B	37,0 ab-A	32,8 abc-A	30,0 ac-A	8,9 ad-A	7,8 ad-A
<i>Phoma herbarum</i>						
Fungicida	0 ppm	1 ppm	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm
Carboxina + Tiram	68,9 aa-A ¹	49,3 db-A	38,6 ac-A	32,3 ad-A	7,5 ce-A	0,0 bf-A
Tiofanato-metilico	67,6 aa-A	65,2 aa-A	42,0 ab-B	22,2 bc-B	23,0 ad-B	8,0 ae-B
Carbendazim + Tiram	68,2 aa-AB	62,1 ab-A	34,2 bc-C	23,3 bd-C	12,0 de-C	9,0 af-B
Metaxil + Fludioxonil	66,4 aa-AB	13,6 cb-B	9,8 cb-C	8,2 cc-B	8,0 bc-A	0,0 bd-B
<i>Curvularia geniculata</i>						
Fungicida	0 ppm	1 ppm	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm
Carboxina + Tiram	68,2 aa-AB ¹	23,3 cb-B	14,0 bc-B	11,3 cc-B	,5 bd-B	0,0 bd-B
Tiofanato-metilico	66,1 aa-A	57,8 bb-B	49,1 ac-A	42,5 bd-A	36,1 ae-A	16,5 af-A
Carbendazim + Tiram	69,3 aa-A	63,5 ab-A	52,5 ac-A	46,8 ad-A	37,5 ae-A	14,3 af-A
Metaxil + Fludioxonil	68,5 aa-A	6,8 db-C	7,2 cb-BC	0,0 dc-C	0,0 bc-B	0,0 bc-B
<i>Bipolaris micropus</i>						
Fungicida	0 ppm	1 ppm	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm
Carboxina + Tiram	64,4 aa-B ¹	18,7 db-C	15,3 cb-B	10,0 cc-B	1,5 cd-B	0,0 bd-B
Tiofanato-metilico	65,3 aa-A	59,6 ab-B	48,9 ac-A	41,6 ad-A	35,9 ae-A	15,3 af-A
Carbendazim + Tiram	64,3 aa-B	57,5 ab-B	40,9 bc-B	29,8 bd-B	18,2 de-B	14,9 af-A
Metaxil + Fludioxonil	62,5 aa-B	6,6 cb-C	5,2 db-C	0,0 dc-C	0,0 cc-B	0,0 bc-B

comerciais.

*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

¹Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas colunas (terceira letra maiúscula) não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os valores de DL_{50} de *P. herbarum* submetidos aos fungicidas testados variaram de 0,3752 a 4,7461 ppm, conforme as equações apresentadas nas Figuras 8 e 9. O Metalaxil + Fludioxonil foi o produto mais eficiente no controle do crescimento micelial de *P. herbarum* ($DL_{50} < 1$ ppm). Nas demais combinações (fungicida \times concentração), os valores de DL_{50} oscilaram entre 3,2993 (Carbendazim + Tiram), 3,5435 (Tiofanato-metílico) e 4,7461 (Carboxina + Tiram), necessitando mais de 3 ppm para inibir 50% do crescimento micelial (Figuras 8 e 9).

O menor valor de DL_{50} observado na combinação Metalaxil + Fludioxonil \times *C. geniculata*, foi de $< 0,0001$ ppm (Figuras 10 e 11). Carboxina + Tiram também foi eficaz no controle, apresentando uma $DL_{50} = 0,0181$ ppm. Os resultados demonstraram que a concentração de 10 ppm de Tiofanato-metílico e Carbendazim + Tiram não foi efetiva no controle de 50% de crescimento das colônias de *C. geniculata* (Figuras 10 e 11).

Caso semelhante ocorreu na inibição do crescimento micelial de *B. micropus* com uma DL_{50} inferior a 0,0001 ppm, com o uso de Metalaxil + Fludioxonil e 0,0074 ppm com Carboxina + Tiram (Figuras 12 e 13). Nos demais fungicidas houve uma variação na eficácia do tratamento, com uma DL_{50} de 4,3640 ppm para Carbendazim + Tiram e 11,358 ppm para Tiofanato-metílico (Figuras 12 e 13).

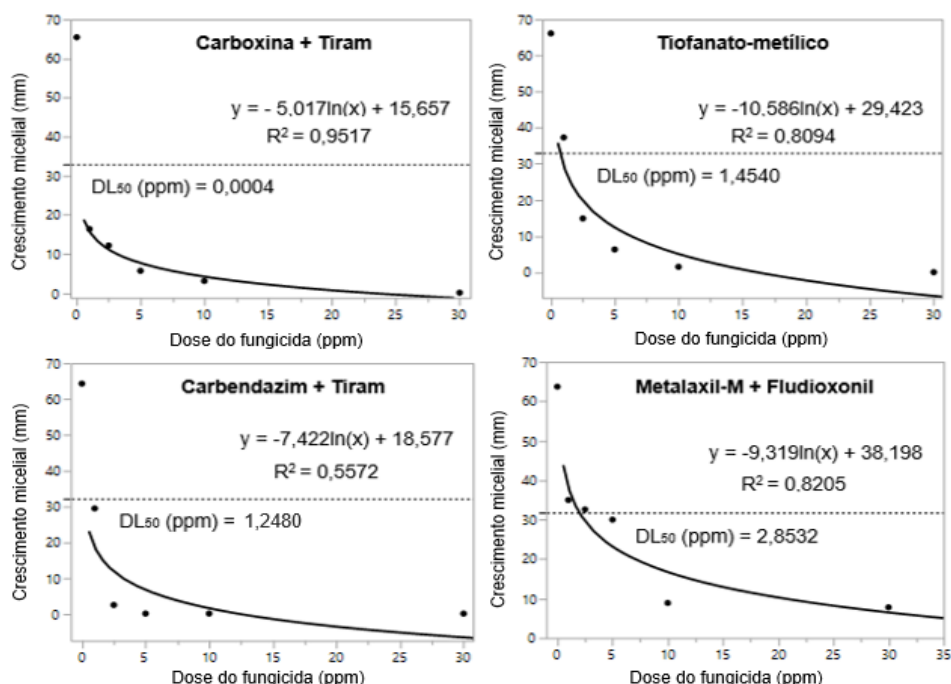
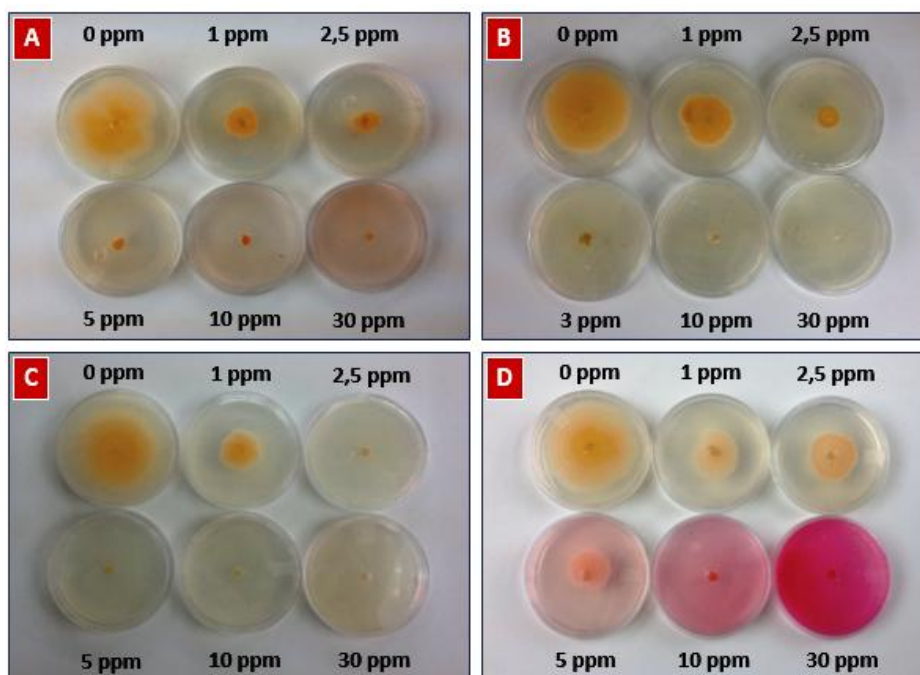


FIGURA 6. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL_{50}) o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium incarnatum*, em função de diferentes fungicidas.



**FIGUR
A 7.**

Cresci
mento
micelial
de
*Fusariu
m
incarnat
um* em
meio
BDA
contend
o cinco

concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D).

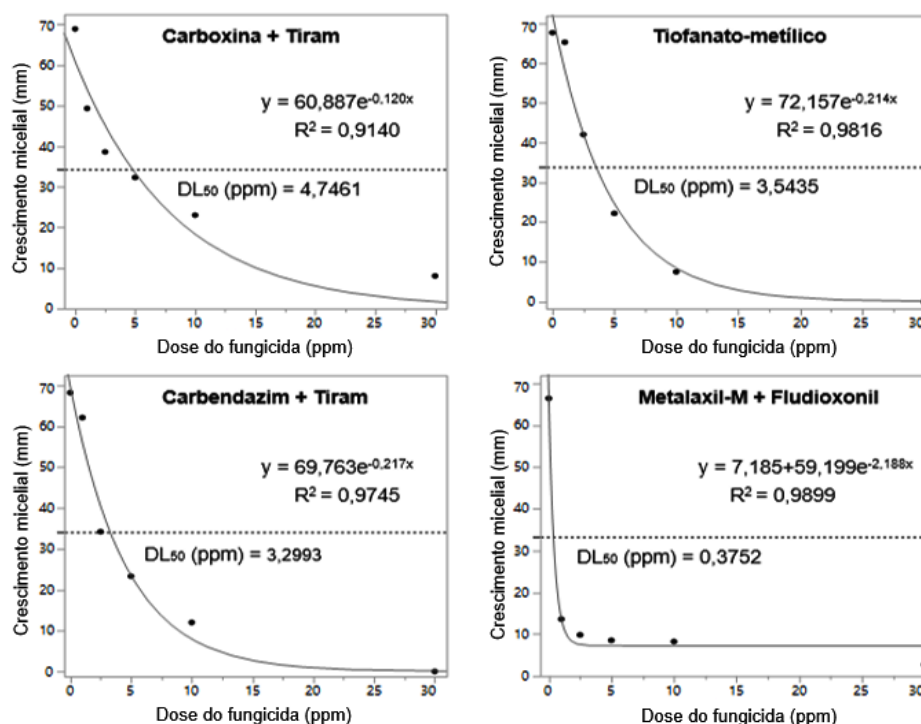


FIGURA 8. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Phoma herbarum*, em função de diferentes fungicidas.

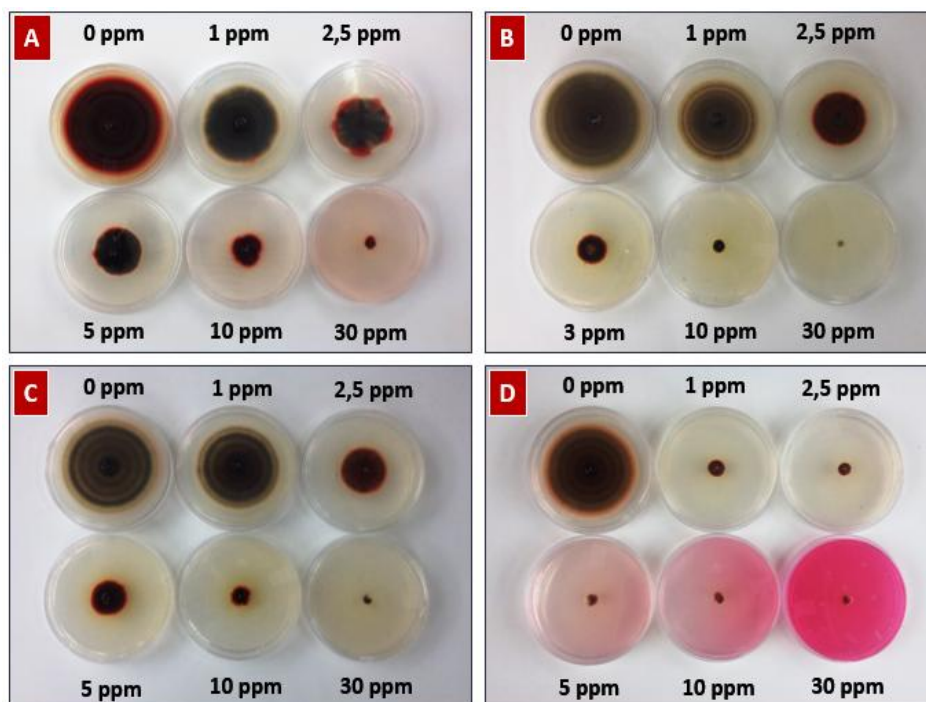


FIGURA 9. Crescimento micelial de *Phoma herbarum* em meio BDA contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D).

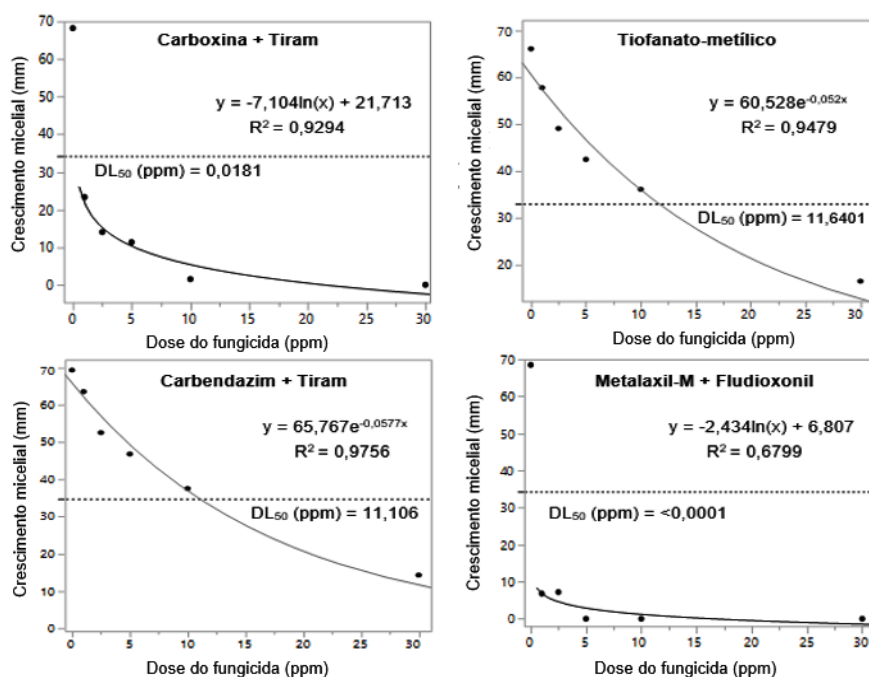
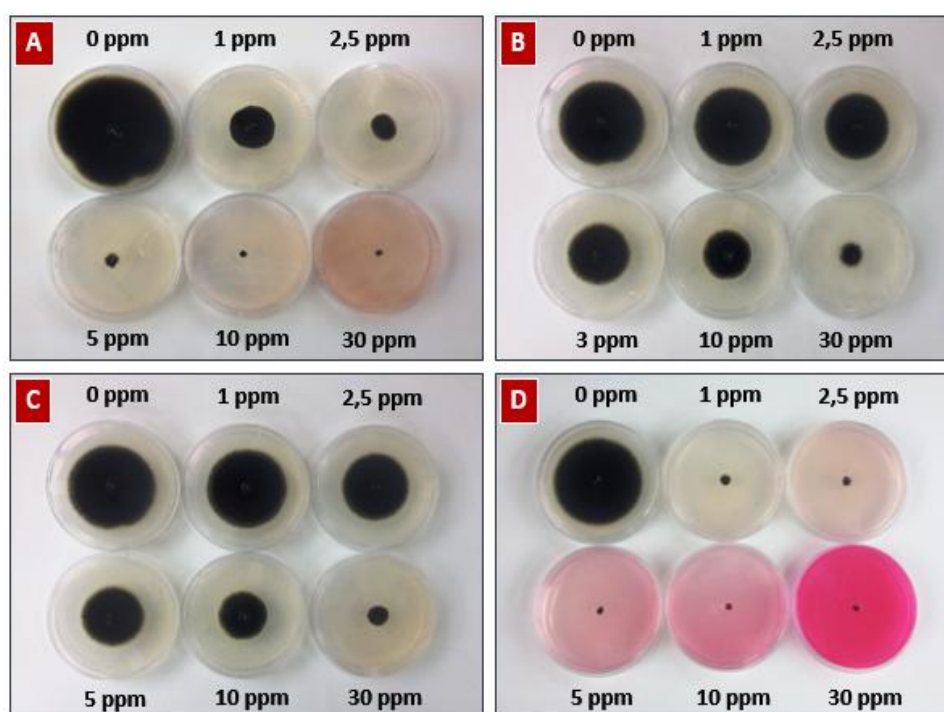


FIGURA 10. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL₅₀) o crescimento micelial *in vitro* de *Curvularia geniculata*, em função de diferentes fungicidas.

A eficiência apresentada pelo fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil, também foi observada por Martins (2006), onde o uso de concentrações inferiores a 1 ppm, foi capaz de inibir 50% do crescimento micelial de isolados de fungos dos gêneros *Phoma*, *Curvularia* e *Bipolaris*.

Tiofanato-metílico foi considerado o tratamento menos eficiente, uma vez que não anulou o crescimento micelial de nenhum dos patógenos avaliados, mesmo na maior concentração (30 ppm) (Tabela 8), com DL₅₀ de 1,4540 a 11,6401 ppm. O produto Tiofanato-metílico pertence ao grupo dos benzimidazóis, fungicidas sistêmicos conhecidos devido à eficácia no controle de importantes doenças. No entanto, o desenvolvimento de resistência de patógenos a fungicidas deste grupo tem sido relatado por pesquisadores (Batista et al., 2002; Rodrigues et al., 2007; Avozani et al., 2014).



**FIGU
RA
11.**

Cresci
mento
miceli
al de
*Curvul
aria
genicu
lata*
em
meio
BDA
conten
do
cinco

concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina + Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D).

No presente estudo, foram considerados apenas os fungicidas que apresentaram alta eficiência (DL₅₀ < 1 ppm) na inibição da maioria dos fungos avaliados. Portanto, em condições *in vitro*, destacaram-se os produtos a base de Carboxina + Tiram e Metalaxil-M + Fludioxonil, sendo selecionados para os ensaios de tratamento de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”.

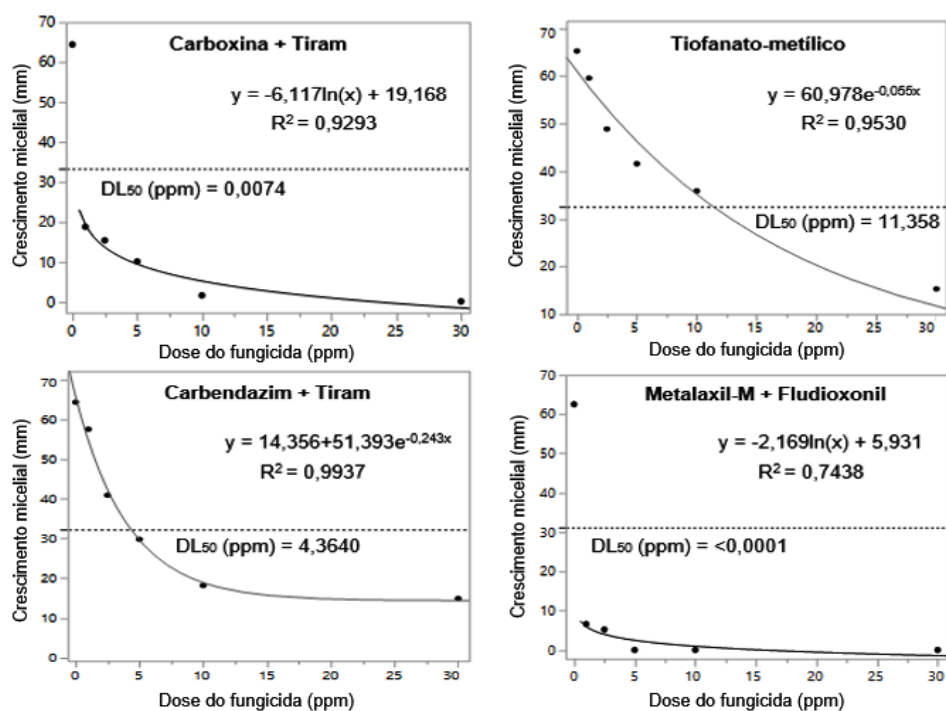


FIGURA 12. Concentração (ppm) capaz de inibir em 50% (DL_{50}) o crescimento micelial *in vitro* de *Bipolaris micropus*, em função de diferentes fungicidas.

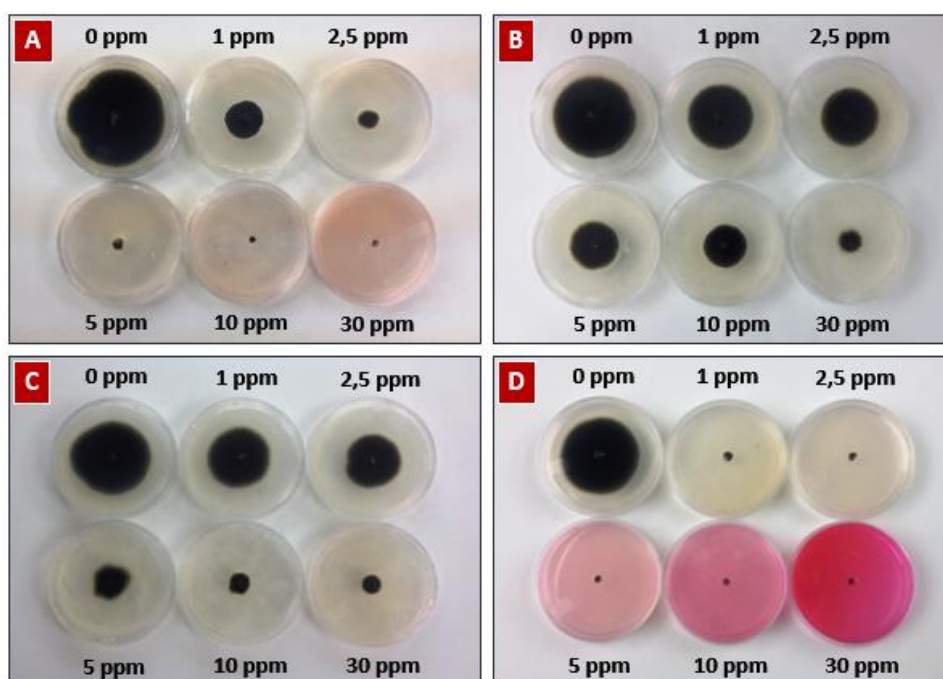


FIGURA 13. Crescimento micelial de *Bipolaris micropus* em meio BDA contendo cinco concentrações (ppm) dos fungicidas Carboxina +

Tiram (A), Tiofanato-metílico (B), Carbendazim + Tiram (C) e Metalaxil-M + Fludioxonil (D).

4.3.2. Tratamento de sementes com fungicidas

De acordo com os resultados do teste de sanidade (Tabela 9), observou-se que a aplicação dos fungicidas reduziu a incidência total de fungos, independentemente do tratamento. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os fungicidas em função do patógeno avaliado. Considerando a ocorrência dos patógenos presentes no tratamento testemunha destacou-se a espécie *B. micropus* (23,5%), seguido pelas espécies *P. herbarum* (14,3%), *C. geniculata* (13%) e *F. incarnatum* (5,5%).

TABELA 9. Incidência (%) de fungos fitopatogênicos em sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão” tratadas com fungicidas, avaliada pelo método de plaqueamento em meio BDA.

Tratamentos**	Dose (mL) p.c/100 kg de sementes	Fungos (%)*			
		<i>Bipolaris micropus</i>	<i>Curvularia geniculata</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Phoma herbarum</i>
Testemunha	-0-	23,5 a	13,0 a	5,5 a	14,3 a
CT	300	1,5 b	0,0 b	0,0 b	0,5 b
MF	300	0,0 b	1,0 b	1,0 b	0,5 b
CT + MF	150 + 150	1,0 b	1,5 b	0,5 b	1,0 b

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

** Testemunha; Carboxina + Tiram (CT); Metalaxil-M + Fludioxonil (MF); Mistura de Carboxina + Tiram (CT) e Metalaxil-M + Fludioxonil (MF).

A eficiência dos fungicidas Carboxina + Tiram e Metalaxil-M + Fludioxonil na redução e/ou erradicação de fungos, sejam eles patogênicos ou não, foi comprovada por vários pesquisadores em diversas espécies (Lasca et al., 2001; Lasca et al., 2004; Pinto, 2004; Migliorini, 2012). Segundo Goulart (1998), o uso combinado de fungicidas de amplo espectro de ação tem sido uma das estratégias mais eficazes no controle de inúmeros patógenos associados às sementes.

Com relação aos dados da Tabela 10, observou-se que para o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG) e o índice de velocidade de germinação (IVG), os tratamentos com fungicida apresentaram desempenho superior à testemunha. Essa redução na germinação e no vigor das sementes oriundas do tratamento sem fungicidas, provavelmente é consequência da elevada incidência de fungos presentes nessas sementes (Tabela 9). Verificou-se também que a aplicação dos fungicidas nas sementes, independente do tratamento avaliado, resultou em menores percentuais de plântulas anormais e sementes mortas, diferindo significativamente ($P < 0,05$) em relação à testemunha.

A aplicação dos fungicidas propiciaram acréscimos na germinação das sementes acima de 20 pontos percentuais e na PCG, em torno de 17 pontos percentuais em relação à testemunha (Tabela 10).

TABELA 10. Germinação (G), plântulas anormais (PA), sementes mortas (SM), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão” submetidas a tratamento com fungicidas, sob condições de laboratório.

Tratamentos **	Dose (mL p.c/100 kg de sementes	G	PA ***	SM ***	PCG	IVG
Testemunha	-0-	78 b	15,3 a	6,5 a	57 b	15,1 b
CT	300	96 a	0,0 b	0,0 b	68 a	19,3 a
MF	300	95 a	0,5 b	0,5 b	67 a	18,4 a
CT + MF	150 + 150	96 a	0,0 b	0,5 b	66 a	18,3 a
CV (%)	-0-	2,7	10,1	2,8	9,8	8,2

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

** Testemunha; Carboxina + Tiram (CT); Metalaxil-M + Fludioxonil (MF); Mistura de Carboxina + Tiram (CT) e Metalaxil-M + Fludioxonil (MF).

*** Plântulas anormais e sementes mortas, infectadas ou muito deterioradas pela ação de fungos fitopatogênicos.

O efeito do tratamento químico de sementes na maior velocidade de germinação é enfatizado por vários pesquisadores (Martin-Corder & Melo, 1997; Cassiolato et al., 1998; Faria et al., 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aqueles relatados por outros pesquisadores. Machado (2000) referiu o efeito positivo do fungicida Carboxina + Tiram no aumento da porcentagem de germinação, na velocidade de emergência e na maior sanidade das plântulas. Bittencourt et al. (2007), avaliando sementes de amendoim, verificaram que o principal efeito benéfico do tratamento das sementes com o Carboxina + Tiram é a redução significativa de sementes mortas e/ou da ocorrência de “damping-off” de pré-emergência. Para Migliorini (2012), o tratamento químico com Carboxina + Tiram e Metalaxil-m + Fludioxonil resultou em aumento da porcentagem de germinação de sementes de canola. Schuch et al. (2006) constataram que o tratamento de sementes com o fungicida Carboxina + Tiram resultou em aumento da porcentagem de germinação de sementes de arroz.

Comparando-se os resultados obtidos para a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, observou-se que, em geral, maiores índices de germinação e vigor foram obtidos nas sementes tratadas, indicando que a condição sanitária das mesmas interfere indiretamente nos referidos padrões. Carvalho et al. (1999) sugerem que sementes predispostas à ação de patógenos, quando tratadas, reduzem a capacidade de sobrevivência dos

fitopatógenos e potencializam a longevidade das sementes, poder germinativo e o vigor das futuras plantas.

A Figura 14 ilustra as afirmações relatadas anteriormente de que o tratamento das sementes com fungicidas resultou em plântulas mais saudias e vigorosas (14-A) e elevados percentuais de plântulas anormais e sementes mortas, constatados na testemunha não tratada (Figura 14-B e C).

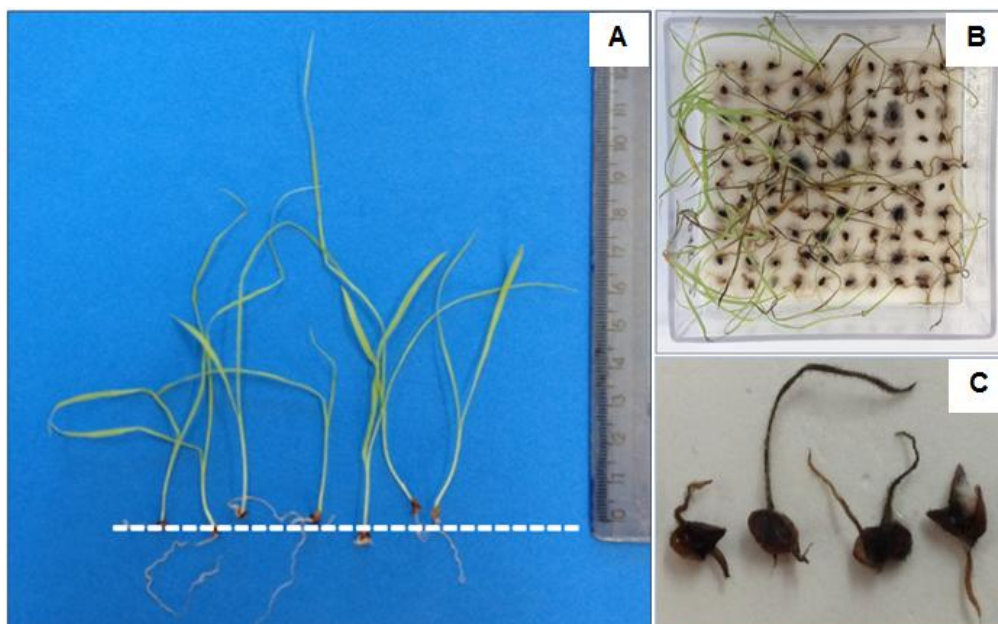


FIGURA 14. Resultados do teste de germinação com sementes de *Paspalum guenoarum* ecótipo “Azulão”, 21 dias após o início do teste. A- Plântulas saudias e vigorosas obtidas após o tratamento das sementes com fungicidas. B e C- Plântulas anormais e sementes mortas, infectadas ou muito deterioradas pela ação de fungos fitopatogênicos.

Com base nos resultados obtidos em laboratório, observa-se que o tratamento de sementes, uma vez realizado com produtos adequados, é capaz de promover alterações positivas nos padrões de germinação e vigor. Contudo, estas alterações são provocadas pelo efeito indireto do controle de fungos associados às sementes.

As avaliações realizadas, de maneira geral, reafirmaram a eficiência dos fungicidas sobre a qualidade sanitária e fisiológica das sementes, propiciando informações de grande utilidade no controle de qualidade das sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão”. Sugere-se estudos mais aprofundados dos efeitos do tratamento de sementes dessa espécie visando a obtenção de uma emergência rápida e uniforme a campo, aumento na produção de sementes, bem como, garantia do pleno desempenho das mesmas, fazendo com que a densidade desejada de semeadura seja alcançada. A presença de patógenos em lotes de sementes pode não só

comprometer a semeadura no ano em que esses lotes estão sendo utilizados, como também futuros cultivos de outras espécies de plantas.

5. CONCLUSÕES

As espécies de fungos fitopatogênicos mais frequentes nos lotes de sementes de *P. guenoarum* ecótipo “Azulão” são *Bipolaris micropus*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium incarnatum* e *Phoma herbarum*.

Em condições in vitro, o fungicida Carboxina + Tiram inibe com alta eficácia (DL50 < 1 ppm) o crescimento micelial dos fungos *F. incarnatum*, *C. geniculata* e *B. micropus*, ao passo que Metalaxil + Fludioxonil inibe com alta eficácia os fungos *P. herbarum*, *C. geniculata* e *B. micropus*.

O tratamento químico com os fungicidas Carboxina + Tiram, Metalaxil-M + Fludioxonil e a combinação de ambos os produtos nas sementes de *P. guenoarum* é eficiente no controle de *B. micropus*, *C. geniculata*, *F. incarnatum* e *P. herbarum* e promove melhor desempenho fisiológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. R.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. Antagonismo a fungos associados às sementes de *Paspalum notatum* Flügge por trichoderma. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 197, 2013.

ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987. 339 il. (EMBRAPACENARGEN, Documentos, 8).

ALMEIDA, M. F.; REIS, E. M. Comparação da sensibilidade de métodos para a detecção de fungos patogênicos em sementes de aveia branca e preta no Rio Grande do Sul. **Tropical Plant Pathology**, 34 (4) July - August 2009.

ANJOS, J. R. N., CHARCHAR, M. J. A., TEIXEIRA, R. N.; ANJOS, S. S. N. Ocorrência de *Bipolaris maydis* Causando Mancha Foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. **Fitopatologia brasileira** 29(6), nov - dez 2004.

AQUINO, C. F.; ARAUJO, A. V.; FERREIRA, I. C. P. V.; SALES, N. P. L.; COSTA, C. A.; BRANDÃO, J; Qualidade sanitária de sementes de genótipos de grão-de-bico cultivados em Montes Claros-MG. **Fitopatologia brasileira**, Lavras, v. 34, suplemento, 2009.

AVOZANI, A.; REIS, E.M.; TONIN, R.B. Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide carbendazim. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 40, n. 3, p. 273-276, 2014.

BALARDIN, R. S.; LOCH, L. C. Efeito de thiram sobre a germinação de sementes de centeio e aveia. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 9, n. 1, p. 113-117, 1987.

BARCELLOS, J. O. J.; PRATES, E. R.; SILVA, M. D.; MONTANHOLI, Y. R. & WUNSCH, C. Sistemas pecuários no sul do Brasil – “zona campos”: tecnologias e perspectivas. **Memorias**, XIX Reunión de Grupo Técnico en Forrajas del Cono Sur – Zona Campos. Sistemas de producción: caminos para una integración sustentable. Mercedes, Argentina. 2002. pp. 10-15.

BARÉA, K.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M. et al. Manejo de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro. 1. Produção, composição química e persistência. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.992-999, 2007.

BARRETO, I. L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258f. Dissertação (Livre-Docência – Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BATISTA, L.A.R.; GODOY, R. Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.5, p.841-847, 1998.

BATISTA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.A.; TAVARES, S.E.E.H.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.A.F.; SILVA, R.L.X. Efeitos de fungicidas sobre o crescimento in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *passijlorae* e a interferência com *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 4, p. 305-308, 2002.

BEVILAQUA, G. A. P.; PIEROBOM, C. R. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) da zona sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 17, no 1, p. 19-22, 1995.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. Plenum Press, New York and London. 448 p.

BITTENCOURT, S. R. M.; MENTEN, J. O. M.; ARAKI, C. A. S.; MORAES, M. H. D.; RUGAI, A. R.; DIEGUEZ, M. J.; VIEIRA, R. D. Eficiência do fungicida carboxin + thiram no tratamento de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.2, p.214-222, 2007.

BOLDRINI, I.; LONGHI-WAGNER, H. & BOECHAT, S. **Morfologia e Taxonomia de Gramíneas Sul-RioGrandenses**. Editora UFRGS, Porto Alegre. 87p. 2008.

BOTELHO, L. S.; GRANDIS, A.; NASCIMENTO, W. M. O.; MORAES, M. H. D. DE; MENTEN, J. O. .M. Incidência de fungos associados às sementes de espécies florestais nativas da Amazônia. . In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 8, 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos...** João Pessoa, 2004, p.196.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 30, de 21 de maio de 2008**. Estabelece normas e padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical, com validade em todo o Território Nacional. Brasília, 21 maio de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: SDA/CGAL, 2009b. 202p.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: **Wiley & Sons**. 1990. 532p.

CARVALHO, R. A. et al. Effect of plants with antibiotic properties on the control of *Fusarium sp.* In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 2, 1999, Jerusalém. **Anais**. Jerusalém, 1999.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CASSIOLATO, A. M. R.; BAKER, R.; MELO, I. S. Promoção de crescimento de plantas de alface por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura**, v.71, n.1, p.55-65, 1998.

CASTELLANI, E. D.; SILVA, A.; MODESTO, B.; AGUIAR, I. B. Influência do tratamento químico de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var. Variegata. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.18,n.1, p.41-44. 1996.

CIDADE, F. W. et al. Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. **BioMed Central**, Londres, v.14, 2013.

CHASE, A. 1929. The north American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, 28(1):1-30.

CHEN, C. A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in *Scleractinian Corals*. **Zoological Studies**, Taipei, v. 43, n. 4, p. 759-771, June 2004.

COOK, R. J. *Fusarium* diseases of wheat and other small grains in North America. In: Nelson PE, Toussoun, TA, Cook R. J. (Eds.) **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. University Park. The Pennsylvania State University Press. pp. 39-52. 1985.

COSTA, D.I.; SCHEFFER-BASSO, S.M. **Caracterização morfo-fisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro e Festuca arundinacea Schreb.** 1. Desenvolvimento morfológico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.5, p.1054-1060, 2003.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2, p. 427-452, 1973.

DIAS, D. C. F. S.; TOLEDO, F. F. Germinação e incidência de fungos em testes com sementes de *Brachiaria brizantha* Stapf. **Scientia Agricola**, v.50, n.1, p.68-73, 1993.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; NETO, D. C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p.121-127, 2003.

FERNANDES, C. D.; MARCHI, C. E.; JERBA, V. F.; BORGES, M. F. Patógenos associados às sementes de forrageiras tropicais e estratégias de controle. In: Zambolim, L. **Sementes, qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p.183 -213.

FERRAZ, I. D. K.; CALVI, D. P. **Teste de Germinação**. In: LIMA JUNIOR, M. J. V. (Ed.). Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais. Manaus: UFAM, 2010. p. 55-110.

FUNGARO, M. H. P. **PCR na Micologia**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.14, p. 12-16, 2000.

FRARE, Vanessa Cristina. **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2006. doi:10.11606/D.11.2006.tde-22022006-145257. Acesso em: 2016-11-27.

FREIRE, F. C. O; Doenças atuais e potenciais das principais frutíferas e flores ornamentais do nordeste. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza - Ceará, **Fitopatologia brasileira**, Lavras, v.31, suplemento, p. 38-44, 2006.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p. 648-658, July 2001.

GOTARDO, M. **Tratamento fungicida e avaliação do vigor de sementes de girassol**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2003.

GOUD, J. C.; TERMORSHUIZEN A. J. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, n. 6, p. 523-534, 2003.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste. **Algodão: informações técnicas**. Dourados, 1998. p.71-84. (EMBRAPA. CPAO. Circular Técnica, 7).

GOULART, A. C. P. **Influência do grafite adicionado às sementes de soja e algodão na eficiência do tratamento com fungicidas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2000. 27p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de Pesquisa, 8).

GUERRA, J. I.; COSTA, M. L. N. Avaliação do manejo de doenças em *Brachiaria brizantha* cv BRS Piatã.. In: 3º EPEX - Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão - Educação Científica: Inovações Científicas e

Desenvolvimento Regional, 2012, Dourados - MS. **Anais** do 3º EPEX - Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão - Educação Científica: Inovações Científicas e Desenvolvimento Regional, 2012.

GUIMARÃES, L. R. A.; MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; JERBA, V. F.; BUENO, M. L.; TRENTIN, R. A.; FABRIS, L. R. Fungos associados às sementes comerciais de braquiária. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 2., 2006, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. p. 1-2.

HASSALL, K. A. **The Biochemistry of Pesticides** – Structure, Metabolism, Mode of action and Uses in Crop Protection. Ed. 2. New York: VCH Publishers, 1990, 536p.

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

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 509-547, Mar. 2007.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. **International rules for seed testing.** In: Chapter 5: The Germination Test. Basesrdorf: ISTA, 2009. 29 p.

ITO, M. F.; TANAKA, M. A. de S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides.** Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 1-2.

KAPOOR, N.; ARYA, A.; SIDDIQUI, A.; KUMAR, H.; AMIR, A. Physiological and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice (*Oryza sativa*). **American Journal of plant Physiology**, v.6, n.1, p. 28-35, 2011. <http://dx.doi.org/10.3923/ajpp.28.35>.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O. M. R. **Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e semente.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Fungos/index.htm>. Acesso em: 24 julho 2016.

LASCA, C.C.; KRUPPA, P.C.; BARROS, B.C.; SCHIMDT, J.R.; CHIBA, S. Controle de *Pyricularia grisea* e *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo mediante tratamento com fungicidas. **Arquivo instituto biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.55-63, 2001.

LASCA, C. C.; VECHIATO, M. H.; KOHARA, E. Y. Controle de fungos de sementes de *Brachiaria* spp.: eficiência de fungicidas e influência do período de armazenamento de sementes tratadas sobre a ação desses produtos. **Arquivo instituto biológico**, v.71, n.4, p.465- 472, 2004.

LIU, Y. J., WHELEN, S. H. B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular biology and evolution**, 16:1799-1808, 1999.

LOPES, R. R.; FRANKE, L. B. Produção de sementes de quatro ecótipos de *Paspalum* nativos do Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de zootecnia**, v.40, n.1, p.20-30, 2011.

LOPES, R. R.; OST, H. J.; SOUZA, C. H. L.; FRANKE, L. B. Management of consecutive cuts in the production and quality of wintergreen *Paspalum* seeds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.45, n.10, p.587-595, 2016.

LUCCA-FILHO, O. A.; PORTO, M. D. M.; MAIA, M. S. Fungos em sementes de azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam.) e seus efeitos no estabelecimento da pastagem. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 21, nº 2, p.142-147, 1999.

LUCCA-FILHO, O. A. Patologia de Sementes. In: Peske, S.T., Tosenthal, M.D. & Rota, G.R. (Eds.) **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. Ed. Universitária. 2003. pp. 225-282.

LUCCA FILHO, O. A. Patologia de sementes. In: PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 2 ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2006. p. 259- 330.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: Editora UFLA, 2000, 138 p.

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

MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B.G.; VOS, P.; OLIVER, R.P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, v.100, p.1107-1111, 1996.

MALLMANN, G.; VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D.; SANTOS, J. M.; VECHIATO, M. H.; Inácio, C. A.; Batista, M. V.; Queiroz, C. A. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.3, p.201-203, 2013.

MANAMGODA, D.S., CAI, L., MCKENZIE, E. H. C. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. **Fungal Diversity**. 2012; 56:131–144.

MANTOVANELLI, M.C.H.; VIEIRA, C.P.; BARRETO, M. Incidência de fungos em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) e seu efeito na germinação e vigor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7, Campo Grande, 1991. **Resumos de trabalhos técnicos**. Campo Grande, 1991.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008. **Instrução normativa no 30**. Normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical. Available at: <<http://www.mapa.gov.br>>. Accessed on: Nov. 10, 2016.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; BUENO, M. L.; BATISTA, M. V.; FABRIS, L. R. Microflora fúngica de sementes comerciais de *Panicum maximum* e *Stylosanthes* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 575-584, jul./set. 2010.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.1-24.

MARTINS, T. D. **Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle**. 2006. 102 p. : il. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

MARTINS, T.D.; MENTEN, J.O.M.; SANGUINO, A. Fungos associados às sementes (Cariopses) de cana-de-açúcar: métodos para detecção, incidência e relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 173-178, 2009.

MARTIN-CORDER, M. P. P.; MELO, I. S. Influência de *Trichoderma viride* e *T. koningii* na emergência de plântulas e no vigor de mudas de berinjela. **Revista Brasileira de Biologia**, v.57, n.1, p.39-45, 1997.

MEDINA, P. F.; TANAKA, M. A. S.; PARISI, J. J. D. Sobrevivência de fungos associados ao potencial fisiológico de sementes de triticales (*X. triticosecale* Wittmack) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 17-26, 2009.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, jan./fev., 2010.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. 321p.

MENTEN, J. O.; MORAES, M.H.D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Informativo ABRATES**, v.20, n.3, p.52-71, 2010. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/images/stories/informativos/v20n3/minicurso03.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976.

MOTTA, E. A. M. **Avaliação de caracteres agrônômicos em híbridos interespecíficos do gênero *Paspalum***. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MUNHOZ, R. E. F.; ZONETTI, P. C.; ROMAN, S. Superação da dormência em sementes e desenvolvimento inicial em *Brachiaria brizantha* cv. MG5 através da escarificação com ácido sulfúrico. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.2, p. 2:55-67, 2009.

MICHALSKI, M. V.; CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, J. R. N.; FERNANDES, F. D.; SILVA, M. S.; SILVA, W. A. M. Transmissão de fungos de sementes para plântulas de *Panicum maximum*. In: ENCONTRO DE JOVENS TALENTOS DA EMBRAPA CERRADOS, 3., Planaltina, 2007. **Resumos...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. p. 35. (Documentos Embrapa Cerrados, 176).

MIGLIORINI, P. Efeito do tratamento químico e biológico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de canola. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15: 788- 801, 2012.

NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 3. Porto Alegre, 2008. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS. p.7-54. 2008.

NABINGER, C., FERREIRA, E. T., FREITAS, A. K. et al. Produção animal com base no campo nativo: aplicações de resultados de pesquisa. In: PILLAR, V. D. P.; MÜLLER, S. C., et 82 al (Ed.). **Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, cap. 13, p.175-198. 2009.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2. ed. London: Macmillan, 1979.

O'DONNELL, K.; GRAY, L. E. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, p.709-716. 1995.

O'DONNELL K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. D. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K.; SARVER, B.; BRANDT, M.; CHANG, D. C.; NOBLE-WANG, J.; PARK, B. J.; SUTTON, D. A.; BENJAMIN, L.; LINDSLEY, M.; PADHYE, A.; GEISER, D. M.; WARD, T. J. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, 45:2235-2248, 2007.

OLIVEIRA, R. C. **Revisão Taxonômica: espécies brasileiras de *Paspalum* L. Grupo Lineraria (Gramineae – Paniceae)** [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1995.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, J. B.; DAPONT, E. C.; SOUZA, L. M. S.; RIBEIRO, S. A. L. Métodos para detecção de fungos e assepsia de *Schizolobium amazonicum* (Caesalpinioideae). **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 945-953, Nov./Dec. 2012

OST, H. J. **Componentes do rendimento e qualidade de sementes de *Paspalum guenoarum* Arech. Ecótipo "Azulão" submetido a diferentes regimes de cortes.** 2013. 74 p.: il. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

OTEGUI, M. B.; PÉREZ, M. A.; MAIA, M. S. Efecto de la temperatura y la luz en la germinación de semillas de *Paspalum guenoarum*. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, n. 1, p.190-194, 2005.

PAIM, N.R. & NABINGER, C. Comparação entre duas formas de *Paspalum guenoarum* Arech. **Agron. sulriogr.**, 18(2):103-14, 1982.

PEDROSO, D. C. **Associação de *Alternaria* spp. com sementes de apiáceas: métodos de inoculação e influência na qualidade fisiológica.** 2009. 118 f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; ROSA, M. C. M.; KIKUTI, A. L. P. Armazenamento de sementes de braquiária peletizadas e tratadas com fungicida e inseticida. **Ciência rural**, Santa Maria, v.41, n.12, p.2060-2065, dez. 2011.

PEREIRA, E. A.; BARROS, T.; VOLKMANN, G. K.; BATTISTI¹ G. K.; SILVA, J. A. G.; SIMIONI, C.; DALL'AGNOL, M. Variabilidade genética de caracteres forrageiros em *Paspalum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.10, p.1533-1540, out. 2012.

PEREIRA, E. A.; DALL'AGNOL, M.; SIMIONI, C.; MACHADO, J. M.; BITENCOURT, M. G. S.; GUERRA, D.; ARENHARDT, E. G.; SILVA, J. A. G. Agronomic performance and interspecific hybrids selection of the genus *Paspalum*. **Científica**, Jaboticabal, v.43, n.4, p.388-395, 2015.

PIZARRO, E.A. Potencial forrajero del género *Paspalum*. **Pastura Tropicales**, v.22, n.1, p.38-45, 2000.

PINTO, J. C.; NABINGER, C.; MARASCHIN, G. E. Determinação da época de colheita das sementes de *Paspalum guenoarum* Arech. F. Azulão. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 61-66, 1984.

PINTO, N.F.J.A. Avaliação da eficiência dos fungicidas fludioxonil + metalaxyl-M no tratamento de sementes de sorgo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.2, p.450-453, 2004.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, DF: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior/ Ministério da Educação e Cultura (ABEAS/MEC), 1985. 289p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: Vieira, N. R. de A. A.; Santos, A.B. dos & Sant'ana, E.P. (Ed.) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.262-307.

PRATES, E. R. **Efeito de doses de nitrogênio e de intervalos entre cortes sobre a produção de dois biótipos de *Paspalum notatum* Flüegge e da cultivar Pensacola *Paspalum notatum* Flüegge var. Saurae**. 1970. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1970.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE (9. : 2015 : Passo Fundo, RS). Informações técnicas para trigo e triticales – safra 2016 / IX Reunião da comissão brasileira de pesquisa de trigo e triticales ; Gilberto Rocca da Cunha, Eduardo Caierão e André Cunha Rosa, editores técnicos. – Passo Fundo, RS : Biotrigo Genética, 2016. 228 p.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 323- 327, 2007.

RUSSOMANO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; CALIL, E. M. B. **Doenças das pastagens**. In: ALMEIDA, J. E. M. de; BATISTA FILHO, A.; COSTA, V. A.; LEITE, L. G.; RAMIRO, Z. A.; RUSSOMANO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; CALIL, E. M. B. Manejo integrado de pragas e doenças das pastagens. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2000. 50 p. (Manual Técnico. Série Especial, 2).

SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.37-67, 1995.

SANTOS, F. C. **Escarificação, tratamento químico, revestimento e armazenamento de sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu**. 2009. 60pf. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras –MG, 2009.

SANTOS, G. R.; TSCHOEKE, P. H.; SILVA, L. G.; SILVEIRA, M. C. A. C.; REIS, H. B.; BRITO, D. R.; CARLOS, D. S. Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. **Journal of Seed Science**, v.36, n.1, p.054-062, 2014.

SAWASATO, J. T. **Caracterização agrônômica e molecular de *Paspalum urvillei* Steudel**. . 205 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SCHAFER, M. & KOTANEN, P. M. The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi. **Acta Oecologica** 24:255-263. 2003.

SCHUCH, U. Z.; FILHO, O. A. L.; PESKE, S. T. P.; DUTRA, L. M. C.; BRANÇÃO, M. F.; ROSENTHAL, M. D. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz com diferentes graus de umidade e tratadas com fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.45-53, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n1/a07v28n1.pdf>

SHI, F.; HSIANG, T. *Pseudonectria buxi* causing leaf and stem blight on *Buxus* in Canada. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 763–773, 2014.

SILVA, R. T. V.; HOMECHIN, M.; ENDO, R. M.; FONSECA, I. C.B. Efeito do tratamento de sementes e da profundidade de semeadura no desenvolvimento de plantas de aveia-branca (*Avena sativa* L.) e a microflora da rizosfera e do rizoplano. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol.24 no.1, 2002.

SILVA, G. M.; MAIA, M. S.; MORAES, C. O. C.; MEDEIROS, R. B.; SILVA, C. S. & PEREIRA, D.D. Fungos associados a sementes de cevadilha vacariana (*Bromus auleticus*) coletadas nas plantas e no solo. **Fitopatologia Brasileira**, 32:353-357. 2007.

SILVA, A. E. L.; REIS, E. M.; TONIN, R. F. B.; DANELLI, A. L. D.; AVOZANI, A. Identificação e quantificação de fungos associados a sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). **Summa Phytopathologica**, v.40, n.2, p.156-162, 2014.

SILVA-LOBO, V. L, UTUMI, M. M, PEIXOTO, O. M, CASTRO e BRITO A. M, incidência de fungos causadores de mancha de grãos em arroz produzidos nos

estados de Goiás, Mato grosso e Rondônia. **Fitopatologia brasileira**, Lavras, v. 31, suplemento, 2006.

SOMAI, B. M.; DEAN, R. A.; FARNHAM, M. W.; ZITTER, T. A.; KEINATH, A. Internal transcribed spacer regions 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of *Didymella bryoniae* and related *Phoma* species isolated from cucurbits. **Phytopathology**, v.92, p.997-1004, 2002.

SOSTER, M. T. B. **Caracterização morfológica e citogenética de acessos de *Paspalum* coletados no sul do Brasil**. 2009. 89 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

STEINER, M. G. **Caracterização agronômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* e *Paspalum guenoarum* Arech**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 719 p.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. Influência de *Colletotrichum gossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1997.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CESAR, M. L.; SARATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p. 124-133, 2009.

VALLS, J. F. M. Gramíneas nativas e sua importância forrageira. In: Valls JFM. **Plantas Forrageiras**. Brasília: EMBRAPA/DID (EMBRAPA/ CENARGEN, Documento 1); 1980.

VALLS, J. F. M. Origem do germoplasma de *Paspalum* disponível no Brasil para a área tropical. In: RED INTERNACIONAL DE EVALUACIÓN DE PASTOS TROPICAIS, 1992, Brasília, DF. (Documento de trabajo no. 117). Cali: Ciat, 1992. p. 69-80.

VECHIATO, M. H.; CASTRO, J. L.; ISHIMURA, I.; SABINO, J. C.; MENTEN, J. O. M. Antracnose do feijoeiro: correlação entre severidade em vagens e a incidência do patógeno nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 2, p. 159-163, 1997.

VECHIATO, M. H. **Sanidade de gramíneas forrageiras**. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 8., 2004, João Pessoa. Anais. Londrina: Abrates, 2004. p.55-57.

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C.; FERNANDES, C. D. Frequência de fungos em lotes de sementes comercializadas de *Brachiaria* e *Panicum*. Documento Técnico, n.4. 2010. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/dt/DT_07_2010.pdf> Accessed on: Mar. 15th. 2016.

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C. **Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção**. 2008. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=89. Acesso em 24 de dezembro de 2016.

WELLES, C. G. Taxonomic studies on the genus *Cercospora* in the Philippine Islands. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 12, p. 195-218, 1933.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Genetics and Evolution**, p. 315-322, 1990.

VITA

Bruno Frosi Gasparetto, filho de João Carlos Gasparetto e Aneli Frosi Gasparetto, nasceu em 14 de abril de 1989, em Nova Prata, RS. Estudou no Colégio estadual Tiradentes, em Nova Prata, RS, onde concluiu o Ensino Fundamental em dezembro de 2003 e o Ensino Médio em dezembro de 2006. Em fevereiro de 2007, ingressou no curso de Agronomia da Universidade de Passo Fundo (UPF), onde permaneceu até dezembro de 2008. Em março de 2009, ingressou no curso de Agronomia da Universidade de Federal de Santa Maria (UFSM), onde permaneceu até dezembro de 2009. Em março de 2010, participou do programa de treinamento em sistemas agropecuários, oferecido pela Student Exchange Program CA (Communicating for Agriculture) nos Estados Unidos, onde permaneceu até março de 2011. Em agosto de 2011, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), iniciando suas atividades como bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitossanidade da UFRGS, sob orientação do Prof. Dr. Emerson Medeiros Del Ponte, onde permaneceu até dezembro de 2012. Em janeiro de 2013, iniciou como bolsista de iniciação científica no Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS, onde permaneceu até dezembro de 2014, sob orientação da Profa. Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros. No início de 2014, realizou estágio curricular na Silvestrin Frutas, em Farroupilha, RS, sob orientação do Prof. Dr. Renar João Bender. Gradou-se em Agronomia na UFRGS, em dezembro de 2014. Em abril de 2015, sob orientação da Profa. Dra. Lúcia Brandão Franke, ingressou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia na UFRGS, nível mestrado, área de concentração Plantas Forrageiras. O trabalho foi submetido à banca examinadora de Dissertação em março de 2017.