



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO TOCANTINS



**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

PATRÍCIA RESPLANDES ROCHA DOS SANTOS

**PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À
SEMENTES DE ANDROPOGON E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Curvularia lunata***

GURUPI – TO
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO TOCANTINS

**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

PATRÍCIA RESPLANDES ROCHA DOS SANTOS

**PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À
SEMENTES DE ANDROPOGON E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Curvularia lunata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos

GURUPI – TO
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237p Santos, Patricia Resplandes Rocha dos.

Patogenicidade de fungos associados à sementes de *Andropogon* e caracterização morfológica e molecular de *Curvularia lunata*. / Patricia Resplandes Rocha dos Santos. – Gurupi, TO, 2016.

125 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Produção Vegetal, 2016.

Orientador: Gil Rodrigues dos Santos

1. *Andropogon* L. 2. Patologia de sementes. 3. *Curvularia lunata*. 4. Forrageiras tropicais. I. Título

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ATA n° 13/2016

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PATRÍCIA
RESPLANDES ROCHA DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TOCANTINS**

Aos 20 dias do mês de dezembro do ano de 2016, às 9 horas, na Sala 02 do Bloco PG-PV, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos do Campus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dra. Fábila Silva de Oliveira Lima do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Dianópolis, TO, Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo da Universidade Federal do Piauí, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de PATRÍCIA RESPLANDES ROCHA DOS SANTOS, intitulada "PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À SEMENTES DE ANDROPOGON E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Curvularia lunata*". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Produção Vegetal.

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Dra. Fábila Silva de Oliveira Lima
Primeiro examinador



Dr. Maruzanete Pereira de Melo
Segundo examinador



Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 20 de dezembro de 2016.



Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Mesmo na escuridão, com a tua mão, vens me socorrer
Como não entoar Teu louvor?
Como deixar de proclamar, Teu amor tão singular?
Como não Te exaltar, meu Senhor?
Se existe no meu coração, a canção de eterna gratidão

Cantarei quando a dor chegar, quando sorrir
Cantarei quando eu vacilar, cantarei ao cair
Cantarei pois me erguerás, com Tua mão
Cantarei pois me escutarás indo a Ti em oração
Cantarei lá na glória uma canção
Ao redor do teu trono em perfeita adoração [...]

À Deus, ofereço.

À toda minha família, especialmente a minha querida
mãe Rosângela e ao meu amado Pedro, por todo apoio,
amor e confiança.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais uma etapa importante em minha formação, concluo que, além de crescimento profissional, as experiências vivenciadas durante o mestrado me proporcionaram também um significativo crescimento pessoal. É com carinho que agradeço a todas as pessoas que se fizeram importantes em minha vida durante este processo de evolução:

À minha eterna família, Rosângela, José Ricardo, Letícia, Laura, Ricardo e Laís por todo amor, alegria e companheirismo durante toda minha vida;

Ao meu amado e doce Pedro Rocha, por me apoiar, suportar e incentivar a buscar meus desejos;

Aos meus amigos, Flávio Luz, Thiago Magalhães e Fábria Lima, que sempre me fizeram enxergar o quanto era capaz e o quanto poderia ir longe na vida;

Às minhas amigas, Andrezza, Gisele, Thainara, Carol e Michelle, que mostraram que por mais que o tempo passe, sempre terei o carinho de vocês;

À minha querida, significativa e nova amiga Dalmarcia, por me acolher em seu coração e por todas as palavras sábias ditas nos momentos de tristeza, cansaço e desmotivação;

Ao Laboratório de Fitopatologia, agradeço a Vanilza, Pedro, Mateus, Talita, Priscila, João Henrique, João Vinicius,

Micaele, Luana, Rosângela, Ronice, Evelynne, Jaiza, Oelton e Cláudia por terem sido companheiros de alegrias, artigos, experimentos e lanches. Amigos que se tornaram minha família nesta nova cidade;

Ao professor Dr. Gil Santos, que mesmo desconhecida, me aceitou de coração aberto para orientação no mestrado. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo, apoio e orientação;

À Universidade Federal do Tocantins juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade da concretização de mais este sonho. Agradeço especialmente à Erika e ao Professor Rodrigo Fidelis por sempre me receberem bem e ajudarem no que preciso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Obrigada a todos que contribuíram para esta grande vitória!!!

RESUMO GERAL

O *Andropogon* L. é uma gramínea forrageira, amplamente distribuída em áreas de Cerrado e com períodos de seca prolongada. Apresenta características de ser denso com grandes touceiras e com inflorescência plumosa, tendo uma elevada capacidade na disseminação de suas sementes. Por sua vez, as sementes são consideradas principais fontes de abrigo e transporte de agentes patogênicos para áreas livres de doenças. No Tocantins, não há registros de trabalhos que relacionem a incidência de fungos em sementes de *Andropogon* como causadores de doenças em culturas de importância agrícola. Da mesma forma, não há pesquisas sobre o transporte, transmissibilidade e patogenicidade de fungos associados à suas sementes. O trabalho objetivou avaliar a qualidade sanitária de sementes do *Andropogon*, a transmissão de fungos via semente-plântula e a patogenicidade à plantas de outras espécies de importância agrícola, e também realizar a caracterização morfológica e molecular de *Curvularia* sp. isolados de sementes de *Andropogon*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia, Laboratório de Controle Biológico de Doenças e Casa de Vegetação da Universidade Federal do Tocantins. No capítulo 1, utilizou-se o método *blotter test* para a avaliação da sanidade das sementes com e sem desinfestação. A incidência dos fungos foi avaliada a partir da análise individual das sementes com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico. A germinação das sementes foi avaliada após 10 dias de instalação do teste, juntamente com a identificação de fungos associados às sementes não germinadas. Para os fungos detectados na análise sanitária avaliou-se a capacidade de transmissão via semente-plântula. A patogenicidade dos fungos oriundos das sementes de *Andropogon* foi avaliada por meio da inoculação na própria planta e também foi avaliada a capacidade destes fungos em infectar outras plantas de interesse econômico. No capítulo 2, a identificação morfológica foi realizada a partir de observações

macro e micromorfológicas utilizando-se como base as características descritas na literatura quanto ao aspecto da colônia e conídios de *Curvularia* sp. A caracterização molecular foi realizada a partir da extração do DNA, amplificação e sequenciamento da região do gene *Clg2p*. A transmissão foi avaliada a partir da semeadura de sementes sem tratamento com fungicidas, onde ao final de 40 dias observou-se sintomas típicos de mancha foliar de *Curvularia*. A patogenicidade foi avaliada a partir da inoculação de suspensão de conídios de *Curvularia* sp. nas folhas de plantas saudáveis, observando ao final de 10 dias, se houve sintomas do patógeno. Foram identificados e quantificados nas sementes de *Andropogon* L. fungos dos gêneros *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. A realização da desinfestação das sementes reduziu os fungos presentes nas sementes. O fungo *Curvularia* sp. foi transmitido das sementes para as plantas de *Andropogon*. As sementes de *Andropogon* L. transportaram e disseminaram fungos que uma vez inoculados causaram infecção na própria planta e em outras culturas de importância econômica, tais como: arroz, feijão-caupi, melancia, melão, milho, sorgo e aos capins marandu, mombaça, piatã e quicúia. Baseado em marcadores morfológicos e moleculares, o fungo identificado com elevada incidência associado às sementes de *Andropogon* coletadas em diferentes regiões produtoras agrícolas, trata-se de *Curvularia lunata*. *C. lunata* é transmitido para as plantas de *Andropogon* via semente, sendo patogênico a esta espécie de gramínea forrageira, causando manchas necróticas foliares.

Palavras-chave: *Andropogon* L.; *Curvularia lunata*; diagnose molecular; forrageiras tropicais; patologia de sementes.

GENERAL ABSTRACT

Andropogon L. is a forage grass, widely distributed in Cerrado areas and with prolonged drought periods. It presents dense characteristics with large clumps and with plumose inflorescence, with high capacity in the seeds dissemination. In turn, seeds are considered the main sources of shelter and transport of pathogens to disease-free areas. In Tocantins, there are no studies records relate the fungi incidence in *Andropogon* grass seeds as diseases cause in agricultural importance crops. Likewise, there is no research about the transport, transmissibility and pathogenicity of fungi associated with their seeds. The work aim was evaluate the sanitary quality of *Andropogon* grass seeds, the fungi transmission by seed-seedlings and the fungus pathogenicity to other species plants of agricultural importance, and also perform the *Curvularia* sp. morphological and molecular characterization, isolated from *Andropogon* grass seeds. The experiments were conducted at the Phytopathology Research Laboratory, Biologic Control of Disease Laboratory and green house of Tocantins Federal University. In chapter 1, the blotter test method was used to evaluate seed health with and without disinfestation. The fungi incidence was evaluated from seeds individual analysis using stereoscopic and optical microscope. The seeds germination was evaluated after 10 days after test installation, together with the fungi identification associated with non-germinated seeds. For the detected fungus in the sanitary analysis was evaluated the transmission capacity of seed-seedling. The fungi pathogenicity from the *Andropogon* seeds grass was evaluated by inoculation in the plant itself and was also evaluated the ability of these fungi to infect other plants of economic interest. In chapter 2, the morphological identification was performed from macro and micromorphological observations using as basis the characteristics described in literature regarding the aspect of the colony and conidia of *Curvularia* sp. Molecular characterization was performed from DNA extraction, amplification and

sequencing gene *Clg2p* region. Transmission was evaluated from seed sowing without treatment with fungicides, where at the end of 40 days typical leaf spot symptoms of *Curvularia*. The pathogenicity was evaluated from the inoculation of conidia suspension on leaves of healthy plants, observing at the end 10 days, if there were symptoms of the pathogen. Were identified and quantified in the seeds of *Andropogon* L. fungi of the genera *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. The seed disinfestation reduced the fungi present in the seeds. The fungus *Curvularia* sp. it was transmitted seed to *Andropogon* plant. *Andropogon* L. seeds carried and spread fungi the once inoculated caused infection in the plant itself and other economically important crops, such as rice, cowpea, watermelon, melon, corn, sorghum and grasses marandu, mombaça, piatã and quicúia. Based on morphological and molecular markers, the fungus identified with high incidence associated with *Andropogon* seeds collected in different agricultural producing regions, is *Curvularia lunata*. *C. lunata* is transmitted to plants of *Andropogon* by seed, being pathogenic to this species of forage grass, causing foliar necrotic spots.

Key-words: *Andropogon* L.; *Curvularia lunata*; molecular diagnosis; tropical forages; seeds pathology.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	33
REFERÊNCIAS.....	37

CAPÍTULO I

SANIDADE, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À SEMENTES DE ANDROPOGON	39
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS	48
Origem das sementes e local dos experimentos.....	48
Sanidade.....	49
Germinação	51
Transmissão de fungos via semente-planta.....	51
Patogenicidade	52
Procedimento estatístico	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
Sanidade.....	54
Germinação	61
Transmissão de fungos via semente-planta.....	64
Patogenicidade de fungos obtidos de sementes de Andropogon à diferentes espécies de plantas.....	67
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Curvularia lunata</i> , OBTIDOS DE SEMENTES DE ANDROPOGON.....	85
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	89

INTRODUÇÃO	91
MATERIAL E MÉTODOS	95
Obtenção dos isolados.....	95
Caracterização morfológica	96
Caracterização molecular	97
Extração do DNA.....	97
Amplificação de primer específico para <i>Curvularia lunata</i> ...	98
Sequenciamento	99
Transmissão e patogenicidade de <i>Curvularia</i> sp. em <i>Andropogon</i> L.	100
RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
Caracterização morfológica	102
Caracterização molecular	107
Transmissão e patogenicidade de <i>Curvularia lunata</i> em <i>Andropogon</i> L.	111
CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS.....	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
APÊNDICE	123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Procedências e datas de coleta de sementes de <i>Andropogon</i>	49
Tabela 2. Incidência de fungos em sementes de <i>Andropogon</i> com desinfestação (CD) e sem desinfestação (SD).	56
Tabela 3. Sementes germinadas (GER), sementes não germinadas (SNG) e fungos associados a sementes não germinadas de <i>Andropogon</i> coletadas em regiões produtoras do Tocantins e Pará.	62
Tabela 4. Patogenicidade direta e cruzada de fungos incidentes em sementes de <i>Andropogon</i>	68

CAPÍTULO II

Tabela 1. Isolados de <i>Curvularia</i> sp. obtidos a partir de sementes de <i>Andropogon</i>	95
Tabela 2. Caracterização morfológica da colônia de isolados de <i>Curvularia</i> sp. obtidos a partir de sementes de <i>Andropogon</i>	102
Tabela 3. Caracterização morfológica de conídios isolados de <i>Curvularia</i> sp. obtidos a partir de sementes de <i>Andropogon</i>	104
Tabela 4. Transmissão via semente-plântula e patogenicidade de <i>Curvularia lunata</i> em <i>Andropogon</i> L.	112

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Percentagem de gêneros fúngicos incidentes em 10 amostras de sementes de *Andropogon*. 55
- Figura 2. Sintomas de Mancha de *Curvularia* em plantas de *Andropogon*. 65

CAPÍTULO II

- Figura 1. Estruturas morfológicas de isolados de *Curvularia* sp. obtidos a partir de sementes de *Andropogon* (A e B: Estruturas microscópicas de conídios; C: Estrutura microscópica da germinação do conídio.; D: Estrutura microscópica de *Curvularia* sp., sendo H: Hifa, CO: Conidióforo e CN: Conídios). 106
- Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação com primers específicos para *Curvularia lunata* (M: Marcador molecular de 1Kb; C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; 1: Araguacema; 2: Araguaína; 3: Brejinho de Nazaré; 4: Caseara; 5: Gurupi; 6: Lagoa da Confusão; 7: Marianópolis; 8: Palmas; 9: Sucupira; 10: Santa Maria das Barreiras). 108
- Figura 3. Árvore filogenética de isolados de *Curvularia lunata* com base na sequência de nucleotídeos do gene da proteína Ras *Clg2p*, derivada do Método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros e bootstrap com 2000 replicatas. Sequência de nucleotídeos do gene da proteína Ras *Phytophthora nicotianae*, *Magnaporthe grisea* e *Pyrenophora tritici-repentis* como outgroup. 110

APÊNDICE

- Figura 1. A: Sintomas de mancha de *Alternaria* em folhas de melancia, melão e estruturas microscópicas de conídios de *Alternaria* sp. B: Mancha de *Bipolaris* em folhas de arroz, capins

andropogon e mombaça e conídios de *Bipolaris* sp. C: Mancha de *Curvularia* em folhas de milho, arroz, capim quicúia e andropogon e conídios de *Curvularia* sp. D: Murcha de *Fusarium* em mudas de melancia, sorgo e melão e estruturas microscópicas de conídios de *Fusarium* sp. E: Mancha de *Phoma* em folhas de capim quicúia e estruturas macroscópicas e microscópicas de *Phoma* sp.....123

INTRODUÇÃO GERAL

A família Poaceae está presente em praticamente todos os ambientes do mundo, tendo o gênero *Andropogon* uma distribuição mais representativa. O *Andropogon* L. possui cerca de 100 espécies, distribuídas especialmente nos trópicos, com centros de diversidade específica na África e América Tropical (Clayton e Renvoize, 1982). No continente americano, o gênero está mais bem representado na América do Sul, com o maior número de espécies ocorrendo no Brasil, com cerca de 28 espécies. A diversidade específica mais elevada ocorre nas formações de cerrado e campos rupestres das Regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (Zanin e Longhi-Wagner, 2006).

O capim *Andropogon* apresenta características de ser denso e com grandes touceiras providas de abundante folhagem fina e tenra, sua inflorescência ocorre em forma de panículas com elevada produção de sementes e também elevada capacidade de disseminação (Zanin e Longhi-Wagner, 2006). Associado a isto, sabe-se que a maioria dos patógenos beneficiam-se das sementes como veículo de transporte e como abrigo à sua sobrevivência. Para sua disseminação e sobrevivência os patógenos também dependem do processo de movimentação, sendo isto, proporcionada na maior parte dos

casos por agentes externos, como água, vento, homem, insetos (Amorim et al., 2011) e sementes (Barrocas e Machado, 2010).

A detecção da presença desses organismos patogênicos nas sementes torna-se uma das mais importantes ferramentas para o manejo sanitário de doenças (Barrocas e Machado, 2010). As manchas foliares causadas por uma grande variedade de espécies de fungos fitopatogênicos são as principais doenças encontradas em gramíneas forrageiras (Lenné, 1994). Uma vez estabelecida a doença, o patógeno se desenvolve em direção ao interior do tecido do hospedeiro e começa a comprometer a integridade da semente e de toda a planta, caso se desenvolva (Leite e Pascholati, 1995).

No estado do Tocantins, não há registros de trabalhos que relacionem a incidência de fungos em sementes de *Andropogon* como causadores de doenças em culturas de importância agrícola. Da mesma forma, não há pesquisas sobre o transporte, transmissibilidade e patogenicidade de fungos associados a sementes. Ressalta-se a importância destes relatos, pois, uma vez que o *Andropogon* está distribuído em todo o Estado e presente em áreas de lavouras, este pode servir como hospedeiro alternativo de agentes causadores de doenças para outras culturas de interesse agrônômico. Plantas de vegetação espontânea ocupam extensas áreas e tornam-se potenciais fontes de inóculo de fitopatógenos em cultivos comerciais,

desempenhando papel fundamental na epidemiologia das doenças como hospedeiras alternativas (Silva-Barreto et al., 2010).

Diante o exposto, este trabalho objetivou avaliar a qualidade sanitária de sementes de *Andropogon*, a transmissão de fungos via semente-plântula e a patogenicidade destes fungos à plantas de outras espécies de importância agrícola e, realizar a caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de isolados de *Curvularia* sp. obtidos a partir de sementes de *Andropogon*.

REFERÊNCIAS

AMORIN, L., REZENDE, J.A.M., FILHO, A. B. Manual de Fitopatologia Volume

1: Princípios e Conceitos. 4 ed. São Paulo - SP: Editora Agronômica Ceres LTDA, 2011.

BARROCAS, E.; MACHADO, J. D. C. Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para a detecção de fungos fitopatogênicos. Informativo ABRATES: Inovações tecnológicas em Patologia de Sementes, v. 20, n. 3, 2010.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. Gramineae. In Flora of Tropical East Africa (R.M. Polhill, ed.). Balkema, Rotterdam, part 3, p.767-782, 1982.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, v. 1, cap. 21, p. 393-413, 1995.

LENNÉ, J. M. Diseases of other pasture grasses. In: LENNÉ, J. M.; TRUTMANN, P. Diseases of tropical pasture plants. Wallingford, Oxon, UK: CBA International, 404p. 1994.

SILVA-BARRETO, F. A.; PEREIRA, W. V.; CIAMPI, M. B.; CÂMARA, M. P. S.; CERESINI, P. C. Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. Summa Phytopathologica, v. 36, n. 2, p. 145-154, 2010.

ZANIN, A.; LONGHI-WAGNER, H. M. Sinopse do gênero *Andropogon* L. (Poaceae-Andropogoneae) no Brasil. Revista Brasileira de Botânica, v. 29, n.2, p.289-299, abr.-jun. 2006.

CAPÍTULO I

SANIDADE, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À SEMENTES DE ANDROPOGON

RESUMO

SANIDADE, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE ANDROPOGON

O *Andropogon* é uma gramínea forrageira perene, destacando-se a campo por apresentar inflorescências plumosas com grande facilidade na sua dispersão. Isso se torna um problema quanto à disseminação de patógenos nas lavouras, já que fungos fitopatogênicos podem estar associados a estas sementes, e também deve-se considerar que estas plantas podem ser hospedeiras alternativas de fitopatógenos de outras culturas de interesse econômico. De acordo com a literatura, verificaram-se poucos estudos sobre a sanidade de sementes de *Andropogon* no Brasil, sobretudo no Estado do Tocantins. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sanidade de sementes de *Andropogon* L., a transmissão de fungos via semente-plântula e a patogenicidade à plantas de outras espécies de importância agrícola. As sementes foram coletadas manualmente das plantas em campo em Araguacema, Araguaína, Brejinho de Nazaré, Caseara, Gurupi, Lagoa da Confusão, Marianópolis, Palmas e Sucupira, municípios localizados no Estado do Tocantins e também em Santa Maria das Barreiras, município localizado no Estado do Pará. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia e Casa de Vegetação da Universidade Federal do Tocantins. Utilizou-se o método *blotter test* para avaliação da sanidade das sementes com os tratamentos de desinfestação e sem desinfestação de sementes. A incidência dos fungos foi avaliada a partir da análise individual das sementes com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico. A germinação das sementes foi avaliada após 10 dias de instalação do teste, onde foi realizado também o levantamento e identificação de fungos associados às sementes não germinadas. Para os fungos detectados na análise sanitária

avaliou-se a capacidade de transmissão via semente-plântula. A patogenicidade dos fungos oriundos das sementes de *Andropogon* foi avaliada por meio da inoculação na própria planta e também foi avaliada a capacidade destes fungos em infectar outras plantas de interesse econômico. Foram identificados e quantificados nas sementes de *Andropogon* L. fungos dos gêneros *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. A realização da desinfestação das sementes reduziu os fungos presentes nas sementes. O fungo *Curvularia* sp. foi transmitido das sementes para as plantas de *Andropogon*. As sementes de *Andropogon* L. transportaram e disseminaram fungos que uma vez inoculados causaram infecção na própria planta e em outras culturas de importância econômica, tais como: arroz, feijão-caupi, melancia, melão, milho, sorgo e aos capins marandu, mombaça, piatã e quicuia.

Palavras-chave: *Andropogon* L.; gramínea forrageira; patologia de sementes; transporte de fungos.

ABSTRACT

SANITY, TRANSMISSION AND PATHOGENICITY OF FUNGI ASSOCIATED WITH ANDROPOGON SEEDS

The *Andropogon* grass is a perennial forage grass, highlighting in the field to present feathery inflorescences with great ease in spreading. This becomes a problem as the spread of pathogens in crops, as pathogenic fungi may be associated with these seeds, and also must be considered that these plants can be alternative hosts of pathogens in other economic interesting crops. According to the literature, have been verified few studies on the *Andropogon* seeds health in Brazil, especially in the Tocantins State. This study aimed to evaluate the *Andropogon* L. seeds sanity, the fungi transmission by seed-seedling and pathogenicity to plants of other species of agricultural importance. The seeds were manually collected from plants in the field in Araguacema, Araguaína, Brejinho de Nazaré, Caseara, Gurupi, Lagoa da Confusão, Marianópolis, Palmas and Sucupira, cities in Tocantins State and Santa Maria das Barreiras city location in Pará State. The experiments were conducted at the Phytopathology Research Laboratory and in a greenhouse of Tocantins Federal University, Gurupi - TO. The blotter test method was used for assessing the health of the seeds with and without disinfestation treatments. The incidence of fungi was evaluated from the individual analysis of seeds with the aid of stereoscopic and optical microscope. Seed germination was evaluated after 10 days of test instalation, where also realized the survey and identification of fungi associated with seeds not germinated. For the fungi detected in health analysis evaluated the transmission capacity by seed-seedling. The pathogenicity of fungi derived from *Andropogon* grass seeds was evaluated by inoculating the plant itself and was also evaluated the ability of these fungi infect other economic interest plants. Were identified and quantified in the seeds of *Andropogon* L. fungi of the genera

Alternaria sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. The disinfestation seed reduced the fungi present in the seeds. The fungus *Curvularia* sp. it was broadcast seed to plant *Andropogon* grass. Seeds *Andropogon* L. carried and spread fungi the once inoculated caused infection in the plant itself and other economically important crops, such as rice, cowpea, watermelon, melon, corn, sorghum and grasses marandu, mombaça, piatã and quicuia.

Key-words: *Andropogon* L.; forage grass; seed pathology; fungi transport.

INTRODUÇÃO

Originário da África e América Tropical, o *Andropogon* (*Andropogon* L.) encontra-se amplamente distribuído na maioria dos Cerrados tropicais e em áreas com prolongada estação seca, solos ácidos e de baixa fertilidade (Bogdan, 1977). Zanin e Longhi-Wagner (2006) publicaram uma sinopse de *Andropogon* para o Brasil, onde foram registradas 28 espécies na flora brasileira. O *Andropogon* é uma gramínea forrageira perene, ereta, que pode crescer formando touceiras de até 1 m de diâmetro e produz perfilho com altura média variando entre 1,5 a 2,5 m (Nascimento e Renvoize, 2001). Além disso, destaca-se a campo por apresentar inflorescências plumosas com grande facilidade na sua disseminação. Ocorrem em campos úmidos ou secos, em áreas alteradas, como margens de estradas e clareiras, ou em locais com estágio inicial de sucessão (Zanin e Longhi-Wagner, 2006).

O Estado do Tocantins possui cerca de 7,5 milhões de hectares com áreas de pastagem natural ou formada (Seagro, 2015). Os principais gêneros predominantes são *Brachiaria* (sinonímia *Urochloa*), *Panicum* e principalmente o *Andropogon* (Santana, 2009). Muitas dessas gramíneas são consideradas importantes plantas invasoras devido sua fácil disseminação através das sementes para outras áreas. O que pode tornar-se um

problema quanto à disseminação de fitopatógenos para áreas distantes, já que espécies de fungos fitopatogênicos podem estar associados a estas sementes, e ainda, estas plantas podem ser hospedeiras alternativas de microrganismos causadores de doenças em culturas de interesse econômico.

As sementes constituem-se como o principal fator responsável pela determinação da condição sanitária da lavoura. De maneira geral, os patógenos são transportados por infecção dos tecidos da semente ou por contaminação do tegumento (Agarwal e Sinclair, 1997). Sendo que esta associação fúngica tem sido apontada como uma das principais causas da perda da qualidade de grãos e sementes, durante o plantio e colheita, bem como no armazenamento. As sementes são o meio mais eficiente de transmissão e disseminação de patógenos, sendo esta característica, relacionada à facilidade de locomoção e transporte, já que a maioria das sementes são facilmente carregadas pelo vento, por serem pequenas e leves (Neergaard, 1979).

Atualmente, vários fungos têm sido considerados importantes patógenos de gramíneas forrageiras como, por exemplo, *Claviceps sulcata* em *Brachiaria* sp. e *Panicum maximum*; *Ustilago operta* e *Puccinia levis* var. *panicisanguinalis* em *Brachiaria* sp.; *Bipolaris maydis* e *Tilletia ayresii* em *P. maximum* e o *Colletotrichum gloeosporioides* em

Stylosanthes sp.; *Magnaporthe grisea* em *Brachiaria* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium chlamydosporum* em *Stylosanthes* sp. (Marchi et al., 2011). Além destes, outros fungos potencialmente patogênicos têm sido registrados em sementes de plantas forrageiras, como pode-se citar *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Phoma* sp. e *Sclerotium* sp. (Santos et al., 2014).

Também existem relatos de lotes de sementes comerciais com alta incidência de fungos potencialmente patogênicos como *Bipolaris* sp., *C. gloeosporioides*, *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp. e *Rhizoctonia* sp. (Marchi et al., 2006a). Em *Brachiaria* sp. os fungos dos gêneros *Exserohilum*, *Phoma* e *Curvularia*, quando presentes nas sementes, podem ser transmitidos para as plântulas (Lasca et al., 2004). Duarte et al. (2006) verificaram que *Pythium periiulum* pode ser transmitido por sementes, sendo estas, responsáveis pela disseminação da doença que provoca a morte do capim marandu.

É sabido que o uso de sementes de alta qualidade sanitária e fisiológica é de grande importância na implantação da pastagem. Porém, ainda são poucas as informações no que diz respeito à qualidade sanitária de sementes de forrageiras (Vechiato et al., 2010), bem como sobre a influência na capacidade de suporte e produtividade (Verzignassi et al., 2003), principalmente do *Andropogon*.

De acordo com a literatura verificaram-se poucos estudos sobre a sanidade de sementes de *Andropogon* L. no Brasil, sobretudo no Estado do Tocantins. Sabe-se que no Brasil, o mercado de sementes forrageiras é caracterizado, na maioria das vezes, pela utilização de sementes não certificadas, comprometendo o vigor, germinação e a boa formação das pastagens livres de doenças. Com isto, evidencia-se a necessidade da realização de mais estudos nesta importante área de produção do país.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sanidade de sementes de *Andropogon* L., a transmissão via semente-plântula e a patogenicidade destes fungos à plantas de importância agrícola.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das sementes e local dos experimentos

As sementes de *Andropogon* foram coletadas manualmente das plantas em campo, no período entre maio e junho de 2015, em nove municípios localizados nas regiões norte, sul, leste e oeste do Estado do Tocantins e também em uma localidade do Estado do Pará (Tabela 1). Após as coletas, as sementes foram acondicionadas em saco de papel identificado com local e data de coleta e armazenadas em câmara fria (5 ± 2 °C) até sua utilização, cerca de oito meses após a coleta.

Tabela 1. Procedências e datas de coleta de sementes de *Andropogon*.

Amostra	Procedência	Data de coleta
01	Araguacema – TO	06/2015
02	Araguaína – TO	06/2015
03	Brejinho de Nazaré – TO	05/2015
04	Caseara – TO	06/2015
05	Gurupi – TO	06/2015
06	Lagoa da Confusão – TO	05/2015
07	Marianópolis – TO	05/2015
08	Palmas – TO	06/2015
09	Sucupira – TO	06/2015
10	Santa Maria das Barreiras – PA	06/2015

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia e Casa de Vegetação da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi – TO.

Sanidade

Para este experimento foi utilizado o método do papel filtro (*blotter test*) de acordo com o Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 10x2, sendo 10 localidades distintas e desinfestação ou não de sementes, em cinco repetições.

A desinfestação das sementes foi realizada com a imersão por 40 segundos em álcool (50%) e 40 segundos em hipoclorito de sódio (1%), seguida de três lavagens com água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram

distribuídas em caixas tipo gerbox estéreis, com duas camadas de papel filtro, esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. Foram dispostas 200 sementes para cada tratamento, colocando-se 40 sementes por caixa. As sementes foram incubadas em câmara de incubação sob condições de fotoperíodo de 12 horas, com temperatura de 25 ± 2 °C por 24 horas para induzir a germinação. Após este período, as caixas foram colocadas em congelador (-20 °C) por mais 24 horas para inibir por completo o processo de germinação. Por seguinte, as caixas foram colocadas novamente em câmara de incubação a 25 ± 2 °C, por 7 dias, com fotoperíodo de 12 horas até a avaliação.

O levantamento dos patógenos foi realizado a partir da análise individual das sementes com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, visualizando as características morfológicas das estruturas fúngicas. Com auxílio de um estilete estéril, as estruturas fúngicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) para crescimento e esporulação para posterior identificação. Esta foi realizada com base em literaturas especializadas como Ellis (1971), Barnett e Hunter (1998) e Watanabe (2010). Os dados da incidência dos fungos foram expressos em percentagem (%).

Germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas 100 sementes de cada amostra, divididas em quatro repetições de 25 sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado. Após a realização da desinfestação das sementes de acordo com o descrito no teste anterior, as sementes foram distribuídas em caixas tipo gerbox estéreis com duas camadas de papel filtro, esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram incubadas sob condições de fotoperíodo de 12 horas, com temperatura de 25 ± 2 °C. A contagem da germinação (plântulas normais) foi realizada 10 dias após a instalação do teste, sendo realizado também o levantamento e identificação de fungos associados às sementes não germinadas com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico.

Transmissão de fungos via semente-planta

Para este teste foram considerados os fungos detectados na análise sanitária descrita anteriormente. Utilizou-se um total de 200 sementes de cada amostra com incidência natural de fungos e sem tratamento com fungicidas. A semeadura ocorreu em vasos com capacidade para 5 L, utilizando-se como substrato a mistura de areia, solo e substrato comercial autoclavados na proporção 1:1:1. Os vasos foram colocados com 1 m de distância entre cada, para evitar contaminações entre parcelas. O material

foi mantido em casa de vegetação, sendo a umidade dos vasos mantida na capacidade de campo. Ao final de 40 dias após a semeadura foram realizadas as avaliações das plantas com sintomas de doenças. Para a confirmação dos Postulados de Koch, fragmentos de folhas que apresentaram sintomas foram isolados em meio BDA. Para confirmação dos resultados o teste de transmissão foi repetido.

Patogenicidade

Os fungos considerados potencialmente patogênicos foram isolados no teste de sanidade, crescidos em placas de Petri com BDA e posteriormente incubados por sete dias, à 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas para produção do inóculo. A patogenicidade dos fungos oriundos das sementes do *Andropogon* foi avaliada por meio de inoculações na própria planta, e foi avaliada a capacidade destes fungos em infectar outras plantas de interesse econômico, tais como: *B. brizantha* cv. BRS Piatã (piatã), *B. brizantha* cv. Marandu (marandu), *B. humidicola* cv. Humidicola (quicuia), *Citrullus lanatus* (melancia), *Cucumis melo* (melão), *Glycine max* (soja), *Oryza sativa* (arroz), *P. maximum* cv. Mombaça (mombaça), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Zea mays* (milho).

Para a obtenção das plantas, foi feito o semeio em vasos com capacidade de 5 L contendo como substrato a mistura de areia, solo e substrato comercial autoclavados na proporção 1:1:1. O material foi mantido com irrigação diária em casa de vegetação. Aos 25 dias após a semeadura, com auxílio de um borrifador manual, foram pulverizadas nas folhas das plantas suspensões com conídios dos gêneros fúngicos *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia* e *Phoma* na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} , ajustada com Câmara de Neubauer. Para o gênero *Fusarium*, foram utilizados discos com micélio fúngico com diâmetro de 0,5 cm, os quais foram introduzidos e fixados no colmo e caule das plantas com de alfinete estéril. Para cada cultura, plantas testemunhas foram borrifadas apenas com água e mantidas sob mesma condição.

Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida escura por 36 horas, e em seguida foram alocadas em casa de vegetação, onde após 10 dias foram realizadas as avaliações de patogenicidade. Quando visualizado sintomas no tecido inoculado, o fungo foi reisolado e cultivado em meio BDA (Alfenas e Mafía, 2007), com a finalidade de confirmação do agente causal, cumprindo-se os Postulados de Koch. Para proporcionar maior consistência aos resultados obtidos, os testes de patogenicidade foram repetidos.

Procedimento estatístico

Após a realização da análise de variância, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* SISVAR (Ferreira, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sanidade

Nas sementes assintomáticas de *Andropogon* das 10 regiões avaliadas foram encontrados os seguintes gêneros fúngicos: *Curvularia*, *Fusarium* e *Phoma*, com 61,95%, 35,85% e 30,70% de incidência nas amostras, respectivamente (Figura 1). Também foram encontrados com incidência menor os gêneros *Alternaria* (3,35%), *Bipolaris* (1,03%), *Aspergillus niger* (0,03%), *Penicillium* (0,93%) e *Rhizopus* (1,95%). Fungos considerados de armazenamento e saprófitas, como os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, podem causar depreciação de grãos e sementes (Faiad et al., 1997; Ruiz Filho et al., 2004; Sales Júnior et al., 2007; Marchi et al., 2010).

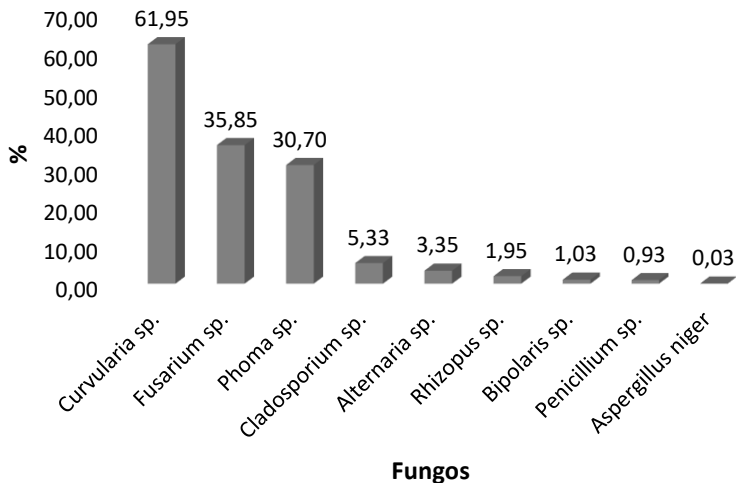


Figura 1. Percentagem de gêneros fúngicos incidentes em 10 amostras de sementes de Andropogon.

Os fungos considerados potencialmente patogênicos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Curvularia*, *Fusarium*, *Phoma*, *Alternaria* e *Bipolaris* (Tabela 2). Provavelmente, muitas estruturas destes microrganismos se localizavam nas camadas externas das sementes o que possibilitou a redução da incidência de forma significativa por meio da desinfestação.

Tabela 2. Incidência de fungos em sementes de *Andropogon* com desinfestação (CD) e sem desinfestação (SD).

Origem	Incidência de fungos patogênicos (%)											
	Al		Bi		Cu		Fu		Ph			
	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD
ARA	1,5aB	6,0cA	0,0bA	0,5cA	29,0dB	66,0cA	26,5bA	39,0dA	27,5bA	35,5dA		
ARG	2,5aB	20,5aA	0,0bA	1,5bA	25,5dB	67,0cA	25,0bB	47,0cA	22,0bA	30,0dA		
BJN	0,0aA	0,5dA	0,5bA	0,0cA	48,0cB	77,5bA	35,5aB	62,5bA	19,5bB	46,5cA		
CAS	3,0aB	11,0bA	0,5bB	2,5bA	31,5dB	84,0bA	31,5bB	66,0bA	4,5cA	13,0eA		
GUR	1,0aB	5,5cA	1,0bB	8,0aA	74,5bA	83,5bA	26,0bB	84,5aA	67,5aA	79,0aA		
LGC	0,0aA	0,5dA	3,0aA	2,0bA	30,5dB	45,5dA	12,0cB	48,5cA	16,5bB	63,0bA		
MAR	0,0aA	0,0dA	0,0bA	0,0cA	100,0aA	99,5aA	0,0cA	2,0fA	26,0bA	8,0eB		
PAL	1,0aB	5,0cA	0,0bA	0,0cA	12,5eB	35,0dA	22,0bA	25,0eA	37,0bB	53,0cA		
SUC	0,0aA	0,0dA	0,0bA	0,0cA	73,5bB	98,5aA	19,5bA	26,0eA	3,0cA	9,5eA		
SMB	2,0aB	7,0cA	0,0bA	1,0cA	72,5bB	85,0bA	48,0aB	70,5bA	30,0bA	23,0dA		
Média	1,10b	5,60a	0,50b	1,55a	49,75b	74,15a	24,60b	47,10a	25,35b	36,05a		

ARA: Araguacema; ARG: Araguaína; BJN: Brejinho de Nazaré; CAS: Caseara; GUR: Gurupi; LGC: Lagoa da Confusão; MAR: Marianópolis; PAL: Palmas; SUC: Sucupira; SMB: Santa Maria das Barreiras; Al: *Alternaria* sp.; Bi: *Bipolaris* sp.; Cu: *Curvularia* sp.; Fu: *Fusarium* sp.; Ph: *Phoma* sp. Colunas – letras minúsculas e Linhas – letras maiúsculas. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à presença de *Alternaria* sp., a região de Araguaína foi a que apresentou maior incidência (20,5%) deste patógeno nas sementes sem desinfestação. As regiões que apresentaram incidência relativamente baixa nas sementes sem tratamento, como exemplo, Brejinho de Nazaré (0,5%) e Lagoa da Confusão (0,5%), após a desinfestação não demonstraram presença deste fungo nas sementes. Apenas as regiões de Marianópolis e Sucupira não registraram a ocorrência de *Alternaria* sp. nas amostras de sementes.

Houve efeito significativo quanto à ocorrência de *Bipolaris* sp. nas sementes sem desinfestação da região de Gurupi em relação às demais regiões. Não houve presença deste fungo nas sementes com e sem desinfestação das regiões de Brejinho de Nazaré, Marianópolis, Palmas e Sucupira. Com

exceção de Brejinho de Nazaré, que apresentou 0,5% de incidência de *Bipolaris* sp. nas sementes com desinfestação. Anjos et al. (2009) avaliando a sanidade de sementes de *P. maximum* Jacq. cultivado em Planaltina – DF, detectaram a presença de *B. zaeae* e *B. maydis* com incidência média de 9,04% e 0,98%, respectivamente. O aumento da frequência de *Bipolaris* sp. nas pastagens poderia estar associado à utilização de lotes de sementes contaminadas. O fungo tem sido encontrado causando a mancha foliar do *Panicum*, de alta severidade em Tanzânia, proporcionando sérios comprometimentos da sustentabilidade das pastagens (Marchi et al., 2006a). Santos et al. (2014) também relataram *Bipolaris* sp. em sementes de espécies forrageiras do gênero *Brachiaria* e *Panicum*.

O gênero *Curvularia* sp. de forma geral, ocorreu em alta frequência e foi detectado em todas as regiões analisadas, inclusive após a desinfestação das sementes. As regiões com maiores índices deste fungo foram Marianópolis e Sucupira, ocorrendo em 99,5% e 98,5% das sementes, respectivamente. Martins et al. (2001) indicaram a presença de *Curvularia* sp. em amostras de sementes de *B. brizantha*. Chagas e Oliveira (1983) observaram a existência de *Curvularia* sp. em sementes de *B. brizantha* submetidas à desinfestação superficial e atribuíram ao transporte interno a causa da ausência de erradicação. Vários

lotes de sementes de *A. gayanus* cultivados e colhidos na Colômbia foram detectados com o gênero *Curvularia* (Toledo et al., 1990).

Fungos do gênero *Fusarium* foram detectados em todas as regiões analisadas, entretanto, em menor incidência na região de Marianópolis (2,0%). Logo após a desinfestação das sementes de Marianópolis, não houve detecção deste fungo. A maior incidência de *Fusarium* sp. foi detectada na região de Gurupi (84,5%), após a desinfestação, a incidência foi reduzida para 26,0%. Este resultado inferi que o inóculo estava localizado em camadas externas das sementes, o que permitiu a sua eliminação com a desinfestação. *Fusarium* sp. está amplamente distribuído na natureza e tem sido identificado como patogênico à várias culturas de interesse econômico. Considerado como parasita facultativo, habitante de solo e de vegetais em decomposição, também tem sido intensivamente estudado pelos fitopatologistas, por ser causador de doenças vasculares em plantas, resultando em murchas e podridões (Streets, 1979; Joffe, 1983; Ueno, 1983). Na Colômbia, Toledo et al. (1990), relataram o gênero *Fusarium* sendo o mais comumente associado as sementes colhidas de *A. gayanus*, entretanto, não houve relatos de sintomas de doença nas plantas, o que provavelmente se tratava de espécies saprófitas.

O gênero *Phoma* foi encontrado em sementes com e sem desinfestação, coletadas em todos os municípios, com maior incidência na região de Gurupi. Marchi et al. (2010) observaram percentuais acima de 50% de incidência de *Phoma* sp. em amostras de sementes de capim Tanzânia e 85,5% em sementes de Massai coletadas nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Na Colômbia, *Phoma* sp., apresentou alta incidência nas sementes e se mostraram patogênicos à *Brachiaria*, provocando sintomas severos nas plantas (García e Pineda, 2000). De acordo com Prabhu e Filippi (1997) este fungo provoca a Queima das Glumelas no arroz e é responsável pela depreciação da qualidade das sementes.

Santos et al. (2014) avaliando fungos associados a sementes de *Brachiria* sp., *P. maximum*, *Sthilosanthes* sp., e *Crotalaria juncea* sem desinfestação detectaram a presença de *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Phoma* sp. e *Sclerotium* sp. Enquanto as sementes com desinfestação foram detectados os mesmos fungos com frequência menor. A presença destes fungos nos tecidos vegetais também foi relatada por Yago et al. (2011), que identificou a presença de *Curvularia* sp. em sementes de sorgo e milho no endosperma das sementes e os fungos *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. no endosperma e embrião das sementes. Em estudos realizados por Mallmann et al. (2013), as sementes de *P. maximum* cv. Massai e cv.

Mombaça apresentaram maiores incidências de *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp.

Guimarães et al. (2006) relataram a presença de importantes agentes fitopatogênicos em sementes comerciais de *Brachiaria*, como *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. Em adição, foram constatadas incidências consideráveis dos gêneros *Bipolaris* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. em sementes de Marandu, Xaraés e Basilisk com alto padrão de pureza (Guimarães et al., 2006). Anjos et al. (2009) realizando um levantamento de fungos associados a sementes de *P. maximum* detectaram a incidência de *Bipolaris* sp., *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. e *Curvularia* sp.

Entre fungos patogênicos, os mais frequentemente detectados em lotes de sementes de *P. maximum* e *Stylosanthes* sp. foram dos gêneros *Bipolaris*, *Curvularia*, *Phoma* e *Fusarium* (Marchi et al., 2010), sendo detectados em 100% dos lotes. Os gêneros supracitados têm sido comumente encontrados associados às sementes de *P. maximum* (Garcia e Tenente, 2000; Marchi et al., 2006b; Michalski et al., 2007). Em sementes de pastagens, Vechiato e Aparecido (2008), relatam que os fungos *Alternaria* sp., *Exserohilum* sp., *Curvularia* sp., *Phoma* sp. e *Fusarium* sp., são comumente associados às sementes de *Brachiaria* e *Panicum*.

Os elevados percentuais de fungos patogênicos observados nas sementes de *Andropogon* podem ter como causa às condições climáticas favoráveis nas regiões produtoras. Também o cultivo contínuo na mesma área favorece o aumento da incidência desses patógenos, devido ao incremento do inóculo na área (Fernandes et al., 2005).

Foi observado que com o tratamento de desinfestação das sementes a quantidade de fungos ocorreu em menor incidência em relação ao tratamento sem desinfestação, para a maioria dos gêneros. Neves (2009) relata que tais fungos se comportam assim por suas estruturas estarem em concentração maior no exterior das sementes.

Germinação

As sementes de *Andropogon* apresentaram um percentual médio de germinação de 34%. As regiões de Gurupi e Palmas demonstraram o maior percentual germinativo das sementes, com 59% e 57%, respectivamente. Entretanto, as sementes provenientes de Marianópolis, apresentaram apenas 3% de germinação (Tabela 3).

Tabela 3. Sementes germinadas (GER), sementes não germinadas (SNG) e fungos associados a sementes não germinadas de *Andropogon* coletadas em regiões produtoras do Tocantins e Pará.

Origem	GER %	SNG %	Fungos associados a sementes não germinadas							
			Al	Bi	Cl	Cu	Fu	Pe	Ph	Rh
Araguacema – TO	36,00 b	64,00 c	+	-	-	+	+	-	+	-
Araguaína – TO	33,00 b	67,00 c	+	+	+	+	+	-	+	-
Brejinho de Nazaré – TO	23,00 c	77,00 b	-	-	-	+	+	-	+	-
Caseara – TO	31,00 b	69,00 c	+	+	+	+	+	-	+	-
Gurupi – TO	59,00 a	41,00 d	+	+	-	+	+	-	+	-
Lagoa da Confusão – TO	31,00 b	69,00 c	-	+	-	+	+	-	+	+
Marianópolis – TO	3,00 d	97,00 a	-	-	-	+	+	+	+	+
Palmas – TO	57,00 a	43,00 d	-	-	+	+	+	-	+	-
Sucupira - TO	24,00 c	76,00 b	-	-	-	+	+	+	+	+
Santa Maria das Barreiras – PA	21,00 c	79,00 b	+	+	+	+	+	-	+	-
Média	34,00	66,00								

GER: Germinação; SNG: Sementes não germinadas; Al: *Alternaria* sp.; Bi: *Bipolaris* sp.; Cl: *Cladosporium* sp.; Cu: *Curvularia* sp.; Fu: *Fusarium* sp.; Pe: *Penicillium* sp.; Ph: *Phoma* sp.; Rh: *Rhizopus* sp. Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Nery et al. (2012) normalmente, as sementes de *Andropogon* tem poder germinativo de aproximadamente 25%, cinco meses após a colheita, valor considerado baixo. Apenas as sementes das regiões de Brejinho de Nazaré, Marianópolis, Sucupira e Santa Maria das Barreiras ficaram com valores abaixo do indicado pela literatura. Algumas sementes de forrageiras apresentam um grau de dormência impedindo a germinação imediata, por isso, recomenda-se não utilizar sementes recém-colhidas, pois, com o tempo a dormência vai se rompendo. As sementes utilizadas no teste foram colhidas acerca de oito meses antes da implantação do experimento. Carmona et al. (1998) em teste de germinação de gramíneas forrageiras nativas, dentre elas duas espécies de *Andropogon*, demonstraram que a presença de luz e temperatura média de 25 °C promoveu a germinação das mesmas. Com isso,

sabe-se que apesar do *Andropogon* apresentar dormência, existem formas de superar.

Foram detectados fungos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Rhizopus* associados as sementes de *Andropogon* não germinadas. *Fusarium* sp. pode afetar a germinação de sementes, sendo este dano relacionado à sua presença nas sementes, além de causar murchas, podridões, morte de plântulas, aborto de flores e podridões de armazenamento (Sá et al., 2011). Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* foram relatados em sementes de *A. gayanus*, causando deterioração da qualidade de sementes e redução da germinação, reduzindo assim o vigor desta gramínea (Toledo et al., 1990).

Dias e Toledo (1993) observaram que o aumento da incidência de fungos do gênero *Curvularia* e *Phoma* em sementes de *B. decumbens*, correlacionou com a diminuição da porcentagem de germinação destas sementes. Enquanto Lasca et al. (2004), relataram que estes fungos quando presentes nas sementes de espécies forrageiras, afetam a emergência de plântulas, provocando a morte.

Alguns patógenos provocam perdas na produtividade de sementes sem, no entanto, afetar a viabilidade destas. Já outros, provocam a redução em rendimento e danos sobre as sementes, as quais terão, como consequência direta, redução da

percentagem de germinação e vigor (Vanzolini et al., 2010; Kobayashi et al., 2011). Portanto, por serem veículos importantes de disseminação de patógenos à longas distâncias e para áreas livres de doenças, as sementes disponíveis no mercado devem possuir elevada qualidade fisiológica e sanitária (Machado, 2000).

Transmissão de fungos via semente-planta

Os resultados do teste de transmissão complementam o teste de sanidade, pois comprovam se os fungos presentes nas sementes são transmitidos para as plantas. Entende-se por transmissão semente-planta a passagem do inóculo presente na semente infectada para as plantas emergidas (Maude, 1996).

As plantas provenientes de sementes das regiões de Araguacema, Araguaína, Brejinho de Nazaré, Caseara, Gurupi, Marianópolis, Palmas e Sucupira apresentaram aos 40 dias após a semeadura sintomas de mancha de *Curvularia*, com pequenas manchas necróticas elípticas e ligeiramente ovaladas de bordos avermelhados e centro pardo-claro (Figura 2). O teste foi repetido e foi comprovado que este gênero foi o único transmitido às plantas.



Figura 2. Sintomas de Mancha de Curvularia em plantas de Andropogon.

As amostras de sementes de todas estas regiões apresentaram a presença de *Curvularia* sp. nas sementes não germinadas. Lasca et al. (2004) apresentaram evidências quanto a transmissão de *Curvularia* sp. a partir de sementes de *Brachiaria* sp. Silva et al. (2014) verificaram que *C. lunata* foi transmitido por sementes de arroz sendo detectado em todos os órgãos da plântula. Em plantas de sorgo e milho, Elisabeth et al. (2008), relataram altos níveis de transmissão de espécies de *Curvularia* via semente planta.

A transmissão do patógeno da semente para a planta ocorre entre as etapas de disseminação e colonização do seu ciclo de vida. Esse processo implica no transporte que

proporciona uma infecção bem sucedida, dando origem a uma planta doente. Quanto a quantificação da transmissão, esta pode ser realizada através da detecção dos sintomas nas plantas, partindo do princípio de que o único meio de inoculação foi através da associação do patógeno com a semente (Menten e Bueno, 1987).

Embora tenha sido relatado a presença de *Curvularia* sp. nas sementes não germinadas e no teste de sanidade das regiões de Lagoa da Confusão e Santa Maria das Barreiras, as plantas provenientes destas amostras não apresentaram sintomas de manchas foliares. É sabido que a infecção de sementes não assegura a transmissão do patógeno, porque além do hospedeiro, os fatores ligados ao ambiente e ao hospedeiro devem ser considerados (Machado, 1988; Machado, 1994).

Entre os microrganismos patogênicos, os fungos possuem uma maior habilidade em penetrar diretamente nos tecidos vegetais e se alojarem internamente. Este inóculo fúngico pode ser transportado via semente, mas a taxa de transmissão do patógeno depende basicamente da quantidade e localização do inóculo na semente. Alguns autores relataram que 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, 1979; Machado, 1988; Menten, 1991; Tanaka e Machado, 1985).

Com a intensificação da comercialização de sementes de forrageiras torna-se cada vez mais importante a produção de sementes de elevada qualidade sanitária. Por isso, é importante a geração de conhecimentos sobre patógenos associados às sementes de espécies cultivadas, sua forma de transmissão e ciclo de hospedeiras para o estabelecimento e medidas de controle integrado (Anjos et al., 2009).

Patogenicidade de fungos obtidos de sementes de *Andropogon* à diferentes espécies de plantas

O teste de patogenicidade pode confirmar ou excluir a hipótese de que os fungos encontrados associados às sementes são mesmo patogênicos ao *Andropogon* e a outras importantes espécies de plantas cultivadas. A patogenicidade foi avaliada a partir da inoculação de isolados de *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. em plantas sadias (Tabela 4).

Tabela 2. Patogenicidade direta e cruzada de fungos incidentes em sementes de *Andropogon*.

Culturas	Fungos					Controle
	Al	Bi	Cu	Fu	Ph	
<i>Andropogon</i>	-	+	+	-	-	-
Arroz	-	+	+	-	-	-
Feijão-caupi	+	-	-	-	-	-
Marandu	-	+	+	-	-	-
Melancia	+	-	-	+	-	-
Melão	+	-	-	+	-	-
Milho	-	+	+	-	-	-
Mombaça	-	+	+	-	+	-
Piatã	-	+	+	+	-	-
Quicuia	-	+	+	-	+	-
Soja	-	-	-	-	-	-
Sorgo	-	+	+	+	-	-

Al: *Alternaria* sp.; Bi: *Bipolaris* sp.; Cu: *Curvularia* sp.; Fu: *Fusarium* sp.; Ph: *Phoma* sp.; (+) Fungo patogênico.

Entre os fungos transportados pelas sementes de *Andropogon*, o gênero *Alternaria* demonstrou ser patogênico às culturas de feijão-caupi, melancia e melão, apresentando sintomas de lesões pequenas e necróticas e com o desenvolvimento, tornam-se circulares, concêntricas e com halo clorótico. Kimati et al. (1997) relataram que *Alternaria* sp. afeta plantas de melancia e melão com redução da área fotossintética, comprometendo assim, a qualidade dos frutos devido a exposição a queimaduras do sol. No feijão-caupi, *Alternaria* sp. é conhecido como agente causal da doença denominada mancha

de alternaria, encontrado também em estudos realizados por Biemond et al. (2013) e Silva et al. (2016).

Bipolaris sp. foi o fungo que incitou sintomas de doença na maior parte das culturas, andropogon, arroz, marandu, milho, mombaça, piatã, quicuia e sorgo, produzindo lesões alongadas, orientadas pelas nervuras com margens castanhas e com forma e tamanho variáveis. Testes de patogenicidade de fungos do gênero *Bipolaris* sp., confirmaram que eles eram os agentes etiológicos das lesões foliares de *P. maximum* cv. Mombaça (Anjos et al., 2009). Manchas foliares características causadas por *Bipolaris* sp. foram detectadas após a inoculação do mesmo em plantas de *B. brizantha*, *C. juncea* e *P. maximum* (Santos et al. 2014).

A ocorrência de manchas foliares causadas por *B. maydis* foi relatada em diversas gramíneas forrageiras no Brasil, entre elas, *P. maximum* (Verzignassi e Fernandes, 2001; Charchar et al., 2007; Martinez et al., 2010), *Paspalum atratum* cv. Pojuca (Anjos et al. 2004), milheto (Charchar et al., 2004) e o campim-elefante (Charchar et al., 2008). *B. zea* foi relatado em diversas gramíneas forrageiras no Brasil e em outros países, como *B. decumbens*, na Colômbia (Lenné, 1990), em milheto, no Brasil (Sivanesan, 1987) e na Índia (Sivanesan, 1987) e em *Pennisetum clandestinum*, na Austrália (Sivanesan, 1987) e na China (Chang, 1992). Farr e Rossman (2013) relataram a ocorrência de

Bipolaris sp. em plantas da família Poaceae, como *P. clandestinum*, *Z. mays*, *A. aciculatus*, *B. ruziziensis*, *O. sativa*, *P. maximum*, *Setaria* sp., *Sorghum* sp. e *Triticum aestivum* distribuídos em países da Austrália, Índia, África, Brasil, Canadá, Nova Zelândia, Nigéria, Zimbábue, Dinamarca, entre outros.

A patogenicidade de *Curvularia* sp. foi evidenciada a partir da observação de sintomas com manchas necróticas ovaladas com bordos avermelhados nas culturas do andropogon, arroz, marandu, milho, mombaça, piatã, quicuia e sorgo. Segundo Dasgupta et al. (2005) e Shan et al. (2008), várias espécies de *Curvularia* são associadas a doenças em plantas. Yago et al. (2011) observaram que houve um aumento na morte de plântulas de sorgo e milheto inoculados com *C. lunata* e o aumento do índice de severidade das mudas infectadas 10 dias após a inoculação. Elisabeth et al. (2008) relataram sintomas de doenças em plantas de sorgo causados por *C. oryzae*. Várias espécies de *Curvularia* têm sido relatadas em arroz, entre elas a *C. eragrostidis* e *C. lunata*, como agentes de descoloração, lesão e, ou, deformação de grãos, além de causadores de manchas necróticas em folhas e outras partes da planta, morte de plântulas, etc. (Lima e Furtado, 2007).

Fusarium sp. demonstrou ser patogênicos as culturas da melancia, melão, piatã e sorgo através de sintomas de murcha e

escurecimento dos feixes vasculares. Este fungo é constantemente encontrado associado a sementes de diferentes espécies de plantas e apresenta potencial de causar danos severos (Tanaka, 2001).

No continente Africano foram relatados mais de 20 gêneros fúngicos causadores de doenças em *A. gayanus* e *A. tectorum*, principalmente manchas foliares causadas pelos gêneros *Curvularia* e *Phoma* (Toledo et al., 1990). Vários estudos relatam a suscetibilidade de gramíneas aos ataques de fungos do gênero *Bipolaris*, *Exserohilum* e *Curvularia* causando manchas foliares, além da secagem das folhas e a morte de plântulas (Macedo e Barreto, 2007; Martinez et al., 2010; Kleczewski et al., 2012; Braz et al., 2013; Kumar et al., 2013), no entanto, alguns autores perceberam que este resultado pode variar de acordo com o genótipo utilizado (Braz et al., 2013). Vechiato e Aparecido (2008) relataram que fungos dos gêneros *Alternaria*, *Exserohilum*, *Curvularia*, *Phoma* e *Fusarium* são considerados potencialmente patogênicos às diferentes espécies e cultivares dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*.

Phoma sp. foi responsável por causar manchas necróticas de cor escura nos capins Mombaça e Quicuia, demonstrando ser patogênico. Teste de patogenicidade confirmaram que *Phoma* sp. também foi o agente etiológico das manchas foliares de *P.*

atratum cv. Pojuca, *P. maximum* cv. Vencedor, *B. decumbens* cv. Brasilisk e *P. maximum* cv. Tanzânia (Anjos et al., 2005).

As plantas utilizadas como controle experimental não apresentaram nenhum tipo de sintoma de doenças foliares ou murcha causados pelos fungos extraídos das sementes de *Andropogon*.

Em consideração aos resultados apresentados, é imprescindível a necessidade de utilização de medidas para evitar a disseminação dos patógenos nas áreas de pastagens ou lavouras de cultivos com espécies de interesse agrícola, estendendo-se até o seu beneficiamento e armazenamento. Sabendo-se que o uso de sementes de baixa qualidade sanitária tem sido causa frequente nos resultados de baixa produtividade das plantas cultivadas. Considerando ainda, que o aspecto sanitário da semente é um dos mais relevantes, em função dos patógenos apresentarem alta variabilidade, sendo necessários estudos constantes para acompanhar essa evolução.

CONCLUSÕES

Foram identificados e quantificados nas sementes de *Andropogon* L. fungos dos gêneros *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp. e *Rhizopus* sp.;

A realização da desinfestação das sementes reduziu os fungos presentes nas sementes de *Andropogon* L.;

O fungo *Curvularia* sp. é transmitido para as plantas de *Andropogon* L. via semente, causando manchas necróticas nas folhas da planta;

As sementes de *Andropogon* L. são veículos de disseminação e hospedeiras de fungos fitopatogênicos às culturas de importância econômica como: arroz, feijão-caupi, melancia, melão, milho, sorgo, capins marandu, mombaça, piatã, quicuia e ainda à própria cultura;

Alternaria sp. é patogênico ao feijão-caupi, melancia e melão; *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp. são patogênicos ao andropogon, arroz, marandu, milho, mombaça, piatã, quicuia e sorgo; *Fusarium* sp. demonstrou patogenicidade à melancia, melão, piatã e sorgo; *Phoma* sp. é patogênico às forrageiras mombaça e quicuia.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. Principles of seed pathology. 2ed. Florida: CRC Press, 1997.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em Fitopatologia. Viçosa: UFV, 382p. 2007.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, S. S. N. Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. Fitopatologia Brasileira, v. 29, p. 656-658, 2004.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, S. S. N.; TEIXEIRA, R. N. *Phoma* sp. (sect. *Peyronellaea*), como agente etiológico de Mancha Foliar de *Paspalum atratum* no Brasil. Fitopatologia Brasileira, v. 30, n. 1, 2005.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. d'A.; MICHALSKI, M. V.; RABELLO, A. R.; SILVA, M. S.; ANJOS, S. S. N. Transmissão e patogenicidade de duas espécies de *Bipolaris* associados às sementes de *Panicum maximum* Jacq. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 235), 16p. 2009.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ed. 218p. 1998.

BIEMOND, P. C.; OGUNTADE, O.; KUMAR, P. L.; STOMPH, T. J.; TERMORSHUIZEN, A. J.; STRUIK, P. C. Does the informal seed system threaten cowpea seed health?. Crop Protection, v. 43, p. 166-174, 2013.

BOGDAN, A. V. Tropical pasture and fodder plants. London: Longman, 475p. 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 200p. 2009.

BRAZ, T. G. S.; FONSECA, D. M.; JANK, L.; RESENDE, M. D. V.; MARTUSCELLO, J. A.; SIMEÃO, R. M. Genetic parameters of agronomic

characters in *Panicum maximum* hybrids. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 42, n. 4, p. 231-237, 2013.

CARMONA, R.; MARTINS, C. R.; FÁVERO, A. P. Fatores que afetam a germinação de sementes de gramíneas nativas do cerrado. Revista Brasileira de Sementes, v. 20, n. 1, p. 16-22, 1998.

CHAGAS, D.; OLIVEIRA, D. P. Fungos associados a sementes de gramíneas e leguminosas forrageiras. Fitopatologia Brasileira, v. 8, n. 1, p. 131-135, 1983.

CHANG, H. S. *Cochliobulus zae* sp. nov., the teleomorph of *Bipolaris zae*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, v. 33, p. 175-177, 1992.

CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, J. R. N.; AKIMOTO, A. K.; LEITE, R. G. *Bipolaris maydis* infecta milho no Cerrado do Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, v. 29, p. 42-43, 2004.

CHARCHAR, M. J. d'A.; ANJOS, J. R. N.; SILVA, M. S.; SILVA, W. A. M. Mancha foliar em -elefante no Cerrado do Brasil Central causada por *Bipolaris maydis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, p. 637-639, 2008.

CHARCHAR, M. J. d'A.; VIEIRA, E. A.; ANJOS, J. R. N.; FERNANDES, F. D.; SILVA, M. S.; MICHALSKI, M. V. Severidade de manchas foliares em genótipos de *Panicum maximum* no Cerrado do Brasil Central. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44., 2007, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007.

DASGUPTA, S.; SAHA, D.; SAHA, A. Levels of common antigens in determining pathogenicity of *Curvularia eragrostidis* in diferente tea varieties. Journal of Applied Microbiology, v. 98, p. 1084-1092, 2005.

DIAS, D. C. F. S.; TOLEDO, F. F. Germinação e incidência de fungos em testes com sementes de *Brachiaria decumbens* STAPF. Revista Brasileira de Sementes, v. 15, n. 1, p. 81-86, 1993.

DUARTE, M. L. R.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R. Aspectos fitopatológicos da morte do -braquiário (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu). In: BARBOSA, R. A. (Ed.). Morte de pastos de braquiária. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 104-113, 2006.

ELISABETH, Z. P.; PACO, S.; VIBEKE, L.; PHILIPPE, S.; IRÉNÉE, S.; ADAMA, N. Importance of seed-borne fungi of Sorghum and pearl millet in Burkina Faso and their control using plant extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 11, n. 3, p. 321-331, 2008.

ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, 1971.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; PADILHA, L. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1997.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory. ARS, USDA, 2013.

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. (Ed.). *Sementes: qualidade fitossanitária*. Viçosa, MG: UFV, p. 183-213, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GARCIA, J. W.; TENENTE, R. C. V. Reprodução de *Aphelenchoides besseyi* Christie (1942) obtido de sementes de *Panicum maximum*, em diferentes fungos associados a essas sementes. *Nematologia Brasileira*, v. 24, n. 1, p. 91-93, 2000.

GARCÍA, S. X.; PINEDA, L. Reconocimiento de enfermedades fungosas transmitidas por semilla em germoplasma de *Brachiaria* spp. *Fitopatologia Colombiana*, v. 24, n. 2, p. 39-46, 2000.

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*, p. 1-2, 2006.

JOFFE, A. Z. Foodborne diseases: alimentary toxic aleukia. In: RECHCIGL JUNIOR, M. Handbook of foodborne diseases of biological origin. Florida: CRC Press, p.353-495, 1983.

KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; BERGAMON FILHO, A. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 251-269, 1997.

KLECZEWSKI, N. M.; FLORY, S. L.; CLAY, K. Variation in pathogenicity and host range of *Bipolaris* sp. causing leaf blight disease in the invasive grass *Microstegium vimineum*. Weed Science, v. 60, n. 3, p. 486-493, 2012.

KOBAYASTI, L.; ADORIAM, A. I.; PAIVA NETO, V. B.; ALVES, C. Z.; ZUFFO, M. C. R. Incidência de fungos em sementes de pinhão manso. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2011.

KUMAR, A. C. K.; NAGARAJA, A.; RAGHAVENDRA, B. T.; RAVIKUMARA, B. M. Evaluation of fungicides against *Drechslera setariae* causing brown leaf spot of foxtail millet *Setaria italica* (L.). Environment and Ecology, v. 31, n. 2, p. 801-803, 2013.

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. Revista Arquivos do Instituto Biológico, v. 71, n. 4, p. 465-472, 2004.

LENNÉ, J. M. A world list of fungal disease of tropical pasture species. Phytopathological Papers, v. 32, p. 1-161, 1990.

LIMA, A.; FURTADO, M. Curvularia species (anamorphic fungi: Hyphomycetes) from Santiago Island, Cape Vert. Portugaliae Acta Biologica, v. 22, p. 145-156, 2007.

MACEDO, D. M.; BARRETO, R. W. First report of leaf blight of *Brachiaria brizantha* in Brazil caused by *Bipolaris cynodontis*. Plant Pathology, v. 56, n. 6, p. 1041, 2007.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. Revista Anual de Patologia de Plantas, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL-/FAEPE, 107p. 1988.

MACHADO, J. C. Tratamento de sementes no controle de doenças. LAPS: UFLA: FAEPE, Lavras – MG, 138p. 2000.

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.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; ARIAS, A. M. S.; FERNANDES, C. D.; JERBA, V. F.; BUENO, M. L. Patologia de sementes de forrageiras tropicais. Summa Phytopathologica, v. 32, p. 81, 2006b.

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, v. 31, n. 3, p. 575-584, 2010.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; JERBA, V. F.; TRENTIN, R. A.; BUENO, M. L.; GUIMARÃES, L. R. A.; FABRIS, L. R. Sementes de forrageiras tropicais: patógenos associados e estratégias de controle. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9, 2006. Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2006a.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. Doenças em plantas forrageiras. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 187), 47p. 2011.

MARTINEZ, A. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 4, p. 863-870, 2010.

MARTINS, L.; SILVA, W. R.; ALMEIDA, R. R. Sanidade em sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.ex A.Rich) Stapf submetidas a tratamentos

térmicos e químico. Revista Brasileira de Sementes, v. 23, n. 2, p. 117-120, 2001.

MAUDE, R. B. Seedborne diseases and their control: Principles and practice. Wallingford: Cab International, p. 32-69, 1996.

MENTEN, J. O. M.; BUENO, J. T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. Patologia de sementes. Campinas: fundação Cargil, p. 164-191, 1987.

MENTEN, J. O. M. Patógeno em sementes: detecção, dano e controle químico. Piracicaba: FEALQ/ESALQ, 312p. 1991.

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 (Documentos Embrapa Cerrados, 176), p. 35, 2007.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; RENVOIZE, S. A. Gramíneas forrageiras naturais e cultivadas na região Meio-Norte. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 196p. 2001.

NEERGAARD, P. Seed pathology. London: The MacMillan Press, v. 1, 839p. 1979.

NERY, M. C.; NERY, F. C.; SILVA, D. R. G.; SOARES, F. P. Produção de sementes forrageiras. Boletim Técnico, n. 88, p. 1-47, 2012.

NEVES, W. S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LOPES, E. A. Avaliação fitossanitária de sementes de pinhão-mansão provenientes dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Revista Tropica, v. 3, n. 2, p. 17-23, 2009.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Arroz (*Oryza sativa* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 1. p. 51-79, 1997.

RUIZ FILHO, R. R.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S. Fungos associados às sementes de cedro. *Summa Phytopathologica*, v. 30, n. 4, p. 494-496, 2004.

SÁ, D. A. C.; SANTOS, G. R.; FURTADO, G. Q.; ERASMO, E. A. L.; NASCIMENTO, I. R. Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n. 4, p. 663-670, 2011.

SALES JÚNIOR, R.; BELTRAN, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; MEDEIROS, E. V. Controle biológico de *Monosporascus cannonballus* com *Chaetomium*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 70-74, 2007.

SANTANA, S. C. Indicadores físicos da qualidade de solos no monitoramento de pastagens degradadas na região sul do Tocantins. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 76p. 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. 54-62, 2014.

SEAGRO. Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins. Cenário e perspectivas para o agronegócio da pecuária tocaninense. 2015. Disponível em: <<http://seagro.to.gov.br/agronegocios/pecuaria/>>. Acesso em: 27 set. 2016.

SHAN, F. Y.; SHI, W.; LIU, Y.; ZHANG, J.; DONG, J. Parasitic fitness and RAPD analysis of *Curvularia* species on corn. *Journal of Agricultural University of Hebei*, v. 31, p. 37-41, 2008.

SILVA, F. H. A.; NASCIMENTO, S. R. C.; TORRES, S. B.; OLIVEIRA, J. R.; ALVES, T. R. C.; NEGREIROS, A. M. P. Qualidade sanitária de sementes salvas de feijão-caupi utilizadas pelos agricultores do Rio Grande do Norte. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 59, n. 1, p. 60-65, 2016.

SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, E. K. C.; PEREIRA, T. S. Sanidade de sementes de arroz,

biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. Revista Ceres, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorph. Mycological Papers, v. 158, p. 1-261, 1987.

STREETS, R. B. The diagnosis of plant diseases. Tucson: University of Arizona Press, 1979.

TANAKA, M. A. R. Sobrevivência de *Fusarium* moniliforme em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. Fitopatologia Brasileira, v. 26, n. 1, p. 58-62, 2001.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. Informe Agropecuário, v. 11, n. 122, p. 40-46, 1985.

TOLEDO, J. M.; VERA, R.; LASCANO, C.; LENNÉ, J. M. *Andropogon gayanus* Kunth: A grass for tropical acid soils. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali – Colômbia, 382p. 1990.

UENO, Y. Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects. Tokyo: Kodansha, 1983.

VANZOLINI, S.; MEORIN, E. B.; SILVA, R. A.; NAKAGAWA, J. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão manso. Revista Brasileira de Sementes, v. 32, n. 4, p. 9-14, 2010.

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C. Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. Instituto Biológico – APTA (Documento Técnico, 89), 2008.

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C.; FERNANDES, C. D. Frequência de fungos em lotes de sementes comercializadas de *Brachiaria* e *Panicum*. Instituto Biológico – APTA (Documento Técnico, 4), 11p. 2010.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. Doenças em forrageiras. Campo Grande: Embrapa-CNPGC. (Embrapa-CNPGC. Gado de Corte Divulga, 50), 2001.

VERZIGNASSI, J. R.; SOUZA, F. H. D.; FERNANDES, C. D.; CARVALHO, J.; BARBOSA, M. P. F.; BARBOSA, O. S.; VIDA, J. B. Estratégias de controle de mela em área de produção de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Summa Phytopathologica*, v. 29, n. 1, p. 66, 2003.

WATANABE, T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. 3ed. CRC press, 2010.

YAGO, J. I.; ROH, J. H.; BAE, S. D.; YOON, Y. N.; KIM, H. J.; NAM, M. H. The effect of seed-borne mycoflora from sorghum and foxtail millet seeds on germination and disease transmission. *Mycobiology*, v. 39, n. 3, p. 206-218, 2011.

ZANIN, A.; LONGHI-WAGNER, H. M. Sinopse do gênero *Andropogon* L. (Poaceae-Andropogoneae) no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 2, p. 289-299, 2006.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Curvularia* *lunata*, OBTIDOS DE SEMENTES DE ANDROPOGON

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Curvularia lunata*, OBTIDOS DE SEMENTES DE ANDROPOGON

O gênero *Curvularia* é composto por mais de 40 espécies que se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios, colônia e número de septos. O reconhecimento das características principais do gênero *Curvularia* é relativamente fácil, no entanto, a identificação taxonômica a nível de espécie, é por sua vez complicada pelas descrições vagas e ausência de ilustrações em trabalhos mais antigos, necessitando assim, de estudos moleculares para identificação correta destes organismos. Várias espécies de *Curvularia* estão associadas à doenças em plantas, principalmente causando manchas foliares em gramíneas forrageiras, sobretudo em *Andropogon* L. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar a diversidade morfológica e molecular de isolados de *Curvularia* sp. associados a sementes de *Andropogon*, bem como avaliar a capacidade de transmissão e patogenicidade deste fungo em plantas de *Andropogon*. Foram utilizados dez isolados de *Curvularia* sp., obtidos a partir de sementes de *Andropogon* provenientes de regiões produtoras agrícolas do Tocantins e de um município do Estado do Pará. A caracterização morfológica foi realizada a partir de observações das colônias e conídios. A caracterização molecular foi realizada a partir da extração do DNA, amplificação e sequenciamento de primer específico para *Curvularia lunata*. A transmissão foi avaliada a partir da semeadura de sementes sem tratamento com fungicidas, onde ao final de 40 dias observou-se sintomas típicos de Mancha de *Curvularia*. A patogenicidade foi avaliada a partir da inoculação de suspensão de conídios nas folhas de plantas saudáveis, observando ao final de 10 dias, se houve sintomas do patógeno. As observações morfológicas permitiram caracterizar as

colônias em sua maioria com formato dos bordos regular e aspecto cotonoso com coloração em tons de cinza, sendo o reverso da colônia com pigmentação escura e presença de conídios aos 10 dias de incubação. Os conídios apresentaram formato liso e curvado tendo em sua grande maioria a presença de hilo, com média de 2,50 septos por conídio e tamanho médio de 30,62 μm de comprimento e 13,65 μm de largura. Através de características morfológicas e moleculares, o fungo identificado com elevada incidência associado às sementes de *Andropogon* coletadas em diferentes regiões produtoras agrícolas, trata-se de *Curvularia lunata*. Esse fungo é transmitido para as plantas de *Andropogon* L. via semente, além de ser patogênico a esta espécie de gramínea forrageira, causando manchas necróticas nas folhas da planta.

Palavras-chave: gramínea forrageira; Mancha foliar de *Curvularia*; diagnose; filogenia; patógeno.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF ISOLATES *Curvularia lunata*, OBTAINED BY ANDROPOGON SEEDS

Curvularia genus is composed of more than 40 species are distinguished by differences often evident in the conidia, colony morphology and number of septa. The recognition of main characteristics of the *Curvularia* genus is relatively easy, however, the taxonomic identification at species level is in turn complicated by the vague descriptions and illustrations absence in older works, thus necessitating molecular studies for the correct identification of these organisms. Several *Curvularia* species are associated with diseases in plants, mainly causing foliar spots in forage grasses, especially in *Andropogon* L. In this context, the study aim was to characterize the morphological and molecular diversity of *Curvularia* sp. associated with Andropogon grass seeds, as well to evaluate the transmission and pathogenicity capacity of this fungus in Andropogon. plants. Ten *Curvularia* sp. isolates were obtained from Andropogon grass seeds coming agricultural producing regions of Tocantins State and one municipality of Pará State. Morphological characterization was performed from colonies and conidia observations. The molecular characterization was performed from the DNA extraction, amplification and primer sequencing specific to *Curvularia lunata*. Transmission was evaluated from seed sowing whitout treatment with fungicides, where at the end of 40 days was observed typical leaf spot symptoms of *Curvularia*. The pathogenicity was evaluated from the inoculation of conidia suspension on healthy plants leaves, observing at the end 10 days, if there were pathogen symptoms. The morphological observations allowed to characterize the colonies in most of them with a regular border shape and a

cottony appearance with grayish coloration, being the colony reverse with dark pigmentation and conidia presence at 10 days of incubation. The conidia presented a smooth and curved shape, the majority of which contained the thread presence, with a mean of 2.50 septa per conidia and a mean size of 30.62 μm in length and 13.65 μm in width. Through morphological and molecular characteristics, the fungus identified with high incidence associated with *Andropogon* seeds collected in different agricultural producing regions, is *Curvularia lunata*. This fungus is transmitted to plants *Andropogon* L. by seed, in addition to being pathogenic to this species of forage grass, causing necrotic spots on the plant leaves.

Key-words: forage grass; leaf spot of *Curvularia*; diagnosis; phylogeny; pathogen.

INTRODUÇÃO

O gênero *Curvularia* foi descrito inicialmente com a espécie *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. Nele, encontram-se espécies da família Dematiaceae que apresentam conidióforos macronematosos, mononematosos, diretos ou flexuosos, frequentemente geniculados e algumas vezes nodosos. Estas espécies apresentam ainda células conidiogênicas politétricas, integradas, terminais e simpodiais, fragmoconídios solitários, acropleurógenos por proliferação subterminal do conidióforo. Este apresenta cor oliva a castanho, tem formato elipsoide, cilíndrico, obovoide ou piriforme, com três ou mais septos transversais. Os conídios são muitas vezes desigualmente curvos devido ao alargamento de uma ou duas células centrais, que apresentam septos rígidos e hilo truncado ou protuberante (Ellis, 1971).

Curvularia é composto por mais de 40 espécies que se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia (Zhang-Meng et al., 2004; Chung, 2005). A variabilidade morfológica observada nos fungos deste gênero permitiu a organização deste em três grupos principais: “geniculata” com a espécie *Curvularia geniculata* (Tracy e Earle) Boedijn, “lunata” com a espécie *C. lunata* (Tracy e Earle) Boedijn e “maculans” com a

espécie *Curvularia maculans* (Tracy e Earle) Boedijn, sendo a principal diferença entre estas espécies a forma dos conídios e o número de septos (Corbetta, 1964).

O reconhecimento das características principais deste gênero é relativamente fácil, no entanto, a identificação taxonômica a nível de espécie, é por sua vez complicada pelas descrições vagas e ausência de ilustrações em trabalhos mais antigos, inconstância de características morfológicas e biométricas dos conídios, influenciada por diferentes condições em que ocorre o crescimento, e sobreposição dos valores de medidas apresentadas por diferentes autores (Tsuda e Ueyama, 1982; Hosokawa et al., 2003). Deste modo, a identificação molecular é um diferencial para auxiliar o reconhecimento das diferentes espécies deste fungo. Estudos de sequenciamento de regiões específicas, codificadoras ou não, do genoma de fungos, têm auxiliado significativamente na correta classificação destes organismos.

As espécies de *Curvularia* consistem em saprófitas, endofíticas e patogênicas (Sanchez-Marquez et al., 2008; Condon et al., 2014), sendo a maioria dessas espécies patogênicas, causando perdas na produção agrícola. Nos vegetais, há vários exemplos de enfermidades provocadas por estes fungos, apresentando principalmente manchas necróticas foliares em diversas famílias de plantas, sobretudo Poaceae

(Toledo et al., 1990; Yago et al., 2011; Silva et al., 2014; Santos et al., 2014; Kusai et al., 2016). A doença ocorre principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (Sivanesan, 1987).

Segundo Dasgupta (2005), várias espécies de *Curvularia* são associadas à doenças em plantas, como *Oryza sativa* (Silva et al., 2014; Kusai et al., 2016; Majeed et al., 2016), *Solanum lycopersicum* (Iftikhar et al., 2016), *Solanum paniculatum* (Assunção et al., 2006), plantas ornamentais (Palmucci e Amat, 2004; Nechet e Halfeld-Vieira, 2005; Furtado et al., 2007), *Zea mays* (Shan et al., 2008; Hou et al., 2012; Gao et al., 2014; Liu et al., 2015) e *Triticum* L. (Ahmad et al., 2006). Também foram relatadas espécies de *Curvularia* causando manchas foliares em várias gramíneas forrageiras (Lima e Furtado, 2007; Yago et al., 2011; Santos et al., 2014), sobretudo em *Andropogon* L. (Toledo et al., 1990).

O gênero *Andropogon* pertence à subfamília Panicoideae, sendo um dos gêneros mais representativos da tribo Andropogoneae. Esta tribo é uma das maiores da família Poaceae, com 85 gêneros e 960 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil, as Andropogoneae compreendem 10% do total de espécies da família e ocorrem em todas as regiões, sendo as espécies, em sua maior parte, perenes e de hábito cespitoso, destacando-se

especialmente por suas inflorescências plumosas (Zanin e Longhi-Wagner, 2006).

O Estado do Tocantins possui área de aproximadamente 7,5 milhões de hectares com pastagens, destacando-se a presença do gênero *Andropogon* (Seagro, 2015). Além disso, esta gramínea forrageira possui presença relevante em áreas alteradas, margens de estradas e clareiras (Zanin e Longhi-Wagner, 2006), podendo servir como planta invasora devido sua fácil disseminação de sementes e ainda como hospedeira alternativa de patógenos causadores de doenças em culturas de interesse econômico.

Através da análise sanitária de sementes de *Andropogon* L. coletadas em diferentes localidades dos estados do Tocantins e Pará, foi observado uma incidência significativa de fungos pertencentes ao gênero *Curvularia* associado às sementes. Aliado a isto, é sabido que há pouca informação relacionada às doenças que afetam espécies forrageiras do gênero *Andropogon*, tanto na literatura estrangeira como nacional. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar a diversidade morfológica e molecular de isolados de *Curvularia* sp. associados a sementes de *Andropogon*, como também, avaliar a transmissão e patogenicidade de *Curvularia* sp. em plantas de *Andropogon* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Foram utilizados dez isolados monospóricos de *Curvularia* sp. (Tabela 1), obtidos a partir de sementes de *Andropogon* provenientes de regiões produtoras agrícolas do Tocantins e de um município do Estado do Pará.

Tabela 1. Isolados de *Curvularia* sp. obtidos a partir de sementes de *Andropogon*.

Amostra	Isolado	Município/Estado
1	ARA	Araguacema – TO
2	ARG	Araguaína – TO
3	BJN	Brejinho de Nazaré – TO
4	CAS	Caseara – TO
5	GUR	Gurupi – TO
6	LGC	Lagoa da Confusão – TO
7	MAR	Marianópolis – TO
8	PAL	Palmas – TO
9	SUC	Sucupira – TO
10	SMB	Santa Maria das Barreiras - PA

As análises morfológicas e moleculares dos fungos foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Controle Biológico de Doenças da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi – TO.

Caracterização morfológica

A identificação morfológica foi realizada a partir de observações macro e micromorfológicas utilizando-se como base as características descritas por Ellis (1971) e Sivanesan (1987) para o gênero *Curvularia*. Os isolados foram crescidos em placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA), em seguida incubados por 10 dias a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo 10 isolados de localidades distintas, em duas repetições.

Posteriormente, foram observadas as características das colônias e dos conídios. Foram coletados 50 conídios ao acaso com alça de platina e transferidos para lâmina, onde foram visualizados com auxílio de microscópio ótico (40X) acoplado a uma câmera, sendo projetados e mensurados a partir do *software* TSView7. As características morfológicas analisadas foram: aspecto do micélio (cotonoso ou ralo), formato dos bordos (regular ou irregular), coloração da colônia (preto, verde musgo ou cinza), reverso da colônia (com ou sem pigmentação escura) e também a presença ou ausência de conídios em BDA, após 10 dias de incubação.

Após a realização da análise de variância, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de

probabilidade, utilizando-se o *software* SISVAR (Ferreira, 2014).

Caracterização molecular

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir da raspagem do micélio e estruturas reprodutivas formadas em monoculturas dos isolados de *Curvularia* sp. previamente identificados na análise morfológica, e cultivados em BDA durante 10 dias, em câmara com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de bisturi estéril o micélio foi transferido para tubos de 2 mL, sendo que a biomassa obtida nesse processo foi macerada em nitrogênio líquido com bastão de vidro. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo baseado em CTAB (Murray e Thompson, 1980), com algumas adaptações a seguir.

No tubo contendo a amostra de micélio pulverizado, foram adicionados 1000 µL de tampão de extração CTAB (2% p/v de CTAB; 2,5% p/v de PVP; 2 M de NaCl; 100 nM Tris-HCL com pH 8,0; 25 mM EDTA com pH 8,0) e 2% β-mercaptoetanol, após homogeneização, as amostras foram incubadas por 40 minutos a 65 °C. Por seguinte, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11000 g e logo após, coletou-se a fase aquosa (~600 µL) transferindo para um novo tubo de 2 mL. Foram acrescentados 600 µL da mistura de

Clorofórmio / Álcool Isoamílico gelado (24:1 v/v) em cada tubo misturando-se manualmente por agitação e levados para centrífuga por 10 minutos a 11000 g. A fase aquosa foi removida para novos tubos (1,5 mL), onde o RNA presente foi degradado por tratamento com RNase A (100 µg/mL) durante 30 minutos a 37 °C. Foi adicionado 240 µL de Álcool Isoprópilico puro e gelado e o material foi incubado a -20 °C *overnight*. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 11000 g durante 20 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Então foi acrescentado 400 µL de etanol absoluto e centrifugado a 11000 g, durante 5 minutos. O álcool absoluto foi descartado e o tubo invertido sobre uma folha de papel absorvente. O sedimento foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura. A concentração de DNA e a pureza foram medidas usando um espectrofotômetro.

Amplificação de primer específico para *Curvularia lunata*

Para a amplificação dos isolados, foram utilizados os primers P1 (forward: 5'-ATGGACGAGAACAACAGGATAACGA-3') e P2 (reverse: 5'-CTACCAGCATTTAAGTTTACTCCAG-3') baseados na sequência nucleotídica do gene da proteína Ras *Clg2p* descrito por Hou et al. (2012), específico para *C. lunata*. O volume total das reações de amplificação foi de 50 µL, contendo 25 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon III PCR

Enzymes & Reagents), 5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 µM, 10 µL de água ultrapura e 5 µL de DNA das amostras. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador (Techne TC-5000) programado para um ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 40 segundos a 55 °C (anelamento), 30 segundos a 72 °C (extensão) e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C (extensão final).

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (TAE 1X) corado com Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain (Neobio), observada através de um fotodocumentador (Gel Logic 112). A concentração do DNA foi mensurada em espectrofotômetro.

Sequenciamento

Os produtos de amplificação das amostras de *C. lunata* foram purificados utilizando-se o kit de purificação Purelink® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e submetidos ao sequenciamento direto utilizando o iniciador P1 (forward). Os produtos foram enviados para sequenciamento, pelo método Sanger, no Laboratório de Sequenciamento de DNA da Universidade Católica de Brasília.

Após obtidas as sequências, estas foram editadas através do *software* BioEdit (versão 7.1), em seguida foram

identificadas sequências similares usando a ferramenta BLASTn do GenBank. Após o alinhamento, estas sequências foram processadas no *software* MEGA (versão 5.0) (Tamura et al., 2011), para que fosse elaborada a árvore filogenética dos isolados, utilizando o método de Máxima Verossimilhança, pelo modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros com 2000 replicatas de *bootstrap*.

Transmissão e patogenicidade de *Curvularia* sp. em *Andropogon* L.

Após a caracterização molecular e confirmação da espécie de *Curvularia* sp. foi avaliada a capacidade de transmissão do fungo via semente-plântula, além da capacidade deste patógeno em infectar plantas de *Andropogon* L.

Para o teste de transmissão utilizou-se um total de 200 sementes de cada amostra sem tratamento com fungicidas. A semeadura ocorreu em vasos com capacidade para 5 L, utilizando-se como substrato a mistura de areia, solo e substrato comercial autoclavados na proporção 1:1:1. Os vasos foram colocados com 1 m de distância entre cada, para evitar contaminações entre parcelas. O material foi mantido em casa de vegetação, sendo a umidade dos vasos mantida na capacidade de campo. Ao final de 40 dias após a semeadura foram realizadas as avaliações das plantas com sintomas de mancha de

Curvularia. Para a confirmação dos Postulados de Koch, fragmentos de folhas que apresentaram sintomas foram isolados em meio BDA. Para confirmação dos resultados o teste de transmissão foi repetido.

A patogenicidade dos isolados de *Curvularia* sp. oriundos das sementes de *Andropogon* foi avaliada por meio da inoculação do fungo em plantas saudáveis. Aos 25 dias após a semeadura das plantas, com auxílio de um borrifador manual, foram pulverizadas nas folhas das plantas suspensões com conídios de *Curvularia* sp. na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} , ajustada com Câmara de Neubauer. Plantas testemunhas foram borrifadas com água e mantidas sob mesma condição. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida escura por 36 horas, e em seguida foram alocadas em casa de vegetação, onde após 10 dias foram realizadas as avaliações de patogenicidade. Quando visualizado sintomas no tecido inoculado, o fungo foi reisolado e cultivado em meio BDA (Alfenas e Mafia, 2007), com a finalidade de confirmação do agente causal, cumprindo-se os Postulados de Koch. Para proporcionar maior consistência aos resultados obtidos, o teste de patogenicidade foi repetido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica

O aspecto do micélio das colônias fúngicas apresentou pouca variação entre cotonoso e ralo, sendo apenas o isolado LGC com aspecto ralo. O formato dos bordos das colônias também apresentou variação entre regular e irregular ao longo do seu crescimento. Os isolados BJN, PAL e SMB apresentaram formato irregular. Houve prevalência da coloração das colônias de tons cinza em todos os isolados obtidos, e ainda foi observado pigmentação escura no reverso da colônia. Após 10 dias de incubação, observou-se a presença de conídios de coloração marrom a escuro (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização morfológica da colônia de isolados de *Curvularia* sp. obtidos a partir de sementes de *Andropogon*.

Isolados	Aspecto do micélio	Formato dos bordos	Coloração da colônia	Reverso da colônia	Conídios
ARA	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
ARG	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
BJN	Cotonoso	Irregular	Cinza	Com pigmentação	Presença
CAS	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
GUR	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
LGC	Ralo	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
MAR	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
PAL	Cotonoso	Irregular	Cinza	Com pigmentação	Presença
SUC	Cotonoso	Regular	Cinza	Com pigmentação	Presença
SMB	Cotonoso	Irregular	Cinza	Com pigmentação	Presença

ARA: Araguacema; ARG: Araguaína; BJN: Brejinho de Nazaré; CAS: Caseara; GUR: Gurupi; LGC: Lagoa da Confusão; MAR: Marianópolis; PAL: Palmas; SUC: Sucupira; SMB: Santa Maria das Barreiras.

Em relação às características qualitativas das estruturas reprodutivas dos isolados de *Curvularia* sp., os conídios se mostraram semelhantes em sua maioria. Todos os isolados

apresentaram conídios lisos e curvados, variando apenas na presença ou ausência de hilo. A presença ou ausência de hilo varia conforme a idade do conídio, sendo que conídios mais velhos possuem hilo proeminentes e em conídios mais jovens não são proeminentes. Os isolados de LGC, PAL, SUC e SMB demonstraram variação de 60 a 90% da presença de hilo nos conídios. Quanto ao número de septos por conídio, houve efeito significativo entre os isolados analisados, sendo que MAR e PAL apresentaram maior número de septos em relação aos demais isolados, com média de 3,30 e 3,40 septos por conídio, respectivamente. O isolado SMB apresentou o menor número de septos por conídio (2,20). Os demais isolados apresentaram média variando entre 2,80 e 2,90 septos por conídio. Os isolados de *Curvularia* sp. demonstraram variação quanto ao comprimento e largura dos conídios, com média de 30,62 μm de comprimento e 13,65 μm de largura (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização morfológica de conídios isolados de *Curvularia* sp. obtidos a partir de sementes de Andropogon.

Isolados	Liso ou Rugoso	Hilo	Forma	Número de septos	Tamanho do conídio	
					Comprimento (µm)	Largura (µm)
ARA	Liso	100%	Curvado	2,90 b	22,57 c	9,61 c
ARG	Liso	100%	Curvado	2,80 b	28,48 b	11,64 b
BJN	Liso	100%	Curvado	2,80 b	30,33 b	15,74 a
CAS	Liso	100%	Curvado	2,90 b	21,62 c	11,50 b
GUR	Liso	100%	Curvado	2,80 b	22,18 c	11,53 b
LGC	Liso	90%	Curvado	2,90 b	23,54 c	12,56 b
MAR	Liso	100%	Curvado	3,30 a	38,54 a	15,75 a
PAL	Liso	70%	Curvado	3,40 a	40,20 a	15,48 a
SUC	Liso	70%	Curvado	2,90 b	23,57 c	11,53 b
SMB	Liso	60%	Curvado	2,20 c	20,64 c	12,29 b
Média				2,50	30,62	13,65

ARA: Araguacema; ARG: Araguaína; BJN: Brejinho de Nazaré; CAS: Caseara; GUR: Gurupi; LGC: Lagoa da Confusão; MAR: Marianópolis; PAL: Palmas; SUC: Sucupira; SMB: Santa Maria das Barreiras. Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As características morfológicas observadas na análise microscópica sugerem que o gênero fúngico isolado das sementes de Andropogon, trata-se de *C. lunata*, semelhante ao descrito na literatura (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987; Assunção et al., 2006; Furtado et al., 2007; Iftikhar et al., 2016). Por exemplo, Silva et al. (2014) e Kusai et al., (2016), caracterizaram colônias de *C. lunata* em BDA com aspecto cotonoso e coloração preto-acinzentado. Ainda para estes autores, os conídios apresentaram

três septos transversais, com célula mediana mais volumosa, curvatura pronunciada e hilo escuro em uma das extremidades, sendo estes mensurados com dimensões média de 20,62 x 8,58 μm . Resultados semelhantes para *C. lunata* também foram encontrados por Lima e Furtado (2007), onde observaram conídios solitários com três septos, frequentemente curvados na terceira célula, com dimensões de 18-31 x 9-15 μm , além de colônias pulverulentas a feltrosas, cinzentas a negras com frente de crescimento regular.

Estudos demonstram variação morfológica dos conídios quando são produzidos em diferentes substratos (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987). Dessa forma, é possível observar a variação morfológica de conídios de uma mesma espécie em relação ao número de septos e tamanho dos conídios (Figura 1).

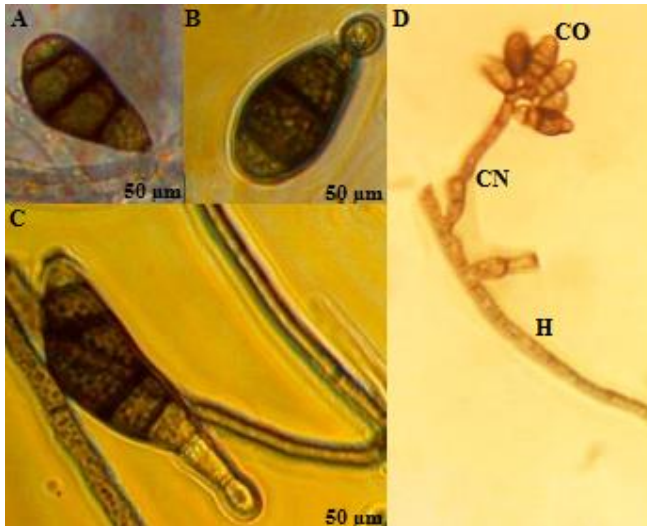


Figura 1. Estruturas morfológicas de isolados de *Curvularia lunata* obtidos a partir de sementes de *Andropogon* (A e B: Estruturas microscópicas de conídios; C: Estrutura microscópica da germinação do conídio.; D: Estrutura microscópica de *Curvularia* sp., sendo H: Hifa, CO: Conidióforo e CN: Conídios).

As estruturas morfológicas de *C. lunata* podem ser observadas a partir de imagens de microscópio (Figura 1). A figura 1A e 1B demonstram a morfologia das estruturas de reprodução do fungo, sendo conídios lisos com pequena curvatura devido ao alargamento das células centrais, três septos transversais e a presença de hilo protuberante ou truncado na última célula. A figura 1C apresenta um conídio com quatro septos transversais e tubo germinativo. Na figura 1D é possível visualizar uma hifa com conidióforo simples de coloração escura

apresentando conídios na parte apical. A característica mais marcante nesta espécie é a condição curva dos conídios na terceira célula que surge mais larga que as restantes, sendo normalmente a célula apical mais larga que a basal (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987).

Existem dois fatores que dificultam a correta identificação do agente causal, sendo a subjetividade de algumas características morfológicas de importância taxonômica, como exemplo, a protuberância do hilo, além do fato de essa característica ser pouco informativa filogeneticamente (Sun et al., 2003) e a alta variabilidade constatada entre isolados de *Curvularia* (Paula et al., 2000). Segundo Sun et al. (2003), apenas a análise morfológica deste gênero não garante o suporte para uma identificação precisa, necessitando assim, de análises baseada em métodos moleculares.

Caracterização molecular

A amplificação por PCR, utilizando os primers P1 e P2, resultou em fragmentos de aproximadamente 870 pares de base para todas as amostras de *C. lunata* (Figura 2). Nenhuma amplificação foi observada utilizando isolado de outra espécie fúngica (controle negativo). Este resultado sugere que todos os isolados detectados em sementes de *Andropogon* sejam da espécie *C. lunata*. Estas informações corroboram com os dados

obtidos por Hou et al. (2012), que utilizando os mesmos primers encontraram fragmentos entre 827 e 870 pb para a região do gene da proteína Ras *Clg2p* de isolados de *C. lunata* isolados de folhas de milho.

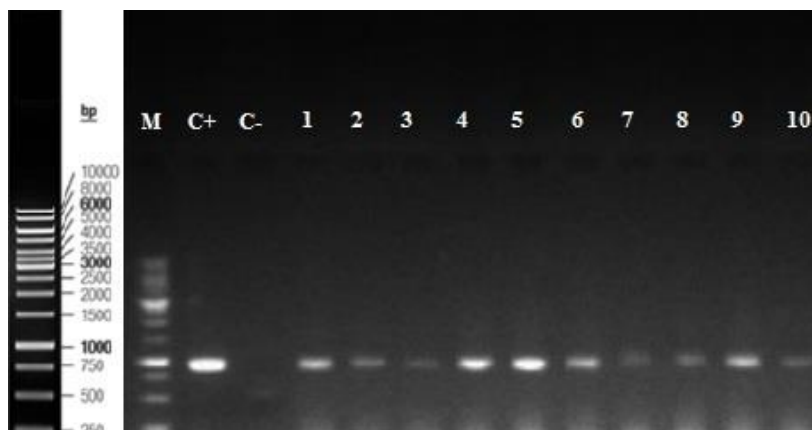


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação com primers específicos para *Curvularia lunata* (M: Marcador molecular de 1Kb; C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; 1: Araguacema; 2: Araguaína; 3: Brejinho de Nazaré; 4: Caseara; 5: Gurupi; 6: Lagoa da Confusão; 7: Marianópolis; 8: Palmas; 9: Sucupira; 10: Santa Maria das Barreiras).

A região do gene da proteína Ras *Clg2p* de *C. lunata* foi sequenciada e depositada no Genbank (KY273134) para melhor caracterização do isolado, fornecendo subsídio para complementar a identificação com a análise morfológica. A sequência de nucleotídeos dos dez isolados de *C. lunata* obtidos

de sementes de *Andropogon* partilhou identidade de 89% com a sequência do isolado de *C. lunata* (teleomórfico: *Cochliobolus lunata*) (HQ655805) de milho proveniente da China, disponível no GenBank. Conforme esperado, a análise filogenética demonstrou que todas as sequências de DNA de *C. lunata* obtidos de sementes de *Andropogon* foram enquadradas no mesmo ramo que o isolado de referência descrito por Hou et al. (2012) com confiabilidade (bootstrap) de 99% (Figura 3). A árvore demonstra ainda as relações filogenéticas da proteína *Clg2p* de *C. lunata* com outras proteínas Ras de fungos relacionados como *Bipolaris victoriae*, *B. oryzae*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Paraphaeosphaeria sporulosa*.

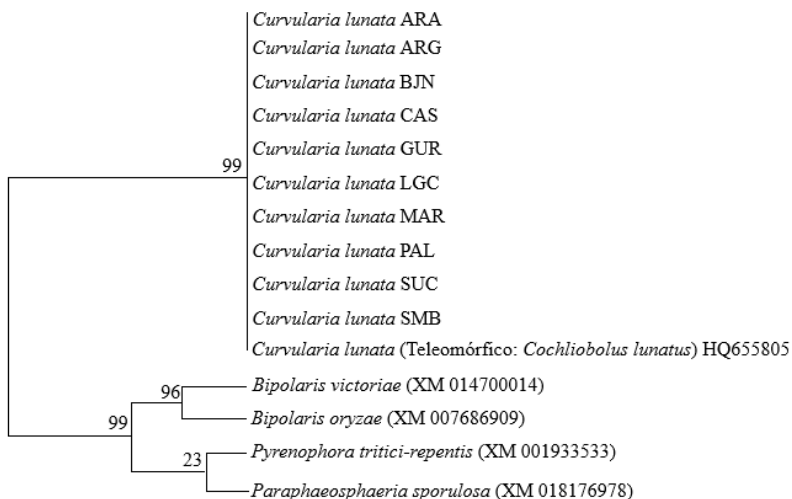


Figura 3. Árvore filogenética das sequências representativas do gene da proteína Ras *Clg2p* amplificadas a partir do DNA de *Curvularia lunata* isolados de capim Andropogon, derivada do Método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros. Os números junto aos nós indicam o valor de “bootstrap” para 2000 réplicas. Sequência de nucleotídeos de *Bipolaris victoriae*, *Bipolaris oryzae*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Paraphaeosphaeria sporulosa* como *outgroup*.

O desenvolvimento de primers especiais usando outros genes-alvo para a melhor detecção de isolados de *C. lunata*, foi obtido com sucesso por Hou et al. (2012) e reproduzida neste trabalho. O gene da proteína Ras *Clg2p* tem sido utilizada como um marcador molecular para identificar alguns fungos pois os *exons* são conservados e *introns* variáveis em quase todas as

espécies fúngicas. Demonstrando potencial na utilização em estudos de detecção de diferentes espécies fúngicas.

O conhecimento detalhado do agente causal de determinada doença é essencial para que estudos epidemiológicos possam resultar em desenvolvimento de estratégias eficientes de manejo. Especificamente, busca-se conhecer as espécies comumente associadas à doença, bem como compreender o relacionamento filogenético do patógeno e a dinâmica de suas populações (Kohn, 2004; Jeger e Pautasso, 2008). Utilizando uma combinação de dados morfológicos, com informações moleculares foi possível fazer uma identificação confiável de todos os isolados de *C. lunata* obtidos a partir de sementes de *Andropogon*.

Transmissão e patogenicidade de *Curvularia lunata* em *Andropogon* L.

As plantas provenientes de sementes das regiões de Araguacema, Araguaína, Brejinho de Nazaré, Caseara, Gurupi, Marianópolis, Palmas e Sucupira apresentaram aos 40 dias após a semeadura sintomas da doença Mancha de *Curvularia*, causada pelo fungo *C. lunata*, com pequenas manchas necróticas elípticas e ligeiramente ovaladas de bordos avermelhados e centro pardo-claro (Tabela 4). Estes mesmos sintomas também foram evidenciados no teste de patogenicidade, após a

inoculação de *C. lunata*, em plantas de *Andropogon* em todas as amostras analisadas.

Tabela 4. Transmissão via semente-plântula e patogenicidade de *Curvularia lunata* em *Andropogon* L.

Amostra/Isolado	Transmissão	Patogenicidade
1 ARA	+	+
2 ARG	+	+
3 BJN	+	+
4 CAS	+	+
5 GUR	+	+
6 LGC	-	+
7 MAR	+	+
8 PAL	+	+
9 SUC	+	+
10 SMB	-	+

(+) Fungo transmitido via semente-plântula e patogênico ao *Andropogon* L.

Apenas as plantas oriundas de sementes coletadas nos municípios de Lagoa da Confusão e Santa Maria das Barreiras não apresentaram transmissão de *C. lunata*. É sabido que a infecção de sementes não assegura a transmissão do patógeno, porque os fatores ligados ao ambiente e ao hospedeiro podem influenciar e, portanto, devem ser considerados (Machado, 1988; Machado, 1994). Lasca et al. (2004), Elisabeth et al. (2008) e Silva et al. (2014) apresentaram evidências quanto à transmissão de *Curvularia* sp. a partir de sementes de outras espécies de gramíneas, *Brachiaria*, arroz, sorgo e milho. No

continente Africano, Toledo et al. (1990), relataram espécies do gênero *Curvularia* causando manchas foliares em *Andropogon gayanus* e *Andropogon tectorum*.

CONCLUSÕES

Baseado em marcadores morfológicos e moleculares, o fungo identificado com elevada incidência associado às sementes de *Andropogon* coletadas em diferentes regiões produtoras agrícolas, trata-se de *Curvularia lunata*;

Curvularia lunata é transmitido para as plantas de *Andropogon* via semente, sendo patogênico a esta espécie de gramínea forrageira, causando manchas necróticas foliares.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; IRAM, S.; CULLUM, J. Genetic variability and aggressiveness in *Curvularia lunata* associated with rice-wheat cropping areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, v.38, n.2, p.475-485, 2006.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em Fitopatologia. Viçosa: UFV, 382p. 2007.

ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; AMORIM, E. P. R.; MUNIZ, M. F. S.; ENDRES, L. Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no Estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.386-387, 2006.

CHUNG, W. H. A new species of *Curvularia* from Japan. *Mycotaxon*, v.91, p. 49-54, 2005.

CONDON, B. J.; WU, D.; KRASEVEC, N.; HORWITZ, B. A.; TURGEON, B. G. Comparative genomics of *Cochliobolus phytopathogens*. In: DEAN, R. A.; LICHEN-PARK, A.; KOLE, C. (eds) *Phytopathogens genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens*. Springer: New York, p.41-67, 2014.

CORBETTA, G. Rassegna der specie Del genere *Curvularia*. *Riso*, v.4, p.3-23, 1964.

DASGUPTA, S.; SAHA, D.; SAHA, A. Levels of common antigens in determining pathogenicity of *Curvularia eragrostidis* in different tea varieties. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.1084-1092, 2005.

ELISABETH, Z. P.; PACO, S.; VIBEKE, L.; PHILIPPE, S.; IRÉNÉE, S.; ADAMA, N. Importance of seed-borne fungi of Sorghum and pearl millet in Burkina Faso and their control using plant extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 11, n. 3, p. 321-331, 2008.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, p.452, 1971.

FERREIRA, D. F. *Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FURTADO, D. C. M.; AMORIM, E. P. R.; GALVÃO, A. L. B.; CARNAÚBA, J. P.; OLIVEIRA, M. N. Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilus ananassae* no Estado de Alagoas. Summa Phytopathologica, v.33, n.2, p.201, 2007.

GAO, S.; LI, Y.; GAO, J.; SUO, Y.; FU, K.; LI, Y.; CHEN, J. Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. BMC Genomics, v.15, p.627, 2014.

HOSOKAWA, M.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. Mycoscience, v.44, p.227-237, 2003.

HOU, J. M.; MA, B. C.; ZUO, Y. H.; GUO, L. L.; GAO, S. G.; WANG, Y. Y.; LIU, T. Rapid and sensitive detection of *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot based on its *Clg2p* gene using semi-nested PCR. Letters in Applied Microbiology, v. 56, p. 245-250, 2012.

IFTIKHAR, S.; SHAHID, A. A.; ALI, S. First report of *Curvularia lunata* var. *aeria* causing leaf blight on tomato in Pakistan. Journal of Plant Pathology, v.98, n.1, p.171-185, 2016.

JEGER, M.; PAUTASSO, M. Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. European Journal of Plant Pathology, v.122, p.111-126, 2008.

KOHN, L. M. Applying comparative genomics to plant disease epidemiology. Phytoprotection, v.85, p.45-48, 2004.

KUSAI, N. A.; AZMI, M. M. Z.; ZULKIFLY, S.; YUSOF, M. T.; ZAINUDIN, N. A. I. M. Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. Rendiconti Lincei: Scienze Fisiche e Naturali, v.27, p.205-214, 2016.

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. Revista Arquivos do Instituto Biológico, v. 71, n. 4, p. 465-472, 2004.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do género *Curvularia* (Fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. *Portugaliae Acta Biologica*, v.22, p.145-146, 2007.

LIU, T.; ZHAO, F. Z.; WNAG, Y. Y.; HOU, J. M.; LIU, L. Z.; SHEN, Y. Q.; LIU, Z.; ZHANG, H. T.; ZUO, Y. H. Comparative analysis of phylogenetic relationships, morphologies and pathogenicities among *Curvularia lunata* isolates from maize in China. *Genetics and Molecular Research*, v.14, n.4, p.12537-12546, 2015.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. *Revista Anual de Patologia de Plantas*, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL-/FAEPE, 107p. 1988.

MAJEED, R. A.; SHAHID, A. A.; ASHFAQ, M.; SALEEM, M. Z.; HAIDER, M. S. First report of *Curvularia lunata* causing brown leaf spots of rice in Punjab, Pakistan. *Plant Disease*, v.100, n.1, p.219, 2016.

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

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. *Curvularia lunata* var. *aeria* causando queima foliar em *Zoysia japonica*. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n.4, 2005.

PALMUCCI, H.; AMAT, G. Dieback foliar y podredumbre seca de grama bahiana ocasionados por *Curvularia lunata* em Argentina. *International Journal of Experimental Botany*, p.275-279, 2004.

PAULA, H.; MICHEREFF, S. J.; COSTA, V. S. O.; LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S. M. A. Variabilidad de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que causan atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en Pernambuco, Brasil. *Boletim Micológico*, v.11, p.85-92, 2000.

SANCHEZ-MARQUEZ, S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, v.33, p.87-100, 2008.

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. 54-62, 2014.

SEAGRO. Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins. Cenário e perspectivas para o agronegócio da pecuária tocantinense. 2015. Disponível em: <<http://seagro.to.gov.br/agronegocios/pecuaria/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

SHAN, F. Y.; SHI, W.; LIU, Y.; ZHANG, J.; DONG, J. Parasitic fitness and RAPD analysis of *Curvularia* species on corn. *Journal of Agricultural University of Hebei*, v.31, p.37-41, 2008.

SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, E. K. C.; PEREIRA, T. S. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. *Revista Ceres*, v.61, n.4, p.511-517, 2014.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exsorohilum* and their teleomorph. *Mycological Papers*, v. 158, p. 1-261, 1987.

SUN, G.; OIDE, S.; TANAKA, E.; SHIMIZU, K.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Species separation in *Curvularia* “*geniculata*” group inferred from *Brnl* gene sequences. *Mycoscience*, v.44, p.239-244, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TOLEDO, J. M.; VERA, R.; LASCANO, C.; LENNÉ, J. M. *Andropogon gayanus* Kunth: A grass for tropical acid soils. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali – Colômbia, 382p. 1990.

TSUDA, M.; UEYAMA, A. *Pseudocochliobolus verruculosus* and variability of conidium morphology. *Mycologia*, v.74, p.563-568, 1982.

YAGO, J. I.; ROH, J. H.; BAE, S. D.; YOON, Y. N.; KIM, H. J.; NAM, M. H. The effect of seed-borne mycoflora from sorghum and foxtail millet seeds on germination and disease transmission. *Mycobiology*, v. 39, n. 3, p. 206-218, 2011.

ZANIN, A.; LONGHI-WAGNER, H. M. Sinopse do gênero *Andropogon* L. (Poaceae-Andropogoneae) no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 2, p. 289-299, 2006.

ZHANG-MENG; ZHANG-TIAN, Y.; WU-YUE, M. A new name and a new variety in *Curvularia*. *Mycosystema*, v.23, p.177-178, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sementes de *Andropogon* transportam fungos com capacidade de serem transmitidos via semente-plântula e causar danos em espécies de plantas de valor econômico para o Estado do Tocantins, além de serem patogênicos à própria planta. Com isto, a patologia de sementes torna-se fundamental no estudo destes patógenos associados à sementes, determinando o potencial de transporte e transmissão de microrganismos, bem como na identificação da introdução de novos patógenos em áreas isentas de doenças.

É importante considerar que o plantio de sementes livres de patógenos é um dos métodos mais eficientes no controle de doenças. As medidas para reduzir ou eliminar os patógenos iniciam-se no campo de produção de sementes com manejo adequado, estendendo-se até o seu beneficiamento e armazenamento. Dessa forma, há a necessidade da realização de estudos sobre o manejo integrado de doenças em forrageiras tropicais, priorizando aquelas que afetam a qualidade das sementes. Sendo de suma importância a inclusão de padrões de sanidade para estas sementes utilizadas no Brasil, incluindo a necessidade de registro de mais produtos fitossanitários para o tratamento de sementes de gramíneas forrageiras.

APÊNDICE

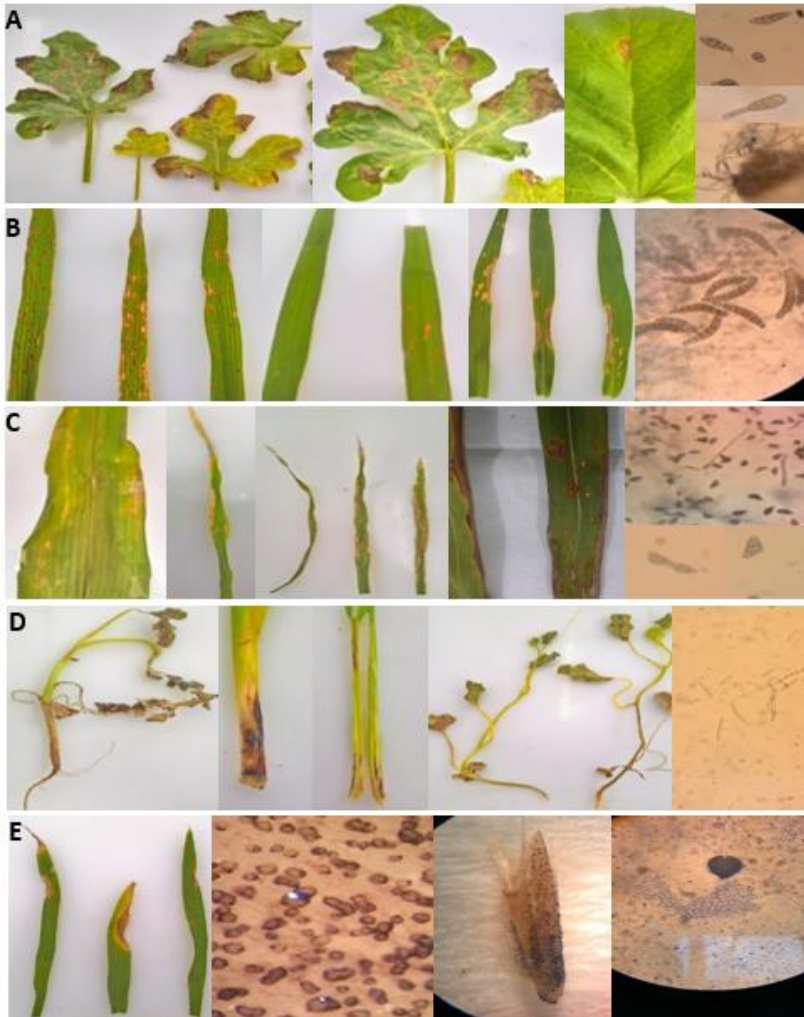


Figura 1. A: Sintomas de mancha de *Alternaria* em folhas de melancia, melão e estruturas microscópicas de conídios de *Alternaria* sp. B: Mancha de *Bipolaris* em folhas de arroz, capins andropogon e mombaça e conídios de *Bipolaris* sp. C: Mancha de *Curvularia* em folhas de milho, arroz, capins quicúia e andropogon e conídios de *Curvularia* sp. D: Murcha de *Fusarium* em mudas de melancia, sorgo e melão e estruturas microscópicas de conídios de *Fusarium* sp. E: Mancha de *Phoma* em folhas de capim quicúia e estruturas macroscópicas e microscópicas de *Phoma* sp.

