

**RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PATOLOGIA DE
SEMENTES: NOVAS APLICAÇÕES**

FLÁVIO HENRIQUE LINHARES MAGALHÃES

2005

FLÁVIO HENRIQUE LINHARES MAGALHÃES

**RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PATOLOGIA DE SEMENTES: NOVAS
APLICAÇÕES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

Para muitos microrganismos, os requerimentos exatos em potencial hídrico são ainda desconhecidos, mas há evidências de que os microrganismos diferem entre si em relação ao potencial hídrico requerido. Além disso, os requerimentos de um organismo específico variam com a temperatura, pH e vários outros fatores. Geralmente, quanto mais favoráveis forem a nutrição e o ambiente, menor o potencial hídrico de que o microrganismo precisa para crescer (Cook & Papendick, 1978).

As bactérias e fungos, como *Pythium* spp., requerem potenciais hídricos mais positivos para o crescimento, que é geralmente inibido em potenciais hídricos menores que -3,0 MPa. Fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* podem crescer em potenciais hídricos menores que -10,0 MPa e -12,0 MPa. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem crescer em potenciais hídricos menores que -25,0 MPa (Cook & Papendick, 1978).

O potencial hídrico em meios de cultura osmoticamente modificados com solutos iônicos (KCl e mistura de sais NaCl, KCl e Na₂SO₄) interferiu na taxa de crescimento micelial dos fungos *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora megasperma* Drechler var. *sojae*. Os potenciais osmóticos entre -1,0 MPa e -1,5 MPa estimularam o crescimento micelial de *Phytophthora megasperma*, enquanto potenciais menores que -1,0 MPa reduziram o crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora parasitica*. O crescimento micelial dos fungos nos meios de cultura foi relativamente independente do soluto utilizado (Sommers et al., 1970).

Potenciais hídricos de -6,0 MPa a -8,0 MPa, em solo, inibiram o crescimento micelial de *Alternaria tenuis*. O mesmo efeito ocorreu em meio de ágar ajustado osmoticamente com potenciais de -13,0 MPa a -14,0 MPa (Adebayo & Harris, 1971). Nesse estudo, o fungo teve um crescimento ótimo

FLÁVIO HENRIQUE LINHARES MAGALHÃES

RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PATOLOGIA DE SEMENTES: NOVAS
APLICAÇÕES

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 03 de Março de 2005

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Pesquisadora Dra. Elizabeth de Oliveira EMBRAPA (CNPMS)

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA


Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“Se não tem amor – faça o que quiser, saia à procura de todos os deuses da terra, participe de todas as atividades sociais, tente acabar com a pobreza, entre na política, escreva livros, escreva poemas –, você é um ser humano morto. Sem amor, seus problemas aumentam, multiplicam-se interminavelmente. E com amor, faça o que quiser, não há risco, não há conflito. Portanto, o amor é a essência da virtude.”

Jiddu Krishnamurti

A Maria Luiza Linhares da Purificação Magalhães
(*in memoriam*), que dedicou sua vida ao amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras-UFLA/Departamento de Fitopatologia.

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

Ao Professor Dr. José da Cruz Machado e, aos demais membros da banca examinadora: Dr. Edson Ampélio Pozza, Dr. Renato Mendes Guimarães, Dr. Ricardo Magela de Souza e Dra. Elizabeth de Oliveira, por contribuírem na avaliação, correção e elaboração desta tese.

Ao José da Cruz Machado pela oportunidade concedida, amizade, compreensão e boa vontade durante nossa convivência.

Aos amigos, sem vocês a vida seria árida demais para mim.

À tia Terezinha, à avó Áurea, ao meu pai João de Siqueira Magalhães, aos meus irmãos, Fábio, Fabíola e Valéria, todos companheiros de viagem nessa vida.

A Elda Bonilha Assis Fonseca, “amor da minha vida”, cuja presença foi motivo de muito crescimento e reflexão pessoal.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Poder Superior, que a tudo conduz harmoniosamente de acordo com o seu plano divino, independentemente do desejo e da vontade humana.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PATOLOGIA DE SEMENTES: NOVAS APLICAÇÕES..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 2 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Restrição hídrica: relações hídricas em sementes e microrganismos..... | 4 |
| 2.2 Métodos de inoculação de fungos em sementes | 7 |
| 2.3 Aplicações da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes | 13 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |
| CAPÍTULO 2..... | 21 |
| PRÉ-CONDICIONAMENTO OSMÓTICO NO TESTE DE SANIDADE DE SEMENTES DE SORGO VISANDO À DETECÇÃO DE FUNGOS... 21 | 21 |
| 1 RESUMO | 22 |
| 2 ABSTRACT | 23 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Avaliação dos efeitos da restrição hídrica em relação à germinação de sementes de sorgo, comprimento de raiz e ocorrência de fungos | 27 |
| 4.1.1 Cultivares utilizadas..... | 27 |
| 4.1.2 Delineamento experimental e tratamentos..... | 27 |
| 4.1.3 Instalação e condução dos testes de sanidade | 28 |
| 4.1.4 Avaliações..... | 29 |
| 4.1.5 Análise dos dados | 31 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1 Germinação de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos..... | 32 |
| 5.2 Comprimento de raiz de plântulas oriundas de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos..... | 45 |
| 5.3 Incidência de fungos em sementes de sorgo submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica..... | 51 |

| | |
|---|-----|
| 5.4 Área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos detectados nos lotes de sementes de sorgo pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos..... | 62 |
| 6 CONCLUSÕES | 72 |
| CAPÍTULO 3..... | 75 |
| APPLICATION OF WATER RESTRICTON TECHNIQUE IN STUDIES ON INTERACTION BETWEEN <i>Fusarium verticillioides</i> AND MAIZE SEEDS | 75 |
| 1 RESUMO | 76 |
| 2 ABSTRACT | 77 |
| 3 INTRODUCTION..... | 78 |
| 4 MATERIALS AND METHODS..... | 80 |
| 4.1 Description of the water restriction technique | 80 |
| 4.2 Seed sample..... | 82 |
| 4.3 Osmotic compound..... | 82 |
| 4.4 Seeding substrate and containers..... | 82 |
| 4.5 Seed and plant performance evaluation..... | 82 |
| 4.6 Experimental design and statistical analysis | 83 |
| 5 RESULTS AND DISCUSSION..... | 84 |
| 6 REFERENCES..... | 90 |
| CAPÍTULO 4..... | 93 |
| EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> NAS CONDIÇÕES DO TESTE NEON | 93 |
| 1 RESUMO | 94 |
| 3 INTRODUÇÃO | 96 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 99 |
| 4.1 Obtenção dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 99 |
| 4.2 Preparo do meio Neon padrão, Neon sementes e ambos com restrição hídrica | 99 |
| 4.3 Comportamento do fungo em meio Neon | 100 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 102 |
| 6 CONCLUSÕES | 107 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 110 |
| ANEXOS | 113 |

RESUMO

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações.** 2005. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A necessidade de desenvolvimento de métodos para fins de pesquisa em patologia de sementes, bem como para testes na análise de rotina em sanidade de sementes, que sejam práticos, confiáveis e que não ofereçam riscos à saúde dos técnicos e laboratoristas, conduziu a estudos sobre a utilização do princípio da restrição hídrica em sementes e fungos. A restrição hídrica do substrato está sendo empregada em patologia de sementes, para a inoculação de patógenos em sementes e, como substituto ao 2,4-D (que pode ser fungitóxico e carcinogênico) e ao congelamento em testes de sanidade de sementes, visando à inibir a germinação das mesmas. Desse modo objetivou-se estudar o uso da restrição hídrica no meio Neon visando à inibir ou reduzir a germinação das sementes durante o teste, como uma alternativa ao 2,4-D e, o efeito da restrição hídrica tanto em testes de sanidade de sementes de sorgo, visando à comparação do método de sanidade com congelamento, quanto a sua utilização para obtenção de sementes de milho portadoras de níveis diferenciados de inóculo do fungo *Fusarium verticillioides*. Com a aplicação da técnica do pré-condicionamento controlado de sementes com restritores hídricos foi revelado que para um mesmo lote de sementes é possível separar as sementes de milho naturalmente infectadas por *Fusarium verticillioides* em diferentes classes de inóculo deste organismo de acordo com o potencial ou densidade visual das estruturas fúngicas produzidas em um período de incubação. Essa técnica poderá ser aplicável na seleção de sementes para estudos diversos, tais como interações patógenos-hospedeiros. O uso de restritores hídricos, incorporados ao substrato de papel pelo teste de incubação (blotter test) pode inibir ou reduzir satisfatoriamente a germinação de sementes de sorgo em substituição à técnica do congelamento. Na avaliação dos efeitos do uso da restrição hídrica no meio Neon verificou-se que a restrição hídrica proporcionada por manitol nos potenciais de -1,0 MPa e -1,2 MPa pode ser utilizada em testes de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Renato Mendes Guimarães - UFLA

ABSTRACT

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. **Water restriction in seed pathology: new applications.** 2005. 131p. Thesis (Doctoral in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras, Lavras.*

The need of development of methods for research purposes in seed pathology, as well as for tests in routine analysis for seed health, that are practical, reliable and that don't offer risks to the technicians was the base to develop some studies about the use of water restriction in relation to seeds and fungi. The water restriction of the substratum is being used in pathology for inoculation of pathogens in seeds and, as substitute to 2,4-D (that can be fungitoxic and carcinogenic) and to the freezing method in seed health test, with aim to inhibit the germination of seeds. One of the experiments aimed to study the use of the water restriction in the medium Neon for inhibition or reduction of seed germination during the test, as an alternative to 2,4-D and, the effect of the water restriction in health tests of sorghum seeds, looking at the comparison of this method with the freezing one, and also the use of water restriction to obtain seeds of corn with differentiated levels of inoculum of the fungi *Fusarium verticillioides*. With the application of controlled pre-conditioning of seeds with water restrictors it was revealed that for a same seed lot is possible to separate the corn seeds naturally infected by *Fusarium verticillioides* in different classes of inoculum potential in agreement with the potential or visual density of the fungal structures produced in incubation period. That technique can be applicable in the selection of seeds for several studies, such as on the interaction pathogen-host. The use of water restrictors, incorporated to the paper substratum in incubation test (blotter test) can inhibit or reduce satisfactorily the germination of sorghum seeds in substitution to technique freezing. In the evaluation of the effects of the use of the water restriction, in the medium Neon, on *Sclerotinia sclerotiorum* was verified that the water restriction, provided through mannitol at the potentials of -1,0 MPa and -1,2 MPa, can be used in tests for detection of *S. sclerotiorum* in medium Neon.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Renato Mendes Guimarães - UFLA

CAPÍTULO 1

RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PATOLOGIA DE SEMENTES: NOVAS APLICAÇÕES.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O aspecto sanitário de sementes no âmbito da agricultura representa um dos componentes mais importantes por envolver fatores que dizem respeito ao controle preventivo de doenças, para a maioria das espécies cultivadas, bem como em termos de sustentabilidade de exploração agrícola em geral.

A necessidade de elaborar métodos em patologia de sementes, bem como para testes na análise de rotina em sanidade de sementes, que sejam práticos, confiáveis e que não ofereçam riscos à saúde dos técnicos e laboratoristas, tem feito com que sejam conduzidos estudos sobre a utilização do princípio da restrição hídrica em sementes e fungos. A restrição hídrica do substrato está sendo empregada em patologia de sementes para inocular patógenos em sementes, em substituição ao congelamento e ao 2,4-D que pode ser fungitóxico e carcinogênico, em testes de sanidade de sementes, visando inibir a germinação das mesmas (Coutinho & Machado, 2002).

O método da restrição hídrica do substrato empregado tanto no teste de sanidade quanto na inoculação de patógenos em sementes foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Carvalho, 1999; Costa, 2000; Coutinho, 2000; Machado et al., 2001c; Coutinho & Machado, 2002). O método foi baseado em estudos sobre pré-condicionamento fisiológico em metodologias de inoculação de patógenos em sementes e em crescimento de fungos em meio de cultura com potenciais hídricos modificados (Heydecker et al., 1975; Bradford, 1986, Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991; Amaral et al., 1996; Carvalho, 1999). Esse método consiste basicamente em substituir a água utilizada na embebição do papel de filtro ou na composição do meio de cultura, por soluções iônicas ou não, com potenciais hídricos adequados ao controle da germinação das

sementes. Como não afeta o desenvolvimento de fungos associados às sementes e nem prejudica o cultivo dos mesmos em meios com potenciais hídricos ajustados, a aplicação desse método tem sido investigada em recentes trabalhos (Carvalho, 1999; Costa, 2000; Coutinho, 2000; Machado et al.; 2001c; 2001d; Coutinho & Machado, 2002).

Os objetivos desta tese foram estudar o uso da restrição hídrica no método de incubação em substrato de papel para detecção de fungos em sementes de sorgo, na detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método Neon e na classificação ou obtenção de sementes de milho com diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Restrição hídrica: relações hídricas em sementes e microrganismos

Os termos capacidade de campo e ponto de murcha permanente são utilizados para descrever o teor de água no solo, enquanto pressão de vapor e umidade relativa referem-se à água na atmosfera. Pressão osmótica designa água nos tecidos das plantas, enquanto atividade de água expressa a água nas sementes e alimentos secos (Cook & Papendick, 1978).

O potencial hídrico é uma expressão do estado de energia da água, o qual determina a disponibilidade de água para processos vitais (Cook & Papendick, 1978), é representado pela letra grega ψ (psi). As unidades de medidas mais usadas para expressar o potencial hídrico são o bar (1 bar = 100 joules = 0,987 atmosferas) e o megapascal (1 MPa = 10 bars).

O conceito que melhor define o comportamento físico da água no sistema solo - planta - atmosfera, é o de potencial hídrico. O potencial hídrico (ψ) é a diferença entre o potencial químico da água em um sistema, ou parte do sistema, e o potencial químico da água livre, em condições iguais de pressão atmosférica e temperatura (Duniway, 1979). O potencial hídrico (ψ) é resultante da interação entre três potenciais: osmótico (ψ_o), que representa a concentração de solutos dissolvidos nas células; mátrico (ψ_m), que está relacionado com a capacidade de matrizes, como parede celular, amido e proteínas, hidratarem-se e ligarem-se à água; e o de pressão (ψ_p), relacionado à força contrária exercida pela parede celular externa, devido à resistência desta à expansão (Cook & Papendick, 1978). O potencial hídrico total de células vivas é determinado pela soma dos componentes de pressão (positivo), mátrico (negativo) e osmótico (negativo).

Em sementes secas, os efeitos mátricos são especialmente importantes. A rápida entrada de água dentro das sementes deve-se, principalmente, a uma força mátrica (Salisbury & Ross, 1992).

O processo de germinação é iniciado com entrada de água na semente por embebição e utilização de substâncias de reserva da própria semente (Popinigis, 1985).

Em condições normais de germinação, as sementes apresentam geralmente um padrão trifásico de embebição (Bewley & Black, 1994). Na fase inicial de embebição (fase I), ocorre uma absorção rápida de água e o início da degradação das reservas das sementes, decorrente das forças mátricas que atuam nos tecidos das mesmas. A fase II é caracterizada pelo transporte ativo das reservas desdobradas na fase anterior para o tecido meristemático e por pequenas mudanças no conteúdo de água das sementes. Na fase III de germinação, ocorre o alongamento celular e a emergência de radícula, resultantes da organização de substâncias complexas desdobradas na fase I e transportadas na fase II (Carvalho & Nakagawa, 1988).

Sementes secas em equilíbrio higroscópico com o ar em uma umidade relativa de 50% podem estar com um potencial hídrico (ψ) de aproximadamente -100 MPa, proporcionando um gradiente hídrico favorável à absorção de água pelas sementes quando essas são colocadas em água pura ou em substratos com potenciais hídricos maiores que -2,0 MPa, segundo Bradford (1986). Ainda de acordo com esse autor, a emergência da radícula ocorre quando o conteúdo de água da semente atinge um platô, que depende de um potencial hídrico de equilíbrio específico entre a semente e o meio externo.

A faixa de potencial hídrico adequada para o crescimento de bactérias e fungos varia de -0,3 MPa a -0,5 MPa. O crescimento é impedido, ou quase inibido, na faixa de -4,0 MPa a -5,0 MPa de potencial hídrico (Cook & Papendick, 1978).

Para muitos microrganismos, os requerimentos exatos em potencial hídrico são ainda desconhecidos, mas há evidências de que os microrganismos diferem entre si em relação ao potencial hídrico requerido. Além disso, os requerimentos de um organismo específico variam com a temperatura, pH e vários outros fatores. Geralmente, quanto mais favoráveis forem a nutrição e o ambiente, menor o potencial hídrico de que o microrganismo precisa para crescer (Cook & Papendick, 1978).

As bactérias e fungos, como *Pythium* spp., requerem potenciais hídricos mais positivos para o crescimento, que é geralmente inibido em potenciais hídricos menores que -3,0 MPa. Fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* podem crescer em potenciais hídricos menores que -10,0 MPa e -12,0 MPa. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem crescer em potenciais hídricos menores que -25,0 MPa (Cook & Papendick, 1978).

O potencial hídrico em meios de cultura osmoticamente modificados com solutos iônicos (KCl e mistura de sais NaCl, KCl e Na₂SO₄) interferiu na taxa de crescimento micelial dos fungos *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora megasperma* Drechler var. *sojae*. Os potenciais osmóticos entre -1,0 MPa e -1,5 MPa estimularam o crescimento micelial de *Phytophthora megasperma*, enquanto potenciais menores que -1,0 MPa reduziram o crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora parasitica*. O crescimento micelial dos fungos nos meios de cultura foi relativamente independente do soluto utilizado (Sommers et al., 1970).

Potenciais hídricos de -6,0 MPa a -8,0 MPa, em solo, inibiram o crescimento micelial de *Alternaria tenuis*. O mesmo efeito ocorreu em meio de ágar ajustado osmoticamente com potenciais de -13,0 MPa a -14,0 MPa (Adebayo & Harris, 1971). Nesse estudo, o fungo teve um crescimento ótimo

em potenciais hídricos de 0,0 MPa a -1,0 MPa e um crescimento médio em potenciais de -3,0 MPa a -4,0 MPa.

Meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 MPa e -1,0 MPa estimularam o crescimento micelial dos fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (Alam et al., 1996), enquanto potenciais menores que -1,0 MPa reduziram progressivamente o diâmetro das colônias. Entretanto, em outros estudos, os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium graminearum* tiveram os seus crescimentos miceliais estimulados em meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 MPa e -2,0 MPa, enquanto os meios de cultura com potenciais osmóticos menores que -2,0 MPa reduziram o crescimento micelial dos fungos (Adebayo & Harris, 1971; Wearing & Burgess, 1979; Subbarao et al., 1993; Gao & Shain, 1995).

A restrição hídrica do meio BDA, nos potenciais osmóticos de -0,6 MPa, -0,7 MPa, -0,8 MPa e -0,9 MPa, não afetou o crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Drechslera oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Phoma sorghina* e *Pyricularia grisea* e nos potenciais osmóticos de -0,4 MPa, -0,5 MPa, -0,6 MPa e -0,7 MPa, não afetou o crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* (Coutinho, 2000).

2.2 Métodos de inoculação de fungos em sementes

Sementes portadoras de patógenos basicamente são obtidas pelos seguintes métodos: escolha entre lotes comerciais, inoculação de plantas, inoculação pela embebição das sementes em suspensão de inóculo ou outro veículo, contato das sementes com a colônia do microrganismo crescida em meio de cultura padrão (BDA) (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991).

Sementes geralmente são inoculadas para diversas finalidades, como estudos envolvendo testes de patogenicidade e resistência de cultivares a determinados patógenos transmitidos por sementes e pelo solo, e avaliação da eficácia do tratamento com produtos (Agarwal & Sinclair, 1987; Machado, 2000).

A inoculação artificial de patógenos em sementes garante a associação dos sintomas com o verdadeiro agente causal (Tanaka & Menten, 1991), mas o uso de sementes artificialmente inoculadas com patógenos apresenta alguns questionamentos em função do método utilizado nessa operação (Machado, 2000).

O método mais simples de inoculação consiste em cobrir as sementes com esporos de patógenos ou uma suspensão concentrada de hifas jovens (Agarwal & Sinclair, 1987). Tanaka et al. (1989) compararam o método de inoculação de sementes de algodão com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por meio do contato direto da semente com o fungo desenvolvido em meio de cultura BDA, ao tradicional, imersão das sementes em suspensão padronizada de conídios, e concluíram que: a) no método tradicional o patógeno pode ficar em associação externa, com o inóculo apenas aderido à semente, com menor probabilidade de transmissão à progênie; e b) a semente molhada na suspensão de esporos, ao ser seca, mesmo ao ar, poderá resultar na morte dos conídios por ressecamento, devido à sua localização externa. Esses autores sugeriram ainda que pesquisas futuras poderiam demonstrar se as sementes, uma vez secas, poderiam ser armazenadas para serem utilizadas posteriormente em diversos tipos de estudos, pois em períodos menores que 24 horas, corre-se o risco de não haver penetração em nível satisfatório e, em períodos superiores, a semente poderia absorver água em quantidade suficiente para levar a um comprometimento da seqüência da germinação, caso sejam submetidas à secagem.

Sementes de feijão foram inoculadas separadamente com os fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., utilizando para isso o inóculo de cada um dos fungos crescidos em placas de Petri contendo meio BDA, incubadas à temperatura de 28 °C durante 18 dias. As sementes foram misturadas ao inóculo do fungo preparado raspando-se a massa de esporos e micélio da superfície do meio de cultura. Ambos os fungos causaram deterioração das sementes de feijão quando armazenadas, resultando na queda da porcentagem de germinação e emergência (Tanaka & Corrêa, 1991).

A resistência de algumas culturas a certos patógenos pode ser testada pela inoculação de sementes. Sementes inoculadas são colocadas sobre papel de filtro úmido em placas de cultura, ou culturas de patógenos em crescimento, ou sobre papel de filtro embebido em uma suspensão de esporos (Agarwal & Sinclair, 1987).

A inoculação em sementes de trigo para testes de resistência a *Fusarium* spp. utilizando o método do papel de filtro, foi realizada por Mesterhazy (1978). Para isso, uma camada dupla de papel de filtro foi imersa em suspensão de esporos e colocada em placas estéreis. As sementes foram desinfestadas superficialmente, colocadas sobre o papel e incubadas. Após alguns dias, as plântulas foram avaliadas quanto à resistência.

Vieira (1996) utilizou formulação em pó de esporos do fungo *Aspergillus* para infestação de sementes de algodoeiro. A suspensão de esporos (5% v/v) foi adicionada ao meio BDA com ágar a 0,50 % (5g/L). Após homogeneização desse meio, três discos de papel de filtro esterilizados foram mergulhados nessa suspensão de esporos agarizada e colocados em placas de Petri esterilizadas. Essas placas foram mantidas a 25 °C, por 20 dias, até a desidratação completa do papel de filtro. A esse substrato, contendo colônias de *Aspergillus* esporuladas, foram adicionados 2g de caolim esterilizado (material inerte de granulometria fina) por placa, obtendo-se, assim, com o auxílio de um

pincel, o pó com propágulos de *Aspergillus*. A formulação de pó foi ajustada para 10×10^6 conídios/g de produto, com auxílio de uma câmara Neubauer e por diluições de quantidade definida. A incorporação do inóculo em pó nas sementes foi realizada utilizando-se 200g do produto/100kg de sementes.

Tanaka et al. (1989) obtiveram êxito ao inocular *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão da cultivar CNPA 2H, com ou sem línter. A inoculação consistiu do contato das sementes sobre colônias do fungo, crescidas em meio BDA, em placas de Petri durante diferentes períodos de tempo (0, 12, 24, 36 e 48 horas). Observou-se, de modo geral, um aumento gradativo do efeito do patógeno sobre as sementes à medida que aumentou o tempo de exposição ao inóculo. Ressaltaram ainda a utilidade da obtenção de um método que proporcionasse a associação do tipo infecção e não limitasse a semeadura para imediatamente após a inoculação.

Inoculação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão deslintadas, foi efetuada pelo contato com colônias do fungo crescidas em meio de ágar, em tubos de ensaio (Costa, 1939 citado por Tanaka & Menten, 1991).

Três métodos de inoculação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* em sementes de algodoeiro foram comparados quanto à eficiência na obtenção de sementes infectadas. Os métodos utilizados foram: contato das sementes com colônias dos fungos durante 24 horas e secagem ao ar por 24 horas; imersão das sementes em suspensão de conídios (1×10^5 esporos/mL) durante 30 minutos e secagem ao ar por 2 horas; e imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 horas e secagem ao ar por 16 horas. A eficiência dos métodos variou em função da técnica empregada. O método de contato das sementes com colônias dos fungos foi considerado o mais eficiente na obtenção de sementes infectadas (Tanaka & Menten, 1991).

O fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foi inoculado em

sementes de algodoeiro, por meio do contato das mesmas com a colônia fúngica crescida em meio BDA, com sete dias de idade, por períodos de tempo de 0, 12, 24 e 48 horas. Nas sementes mantidas por 48 horas em contato com a colônia fúngica observaram-se 99,33% de infecção (Santos, 1995).

Sementes de feijoeiro e soja foram submetidas à inoculação pelo método de contato com colônias de *S. sclerotiorum*, por um período de exposição de 30 horas, obtendo-se eficiência de zero a 31% de infecção para as sementes de feijoeiro e de 35 a 100% para as sementes de soja, detectadas pelo método do papel de filtro (Peres, 1996).

Sementes de girassol, milho e soja foram submetidas à inoculação com esporos dos fungos *Alternaria helianthi*, *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, respectivamente. As colônias dos fungos foram crescidas em substrato BDA, em placas de Petri, durante uma semana. Após este período as sementes foram mantidas por 24 horas sobre este substrato, em temperatura ambiente, na presença de luz, obtendo-se, assim, níveis variáveis de inóculo nas sementes (Albuquerque, 2000).

A técnica de restrição hídrica tem sido empregada para a inoculação de patógenos em sementes. Esta técnica consiste em colocar as sementes sobre a colônia fúngica crescida em substrato (meio de cultura) modificado com a adição de solutos, obtendo-se, assim, a restrição hídrica necessária ao impedimento ou retardamento da germinação das sementes, sem inibir o crescimento do fungo. Estudos têm demonstrado que a inoculação de sementes, para um grande número de fungos, empregando a técnica de restrição hídrica de substratos favoráveis para o crescimento desses organismos, é uma opção eficaz na obtenção de sementes com qualificação sanitária adequada (Carvalho, 1999; Costa, 2000; Machado, 2000; Carvalho, 2001; Machado et al., 2001a; 2001b; 2001c).

Em relação à inoculação de fungos em sementes, a técnica da restrição

hídrica do substrato permite prolongar o período de permanência das sementes em contato com o patógeno, favorecendo uma maior porcentagem de infecção, sem que as mesmas germinem, e possibilita que as sementes, após inoculação, tenham o seu período útil de utilização prolongado (Machado, 2000).

O uso da técnica de restrição hídrica do substrato utilizado para inoculação de fungos em sementes tem sido eficiente no controle ou no retardamento da germinação das sementes, sem afetar o desenvolvimento de fungos (Amaral et al., 1996; Carvalho, 1999).

Carvalho (1999) utilizou a metodologia de restrição hídrica para inocular *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, em meio BDA controlado osmoticamente com manitol e polietilenoglicol em diferentes potenciais de restrição hídrica (-0,8 e -1,0 MPa) e em diferentes períodos de tempo (30, 72, 120 e 168h).

Costa (2000) utilizou a mesma metodologia para inoculação do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. As sementes foram mantidas em contato com o fungo cultivado em meio BSA (batata, sacarose e ágar) adicionado dos solutos sacarose, cloreto de potássio e manitol, em restrição hídrica de -0,8, -1,0 e -1,2 MPa durante os períodos de tempo de 30, 72, 120 e 168 horas. Dessa forma, constatou-se que a restrição hídrica possibilita a obtenção de sementes portadoras de *F. oxysporum* em níveis diferenciados de infecção.

Sementes de milho foram submetidas à inoculação com *Stenocarpella maydis* pelo método da restrição hídrica do meio de cultivo do fungo, BDA acrescido de manitol, ajustado para um potencial hídrico de -1,4 MPa. As sementes foram mantidas em contato com a colônia fúngica cultivada nesse meio por 96 horas, obtendo-se, assim, uma porcentagem média de 67,61% de sementes infectadas (Carvalho, 2001).

Machado et al. (2001b) inocularam os fungos *Diplodia maydis*,

Cephalosporium acremonium e *Fusarium moniliforme* com 6 dias de idade, em sementes de milho pelo método da restrição hídrica do meio de cultivo do fungo, BDA adicionado de manitol, ajustado para os potenciais hídricos de 0,0; -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa durante 0, 36, 48, 72, 96 e 120 horas, à temperatura de 25 °C. Os autores verificaram que o meio com baixa restrição hídrica promoveu um crescimento micelial mais rápido e, à medida que se aumentou a restrição hídrica, foi possível prolongar o tempo de exposição das sementes aos fungos sem que ocorresse germinação, promovendo um maior índice de infecção das sementes e plântulas com lesões.

O método da restrição hídrica também foi utilizado para a inoculação de *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja, utilizando-se manitol como restritor hídrico, incorporado ao meio de cultura desses fungos. Foram utilizados cinco níveis de restrição hídrica, 0,0; -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. As sementes foram dispostas sobre o substrato contendo colônias dos fungos com sete dias de idade, no qual permaneceram por tempos variáveis, de acordo com o potencial hídrico utilizado. Constatou-se que os potenciais hídricos mais negativos permitiram um maior período de contato das sementes de soja com os fungos, sem que ocorresse a germinação, o que possibilitou um maior nível de infecção das sementes, com conseqüente redução na germinação e aumento da porcentagem de plântulas com lesões (Machado et al., 2001a).

2.3 Aplicações da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes

O objetivo central de um teste de sanidade de sementes é informar os tipos, a frequência e o potencial de ocorrência de agentes fitopatogênicos em um dado lote. Esses testes têm como fundamento tornar evidentes, seja de maneira direta ou indireta, os patógenos associados às sementes. Dentre os testes de

incubação para detectar a presença de fungos em sementes destacam-se os métodos de incubação em papel de filtro “blotter test”, e a incubação em meio ágar. Esses métodos são aplicados para quase todos os tipos de sementes, incluindo sementes de cereais, hortaliças, ornamentais e florestais, na detecção de um grande número de fungos (Machado, 1988).

O teste de incubação em meio ágar modificado com adição de sais ou açúcares tem sido utilizado na detecção de fungos de armazenamento. Para determinar o número e espécies de fungos de armazenamento presentes em sementes, utiliza-se o seguinte procedimento: sementes desinfestadas superficialmente, com hipoclorito de sódio a 2% durante dois minutos são postas sobre meio ágar adicionado de sais como cloreto de sódio na concentração de 5% a 20% ou açúcares como sacarose na concentração de 20% a 65%, em placas de Petri. Em seguida as placas são mantidas à temperatura de 27 °C, durante cinco a sete dias (Christensen & Kaufmann, 1969). Para a detecção de fungos de armazenamento, utilizando o método de incubação em meio ágar, é aconselhável a adição de 18% de NaCl ao meio de cultura (Neergaard, 1979). Os fungos *Aspergillus halophilicus* e *A. restrictus* requerem alta pressão osmótica para crescerem e se desenvolvem muito pouco em meio ágar, se este não contiver consideráveis quantidades de açúcar ou sal. O *A. halophilicus* requer mais de 10% NaCl, ou mais de 40% de sacarose no meio para crescer (Wetzel, 1987).

Em testes de incubação em papel “blotter” e em meio ágar, a germinação das sementes precisa ser impedida ou reduzida para prevenção de contaminações secundárias e tornar a avaliação mais rápida e precisa (Machado, 1988).

De forma convencional, o 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio ou potássio) tem sido utilizado em testes de sanidade para inibir ou impedir a germinação em sementes de plantas dicotiledôneas e o congelamento (-20 °C) em sementes de monocotiledôneas. Porém, o uso do 2,4-D tem levado à contaminação no laboratório e apresenta risco para os operadores por ser

carcinogênico. O método do congelamento “freezer” tem mostrado ser um empecilho para análise de um maior número de amostras e manipulação adicional das sementes durante o teste (Machado, 1988; Coutinho & Machado, 2002).

A técnica da restrição hídrica do substrato tem sido empregada em estudos visando a inibir a germinação das sementes submetidas ao “blotter test” em substituição ao 2,4-D e ao congelamento “freezer” (Coutinho, 2000).

A técnica da restrição hídrica do substrato foi baseada em estudos sobre pré-condicionamento fisiológico “*priming*” e em metodologias de inoculação de patógenos em sementes (Heydecker et al., 1975; Bradford, 1986; Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991). Este método consiste basicamente em substituir a água utilizada na embebição do papel de filtro ou na composição do meio de cultura, por soluções iônicas ou não, com potenciais hídricos adequados ao controle da germinação das sementes, de maneira a não afetar o desenvolvimento de fungos associados a sementes.

As soluções osmóticas de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e manitol com potenciais de -0,7 MPa e -0,9 MPa, utilizadas para embeber o papel de filtro ou preparar meio ágar-água, utilizados em testes de sanidade, controlam a germinação das sementes, inibindo ou retardando o crescimento das plântulas, de espécies dicotiledôneas como feijão e soja e de espécies monocotiledôneas como arroz e milho, sem afetar o crescimento dos fungos associados às sementes (Coutinho, 2000).

Portanto, a técnica de restrição hídrica do substrato pode ser empregada com vantagens em relação aos métodos tradicionais utilizados para inibir ou retardar a germinação de sementes submetidas ao teste de sanidade. Quando comparada ao 2,4-D, a restrição hídrica apresenta as vantagens de ter um menor custo, não ser fungitóxica e não expor o laboratorista a produtos tóxicos. Em relação ao congelamento, a restrição hídrica apresenta como vantagens o fato de

não matar as sementes, o que minimiza as contaminações resultantes do crescimento fúngico sobre os nutrientes exudados das sementes mortas que são drenados pelo papel de filtro. Também dispensa o uso de antibióticos para evitar contaminações por bactérias saprofíticas associadas às sementes, os quais, muitas vezes, inviabilizam o teste economicamente (Coutinho & Machado, 2002).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, A.A.; HARRIS, R.F. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.35, n.3, p.465-469, May/June 1971.

AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC, 1987. v.1, 175p.

ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on *in vitro* growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v.36, n.3, p.383-388, 1996.

ALBUQUERQUE, M.C.F. **Desempenho germinativo e testes de vigor para sementes de girassol, milho e soja, semeadas sob condições de estresse ambiental**. 2000. 161p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

AMARAL, E.A.S.; VIEIRA, M. das G.G.C.; SANTOS, C.D. Avaliação da influência de diferentes potenciais osmóticos no índice de crescimento de *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em meio de cultura. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15.,; WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CESM/FELAS, 1996. p.93. (Resumo, 157).

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.d. New York: Plenum, 1994. 445p.

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.5, p.1105-1112, Oct. 1986.

CARVALHO, E.M. **Tratamento de sementes de milho com fungicidas em relação ao tamanho de sementes e controle de *Stenocarpella maydis***. 2001. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

CARVALHO, N.M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. **Grain storage: the role of fungi in quality loss.** Minneapolis: University of Minnesota, 1969. 153p.

COOK, R.J.; PAPENDICK, R. I. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease with special reference to postharvest pathology. **HortScience**, Alexandria, v.13, n.5, p.559-564, Oct. 1978.

COSTA, M.L.N. **Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica.** 2000. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade.** 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J. da C. **Restrição hídrica: uma nova metodologia para controlar germinação de sementes em testes de sanidade.** Disponível em: <<http://www.patologiadesementes.com.br>> Acesso em: 08 mar. 2002.

DUNIWAY, J.M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.431-460, 1979.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.25, n.6, p.1024-1029, June 1995.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zürich, v.3, n.3-4, p.881-888, 1975.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes.** Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

MACHADO, J. da C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MACHADO, J.C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.95-101, 2001a.

MACHADO, J. da C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.88-94, 2001b.

MACHADO, J. da C. et al. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technique. In: **INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM**, 26., 2001, Angers. **Abstracts...** Zurich: ISTA, 2001c.

MACHADO, J. da C. et al. Use of water restriction to control seed germination in health testing incubation. In: **INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM**, 26., 2001, Angers. **Abstracts...** Zurich: ISTA, 2001d.

MESTERHAZY, A. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.93, p.12, 1978.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: McMillan, 1979. 1191p. 2.v.

PERES, A.P. **Deteção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias**. 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitossanidade)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

SALISBURY, F.B.; ROOS, C.W. **Plant Physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1992. 682p.

SANTOS, A.C.K.S. ***Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro: detecção, inoculação artificial e controle químico**. 1995. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

SOMMERS, L.E. et al. Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.6, p.932-934, June 1970.

SUBBARAO, K.V.; MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.12, p.1454-1459, Dec. 1993.

TANAKA, M.A.S.; CORRÊA, M.U. Influência de *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.1, p.451-456, out. 1991.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.17, n.3, p.218-226, Jul./Dez. 1991.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MARIANO, M.I.A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.15, n.3, p.233-237, Jul./Dez. 1989.

VIEIRA, M. das G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WEARING, A.H.; BURGESS, L.W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "graminearum". **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.11, n.6, p.661-667, 1979.

WETZEL, M.M.V. da S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.G.V.S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. Cap. 9, p.260-275.

CAPÍTULO 2

PRÉ-CONDICIONAMENTO OSMÓTICO NO TESTE DE SANIDADE DE SEMENTES DE SORGO VISANDO À DETECÇÃO DE FUNGOS

1 RESUMO

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Pré-condicionamento osmótico no teste de sanidade de sementes de sorgo visando à detecção de fungos. In: _____. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações.** 2005. Cap. 2, p.21-74. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Nos testes de sanidade realizados por meio do método de incubação em substrato de papel, a rápida germinação das sementes dificulta a identificação dos fungos e pode comprometer a validade do mesmo. Em sementes de sorgo, tem-se utilizado o “blotter test” com congelamento de modo a impedir a germinação das sementes. Uma outra possibilidade vem sendo testada para a aplicação em testes de sanidade em papel visando à reduzir ou impedir a germinação das sementes, que é o uso da restrição hídrica do substrato por meio de solutos. Dessa forma, neste trabalho o objetivo foi avaliar a viabilidade do uso da restrição hídrica em teste de sanidade para sementes de sorgo como alternativa ao congelamento usado para impedir a germinação. Foram avaliados os efeitos da restrição hídrica do substrato, induzida pela adição de NaCl, manitol e manitol + NaCl nos potenciais -0,4, -0,6, -0,8, -1,0 MPa, em relação à germinação e ao comprimento de raiz de plântulas, e a porcentagem de ocorrência e severidade de fungos em sementes de sorgo submetidas ao teste de sanidade. A restrição hídrica dos solutos e nos potenciais testados reduziu a germinação e o comprimento de raiz de plântulas de sorgo em níveis satisfatórios, revelando-se um meio eficaz de controlar a germinação em teste de incubação em substituição ao congelamento. Diferenças de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos: *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* em sementes de sorgo foram na sua maioria não significativas entre os tratamentos, evidenciando que a restrição hídrica não interferiu no desenvolvimento dos mesmos.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Renato Mendes Guimarães - UFLA

2 ABSTRACT

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Osmotic pré-conditioning in the health test of sorghum seeds to detect fungi. In:_____. **Water restriction in seed pathology: new applications.** 2005. Cap. 2, p.21-74. Thesis (Doctoral in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras, Lavras.*

In the seed health tests, in which incubation method in paper substratum is employed, the fast germination of the seeds makes the identification of the fungi difficult, which makes the validity of the method questionable. In this work the objective was to evaluate the viability of the use of the water restriction, in health test for sorghum seeds as alternative to the freezing method used to impede the seed germination. Evaluation was performed on the effects of the water restriction of the substratum, induced by the addition of NaCl, mannitol and mannitol + NaCl at the potentials -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 MPa, in relation to the germination and length of seedling root at satisfactory levels, and percentage of the occurrence and severity of fungi in sorghum seeds submitted to the health test. The water restriction of the solutes at the potentials tested reduced the germination and length of root of sorghum seedlings. This procedure reveals as an effective way to control the germination in incubation test in substitution to the freezing method. Differences in incidence and area of the seeds covered by the superficial inoculum of the fungi: *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Epicoccum purpurencens* and *Alternaria alternata*, were not significant between treatments. That indicates that the water restriction didn't interfere in the development of those fungi.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Renato Mendes Guimarães - UFLA

3 INTRODUÇÃO

O Sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é uma planta de origem africana, que foi domesticada ao longo das gerações pelo homem. Ocupa hoje, o quinto lugar entre os cereais mais cultivados no mundo, particularmente em áreas de alta temperatura e baixa precipitação. É uma planta que apresenta tolerância às condições de déficit hídrico, o que possibilitou o seu cultivo em várias regiões brasileiras, um dos principais fatores responsáveis pela expansão da cultura.

A produção de sorgo no Brasil cresceu aceleradamente a partir da década de 90, passando de 435.600 toneladas (safra 1996/1997) para 1.959.100 toneladas (safra 2003/2004). Entre as regiões produtoras, o Centro-oeste é a principal região no cultivo do sorgo, 241.500 toneladas (Agrianual, 2005).

A cultura do sorgo está sujeita à incidência de um número relativamente elevado de doenças cujos patógenos são, na maioria, veiculados e transmitidos por sementes. Essa transmissão torna-se mais importante nessa cultura em virtude da forma de suas panículas, nas quais as sementes estão totalmente expostas e agrupadas, criando condições ideais ao desenvolvimento de fungos.

Os fungos que atacam as sementes desta gramínea podem causar perdas tanto na produção quanto na qualidade das sementes, e as sementes infectadas comumente exibem redução na germinação, na emergência de plântulas e no vigor, o que leva a uma baixa população de plantas no campo (Pinto, 1999). Dentre os patógenos transmitidos por sementes de sorgo destacam-se *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma sorghina* e *Drechslera turcica* (Pinto, 1999).

No controle de doenças deve-se levar rigorosamente em consideração as práticas de controle preventivo como proteção vegetal, exclusão, erradicação,

imunização, terapia e regulação, as quais são aplicáveis para patógenos associados às sementes (Machado, 2000).

A identificação precoce dos agentes causais das referidas doenças nas sementes por meio do teste de sanidade constitui uma ferramenta das mais importantes no âmbito do controle integrado de doenças do sorgo.

A análise sanitária de sementes, além de ser um dos fatores no manejo integrado de doenças, é ainda um pré-requisito básico em defesa vegetal, certificação de sementes e programas de melhoramento. Dentre os vários métodos existentes de detecção de patógenos em sementes, o método de incubação em substrato de papel de filtro (*blotter test*) é o mais utilizado (Neergaard, 1979).

Nos testes de sanidade de sementes de algumas espécies vegetais, como o método de incubação em substrato de papel (ISP), a rápida germinação das sementes dificulta a identificação dos fungos, podendo comprometer a validade desse método pela possibilidade de contaminações secundárias entre as sementes e o exterior do recipiente. Para inibir a germinação das sementes ou reduzir o comprimento de plântula, esse método é realizado com algumas modificações, como o uso do congelamento ou 2,4-D nas sementes incubadas. Embora o uso do ISP com congelamento para teste de sanidade de sementes gramíneas seja amplamente utilizado em análise de rotina, apresenta limitações como favorecer o desenvolvimento de fungos saprofitos e bactérias, reduzindo a precisão dos resultados.

Uma alternativa ao congelamento é o uso da técnica da restrição hídrica, que tem sido eficiente no controle da germinação de sementes sem afetar o desenvolvimento de fungos em sementes associados à cultura. Com essa constatação, acredita-se que a técnica de restrição hídrica pode substituir ou tornar-se uma alternativa ao uso dos procedimentos convencionais em teste de sanidade de sementes de sorgo.

Dessa forma, este trabalho objetiva avaliar a viabilidade do uso da restrição hídrica pela adição dos solutos NaCl e manitol em testes de sanidade de sementes de sorgo, o seu efeito sobre a germinação e o comprimento de raiz, bem como a incidência e a área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos veiculados nas sementes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período compreendido entre os meses de agosto e dezembro de 2004.

4.1 Avaliação dos efeitos da restrição hídrica em relação à germinação de sementes de sorgo, comprimento de raiz e ocorrência de fungos

Os efeitos da restrição hídrica em relação à germinação e comprimento de raiz foram avaliados com a modificação osmótica do teste de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel (*blotter test*), pela adição de cloreto de sódio (NaCl) e manitol isolados e em mistura.

A influência da restrição hídrica em relação aos fungos associados às sementes foi avaliada, comparando-se ISP modificado osmoticamente, ISP e suas modificações, utilizadas para inibir a germinação das sementes pelo método de congelamento.

4.1.1 Cultivares utilizadas

Foram utilizadas quatro amostras de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), das cultivares CMSSO-20 (lote 1), CMSSO-22 (lote 2), CMSM-019 (lote 3) e 4BR00628 (lote 4), produzidas na safra 2003/2004.

4.1.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 + 2. As combinações entre os solutos (cloreto de sódio, manitol e

manitol + cloreto de sódio) e potenciais osmóticos (-0,4MPa, -0,6MPa, -0,8 MPa e -1,0MPa) foram utilizadas no método de incubação em substrato de papel de filtro com restrição hídrica e mais dois tratamento adicionais (método de incubação em substrato de papel com e sem congelamento), totalizando quatorze tratamentos, com quatro repetições de 50 sementes cada.

4.1.3 Instalação e condução dos testes de sanidade

O teste de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel (ISP) foi realizado distribuindo-se as sementes em placas de petri de 15 cm de diâmetro (50 sementes/placa) contendo três folhas de substrato de papel previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada e esterilizada. Posteriormente, as placas, contendo as sementes foram levadas para câmara de incubação de sementes com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz, durante sete dias.

Para realização dos testes de sanidade com substrato de papel modificado osmoticamente, as sementes foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com soluções osmóticas esterilizadas de cloreto de sódio (NaCl), manitol, sendo as mesmas obtidas com o uso dos solutos isolados e em mistura. Os potenciais osmóticos utilizados foram -0,4 MPa, -0,6 MPa, -0,8 MPa e -1,0 MPa. Para calcular a quantidade de NaCl, manitol e a mistura de ambos, utilizou-se o software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). As concentrações em gramas/litro de água destilada, para obter cada nível de potencial osmótico dos solutos testados estão apresentadas na Tabela 1. As placas com as sementes foram mantidas em incubação nas mesmas condições do método padrão.

TABELA 1 - Quantidade de produto utilizado para preparação das soluções de NaCl, manitol e manito + NaCl, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados.

| Potencial osmótico (MPa) | g.L ⁻¹ de água destilada | | |
|--------------------------|-------------------------------------|---------|----------------|
| | NaCl | Manitol | Manitol + NaCl |
| -0,4 | 5,12 | 29,32 | 2,56 + 14,80 |
| -0,6 | 7,72 | 43,56 | 3,84 + 22,08 |
| -0,8 | 10,32 | 57,56 | 5,12 + 29,32 |
| -1,0 | 12,96 | 71,48 | 6,4 + 36,48 |

Para a incubação das sementes em substrato de papel de filtro com uso do congelamento, as sementes foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada e esterilizada, levadas à câmara de incubação por um período de 24 horas à temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz, e logo após transferidas para um congelador por 24 horas. Vencido esse prazo, as placas foram transferidas para câmara de incubação a 20 °C com 12 horas de luz, durante um período de cinco dias.

A montagem dos testes de sanidade foi realizada em ambiente asséptico.

4.1.4 Avaliações

As avaliações dos testes de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel padrão, restrição hídrica e congelamento foram feitas após sete dias de incubação.

Foram avaliadas a porcentagem de sementes de sorgo germinadas, o comprimento da raiz, a incidência e a área superficial das sementes coberta pelos

inóculos fúngicos. Consideraram-se germinadas aquelas com sinais visíveis de emissão de raiz (comprimento maior que 0,1 cm). As raízes de todas as sementes germinadas foram medidas com uma régua de precisão de 0,1 cm.

Para identificar os fungos e verificar sua incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico, foram examinadas individualmente todas as sementes ou plântulas em microscópio estereoscópico, após sete dias de incubação. Quando necessário, foi utilizado o microscópio óptico para visualização das estruturas morfológicas dos fungos.

A área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico foi obtida por meio de atribuição de notas de zero a quatro (Tabela 2), identificando as estruturas típicas de cada espécie de fungo, com exceção dos fungos *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata*, que foram avaliados apenas para incidência. Foram calculadas as médias das notas atribuídas à área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico e, em seguida converteram-se os valores obtidos em porcentagem.

TABELA 2 - Escala de notas atribuídas aos fungos associados às sementes de sorgo para a área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico.

| Nota | Categoria do potencial de inóculo | Ponto médio |
|------|-----------------------------------|-------------|
| 0 | Semente sadia | 0 |
| 1 | 1% a 25% | 12,5% |
| 2 | 26% a 50% | 37,5% |
| 3 | 51% a 75% | 62,5% |
| 4 | 76% a 100% | 87,5% |

4.1.5 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do sistema estatístico SAS[®] (SAS Institute, 1992). Nas análises de variâncias, foram determinados os efeitos de solutos, dos níveis de potencial osmótico, da interação entre solutos e potenciais osmóticos e dos contrastes de interesse. Os testes de comparações de médias, quando necessários, foram realizados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As comparações entre o tratamento controle (testemunha ou congelamento) e os outros tratamentos originados das combinações entre solutos e potenciais hídricos foram verificadas utilizando-se o teste de Dunnet ($P < 0,05$). Equações de regressão foram ajustadas aos dados das variáveis analisadas quando foram verificados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) de potenciais osmóticos. Nos casos em que não ocorreu normalidade e/ou homogeneidade dos erros, os dados foram previamente transformados em $\sqrt{x+0.5}$, $\sqrt{\frac{x}{100}}$ ou arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$, antes de serem submetidos à análise de variância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos

Os resultados referentes à germinação de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos, estão apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Para todos os lotes o contraste entre os valores médios do tratamento-testemunha e os valores médios dos demais (método de incubação com restrição hídrica induzida pela adição de manitol, NaCl e manitol + NaCl em vários potenciais hídricos) foi significativo ($P \leq 0,01$), tendo a testemunha valores médios maiores que os valores médios dos demais tratamentos.

Comparando os valores médios da testemunha (controle) com os demais tratamentos originados das combinações entre solutos e potenciais hídricos, pode-se verificar, de forma geral, que para os tratamentos com potenciais de -0,4 MPa e -0,6 MPa a germinação foi próxima ou igual ao tratamento-testemunha (Dunnnett $P < 0,05$) (Tabelas 3 e 2A).

Nos lotes 1, 3 e 4, houve efeito significativo ($P \leq 0,01$) para a interação solutos x potenciais hídricos. No lote 2 houve efeito significativo para potenciais hídricos ($P \leq 0,01$) (Tabela 1A).

Para os tratamentos utilizando o soluto manitol, Figuras 5 (lote 1) e 7 (lote 2), ambos os solutos e a mistura dos mesmos, Figura 6 (lote 2), e o soluto NaCl, Figuras 8 (lote 3) e 9 (lote 4), verificou-se, uma tendência decrescente de

germinação em relação aos potenciais hídricos, sendo um maior decréscimo nos valores médios de germinação verificado no potencial hídrico de -1,0 MPa.

No lote 1 ocorreram diferenças ($P \leq 0,05$) entre os solutos utilizados, nos potenciais de -0,6 MPa e -0,8 MPa, tendo os tratamentos com a combinação manitol + NaCl apresentado menores valores médios de germinação em ambos os potenciais hídricos (Tabela 3).

O mesmo ocorreu em relação ao lote 2, ou seja, verificaram-se diferenças entre os solutos testados, no potencial hídrico de -0,8 MPa, de forma que os tratamentos com a combinação de manitol + NaCl tiveram os menores valores médios de germinação.

Quanto ao lote 4, os efeitos dos solutos foram significativos nos potenciais de -0,4 MPa e -0,8 MPa, de forma que os tratamentos com o soluto manitol apresentaram valores médios de germinação superiores aos demais tratamentos com NaCl ou à mistura de ambos os solutos.

TABELA 3 - Valores médios de germinação e comprimento de raiz de plântulas oriundas de quatro lotes de sementes de sorgo submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel padrão e substrato de papel com restrição hídrica.

| Lotes | Variáveis | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ^{1,2} | |
|-------|--------------------------------|----------------|---------------------------|------|--------|--------|------|-----------------------|-----------|
| | | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| 1 | ⁽²⁾ Comp. raiz (cm) | Testemunha | 1,0 | - | - | - | - | 1,0 | 1,0 A |
| | | Manitol | - | 0,51 | 0,27 | 0,21 | 0,2 | 0,3 | 0,3 B |
| | | NaCl | - | 0,48 | 0,2 | 0,26 | 0,22 | 0,3 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 0,62 | 0,29 | 0,25 | 0,15 | 0,3 | |
| | | Médias | | 0,54 | 0,25 | 0,24 | 0,19 | | |
| | ⁽¹⁾ Germinação (%) | Testemunha | 86,0 | - | - | - | - | 86,0 | 86,0 A |
| | | Manitol | - | 63 | 45 a | 23 a | 10 | 35,3 | 32,4 B |
| | | NaCl | - | 62 | 11,5 a | 36,7 a | 16 | 31,6 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 67 | 46 b | 4,5 b | 4 | 30,4 | |
| | | Médias | | 64,0 | 34,2 | 21,4 | 10,0 | | |
| 2 | ⁽²⁾ Comp. raiz (cm) | Testemunha | 3,1 | - | - | - | - | 3,1 | 3,1 A |
| | | Manitol | - | 1,43 | 0,73 | 0,37 | 0,29 | 0,7 b | 0,8 B |
| | | NaCl | - | 1,58 | 0,99 | 0,8 | 0,33 | 0,9 a | |
| | | Manitol + NaCl | - | 1,32 | 1,01 | 0,51 | 0,35 | 0,8 ab | |
| | | Médias | | 1,44 | 0,91 | 0,56 | 0,32 | | |
| | ⁽¹⁾ Germinação (%) | Testemunha | 84,5 | - | - | - | - | 84,5 | 84,5 A |
| | | Manitol | - | 89,5 | 74,5 | 58,5 | 47,5 | 67,5 | 67,4 B |
| | | NaCl | - | 85 | 81 | 66 | 44,5 | 69,1 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 87,5 | 76 | 55,5 | 43,5 | 65,6 | |
| | | Médias | | | | | | | |

...continua...

TABELA 3, Cont.

| | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|----------------|------|-------|------|--------|------|------|--------|
| 3 | ⁽²⁾ Comp. raiz (cm) | Médias | 87,3 | 77,2 | 60,0 | 45,2 | | | |
| | | Testemunha | 4,3 | - | - | - | - | 4,3 | 4,3 A |
| | | Manitol | - | 2,24 | 1,22 | 0,64 | 0,31 | 1,1 | 1,1 B |
| | | NaCl | - | 1,94 | 1,18 | 0,73 | 0,31 | 1,0 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 1,99 | 1,52 | 0,42 | 0,36 | 1,1 | |
| | ⁽¹⁾ Germinação (%) | Médias | | 2,06 | 1,31 | 0,60 | 0,33 | | |
| | | Testemunha | 92,0 | - | - | - | - | 92,0 | 92,0 A |
| | | Manitol | - | 84,5 | 74,5 | 64 a | 52,5 | 68,9 | 66,3 B |
| | | NaCl | - | 84 | 77 | 62,5 a | 40,5 | 66,0 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 84,5 | 83,5 | 37 b | 51,5 | 64,1 | |
| 4 | ⁽¹⁾ Comp. raiz (cm) | Médias | | 84,3 | 78,3 | 54,5 | 48,2 | | |
| | | Testemunha | 3,9 | - | - | - | - | 3,9 | 3,9 A |
| | | Manitol | - | 1,75 | 1,06 | 0,7 | 0,37 | 1,0 | 1,0 B |
| | | NaCl | - | 1,37 | 1,02 | 0,79 | 0,45 | 0,9 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 1,94 | 1,25 | 0,57 | 0,57 | 1,1 | |
| | ⁽¹⁾ Germinação (%) | Médias | | 1,69 | 1,11 | 0,69 | 0,46 | | |
| | | Testemunha | 95,0 | - | - | - | - | 95,0 | 95,0 A |
| | | Manitol | - | 93 a | 75 | 74 a | 32 | 68,5 | 60,2 B |
| | | NaCl | - | 82 b | 69,5 | 50,5 b | 35 | 59,3 | |
| | | Manitol + NaCl | - | 87 ab | 74 | 16,5 c | 33,5 | 52,8 | |
| | Médias | | 87,3 | 72,8 | 47,0 | 33,5 | | | |

¹Médias com a mesma letra minúscula na coluna, para cada lote/variável, são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

²Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada lote/variável, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em: ⁽¹⁾ $\sqrt{x+0,5}$, ⁽²⁾ $\sqrt{\frac{x}{100}}$ ou arco seno ⁽³⁾ $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$

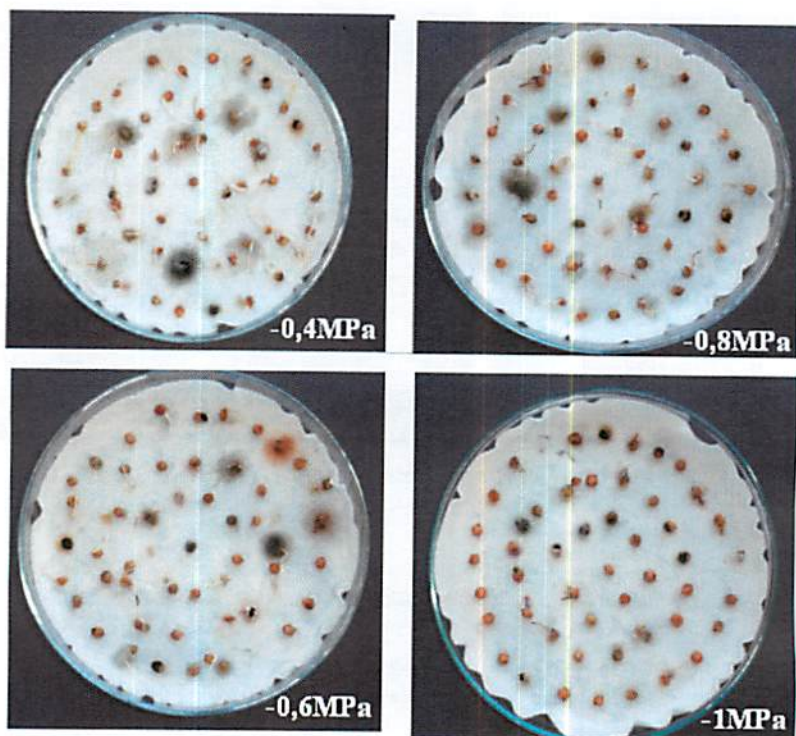


FIGURA 1 - Germinação de sementes de sorgo submetidas à incubação em substrato de papel com restrição hídrica induzida por manitol em diferentes potenciais hídricos.

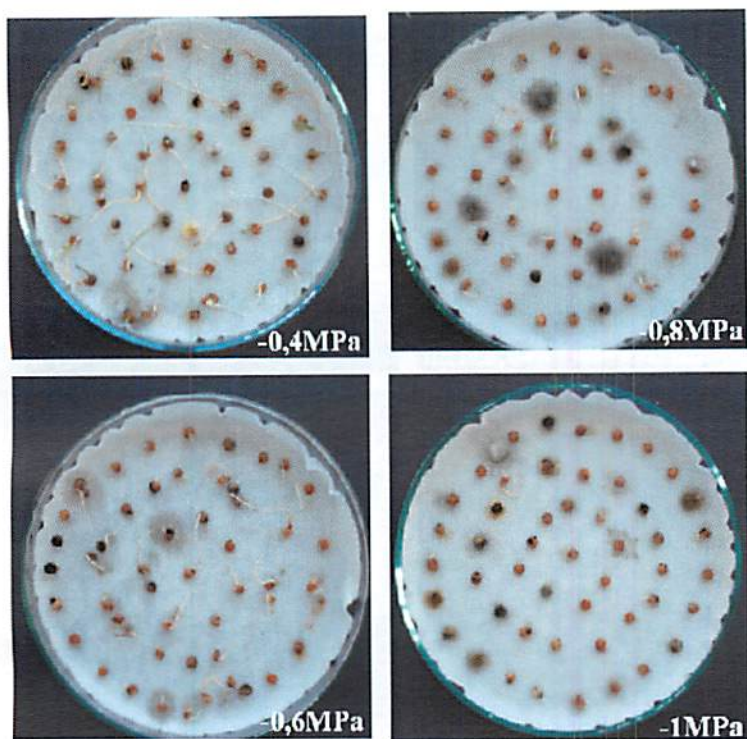


FIGURA 2 - Germinação de sementes de sorgo submetidas à incubação em substrato de papel com restrição hídrica induzida por NaCl em diferentes potenciais hídricos.

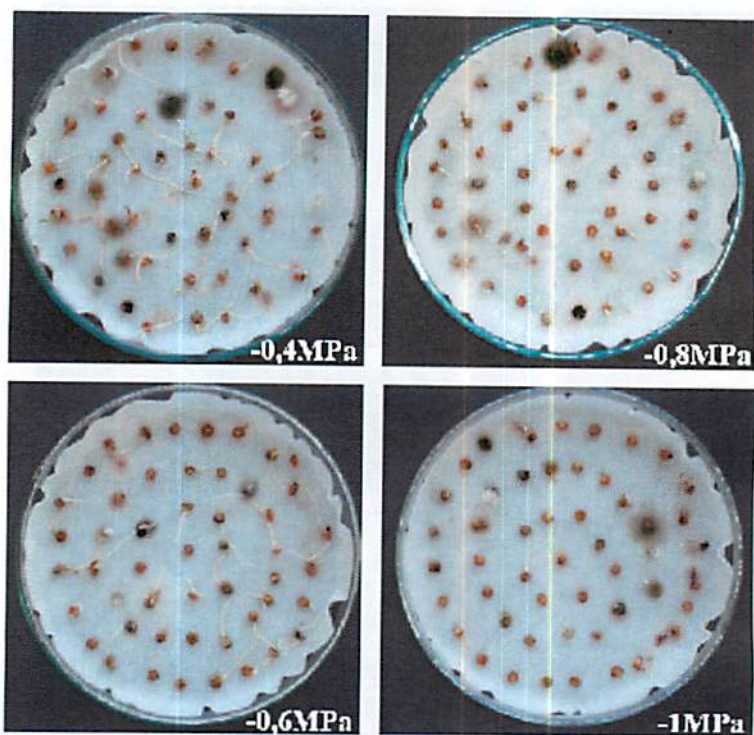


FIGURA 3 - Germinação de sementes de sorgo submetidas à incubação em substrato de papel com restrição hídrica induzida por manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos.

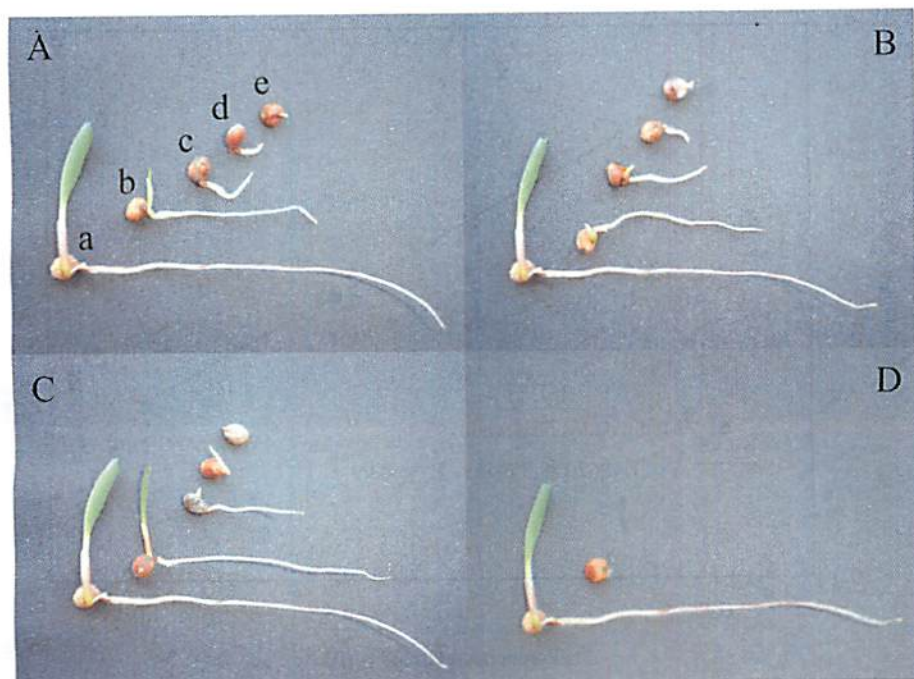


FIGURA 4 - Plântulas oriundas de sementes de sorgo submetidas à análise sanitária pelo método de incubação em substrato de papel padrão e com uso da restrição hídrica. A) Manitol, B) Manitol + NaCl, C) NaCl e D) Testemunhas (água, congelamento). a) água, b) -0,4MPa, c) -0,6MPa, d) -0,8MPa e e) -1,0MPa.

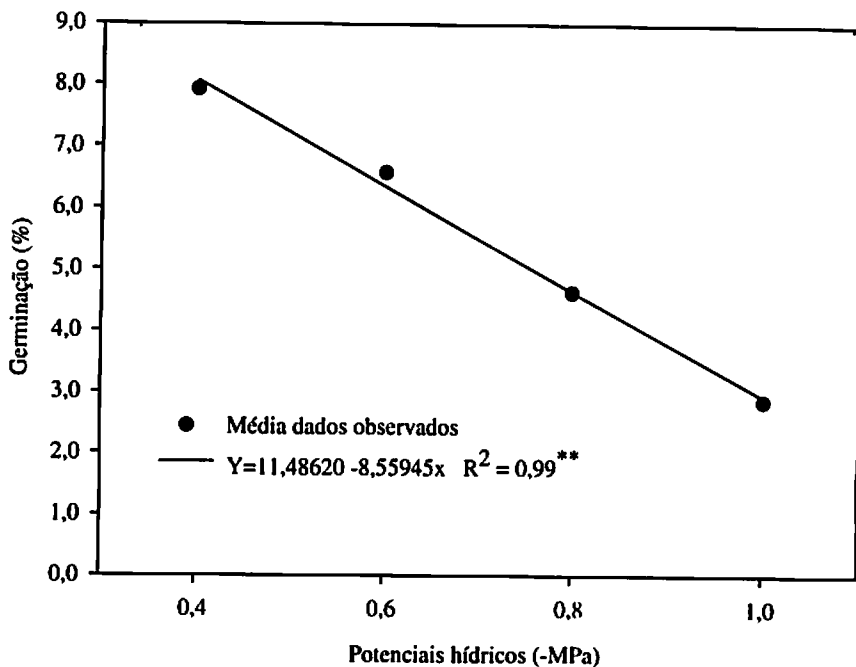


FIGURA 5 - Porcentagens médias de germinação de sementes de sorgo do lote 1 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelo soluto manitol em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

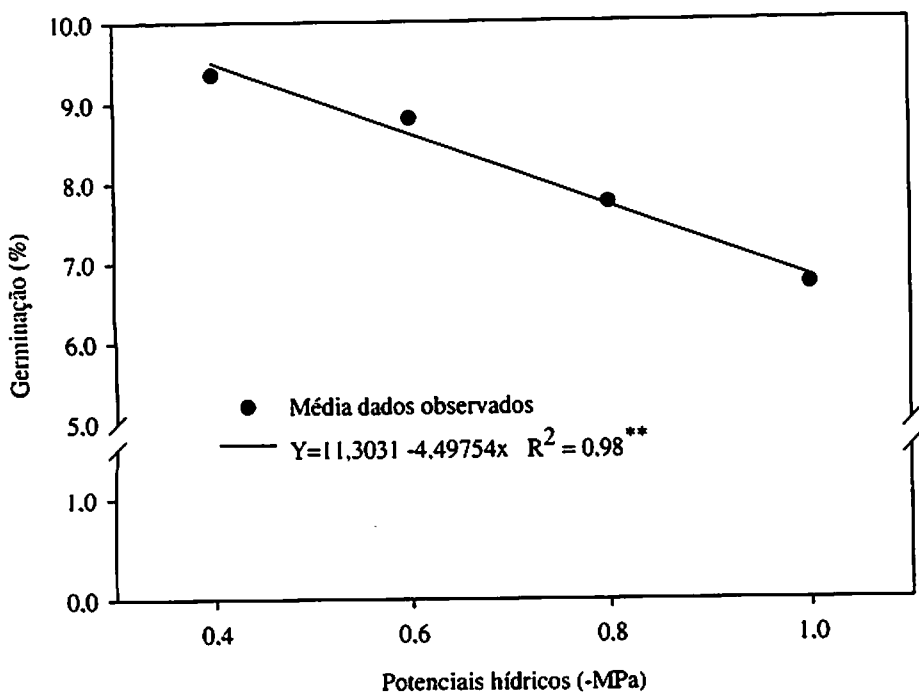


FIGURA 6 - Porcentagens médias de germinação de sementes de sorgo do lote 2 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelos solutos manitol, NaCl e manitol + NaCl, em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em $\sqrt{x+0.5}$.

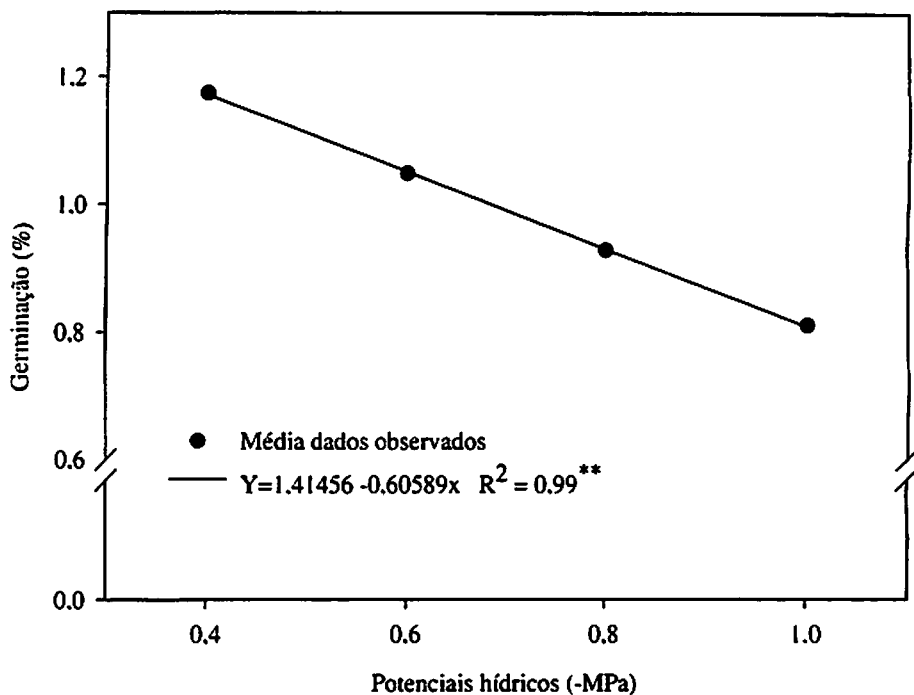


FIGURA 7 - Porcentagens médias de germinação de sementes de sorgo do lote 3 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelo soluto manitol em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$.

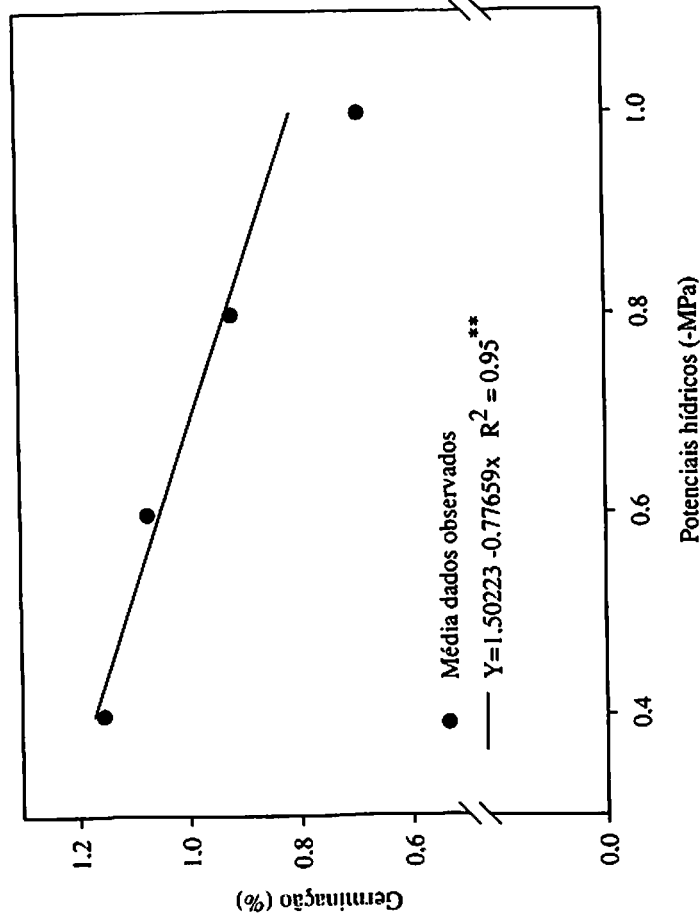


FIGURA 8 - Porcentagens médias de germinação de sementes de sorgo do lote 3 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelo soluto NaCl em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$.

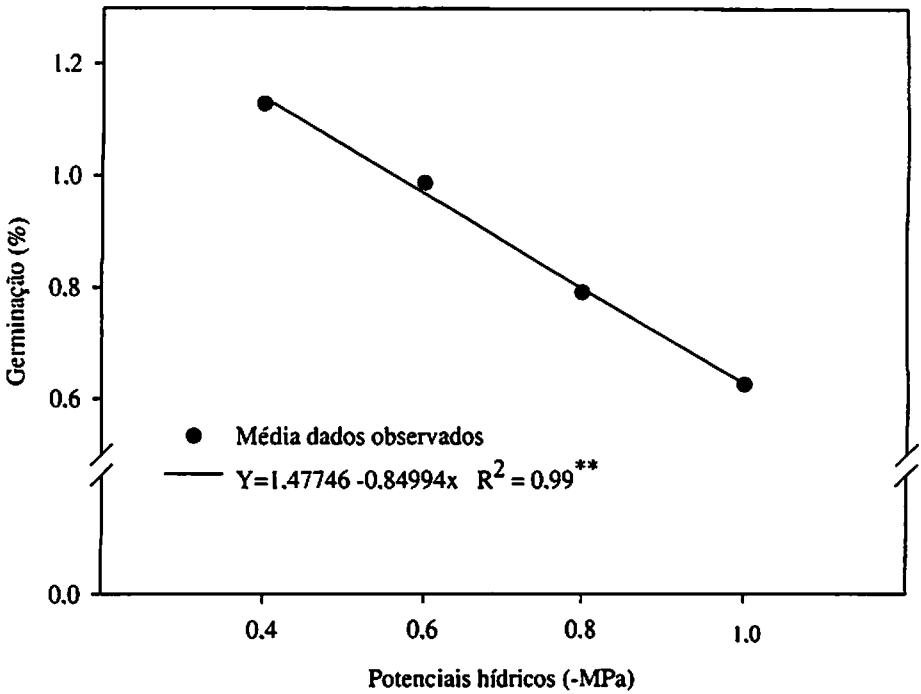


FIGURA 9 - Porcentagens médias de germinação de sementes de sorgo do lote 4 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelo soluto NaCl em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$.

5.2 Comprimento de raiz de plântulas oriundas de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos

Os resultados referentes ao comprimento de raiz de plântulas oriundas de sementes de sorgo submetidas aos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos, estão apresentados na Tabela 3 e nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Para todos os lotes, o contraste entre os valores médios do tratamento-testemunha e os valores médios dos demais (método de incubação com restrição hídrica induzida pela adição de manitol, NaCl e manitol + NaCl em vários potenciais hídricos) foi significativo ($P \leq 0,01$), tendo a testemunha valores médios maiores que os valores médios dos demais tratamentos.

Comparando os valores médios da testemunha (controle) com os demais tratamentos originados das combinações entre solutos e potenciais hídricos pode-se verificar, de forma geral, que os tratamentos diferiram do tratamento-testemunha exceto no lote 1, no potencial de -0,4 MPa (Dunnett $P < 0,05$) (Tabelas 3 e 2A).

Os efeitos de potenciais hídricos foram significativos ($P \leq 0,01$) para todos os lotes (Tabelas 3 e 1A).

No lote 2, em geral ocorreram diferenças entre os solutos utilizados, de forma que os menores valores de comprimento de raiz foram obtidos nos tratamentos utilizando NaCl e a combinação NaCl + manitol.

Pelas Figuras 10, 11, 12 e 13, verifica-se uma tendência linear decrescente do comprimento de raízes em relação aos potenciais hídricos, sendo que um maior decréscimo nos valores médios de comprimento de raízes para todos os lotes testados foi verificado no potencial hídrico de -1,0 MPa.

Pelos resultados obtidos é possível verificar que, quanto maior a concentração do soluto na solução utilizada para umedecer o substrato de papel, menor foi o comprimento de raiz, sendo este maior decréscimo no potencial -1,0 MPa (Figuras 10, 11, 12 e 13).

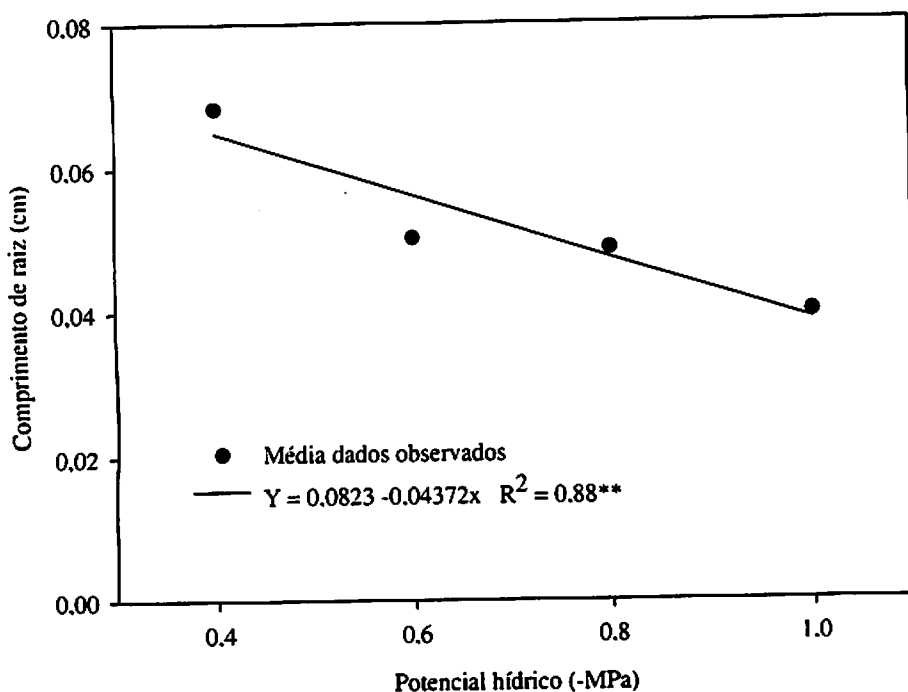


FIGURA 10 - Comprimento médio de raiz de plântulas oriundas de sementes de sorgo do lote 1 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelos solutos manitol, NaCl e manitol + NaCl, em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em $\sqrt{\frac{x}{100}}$.

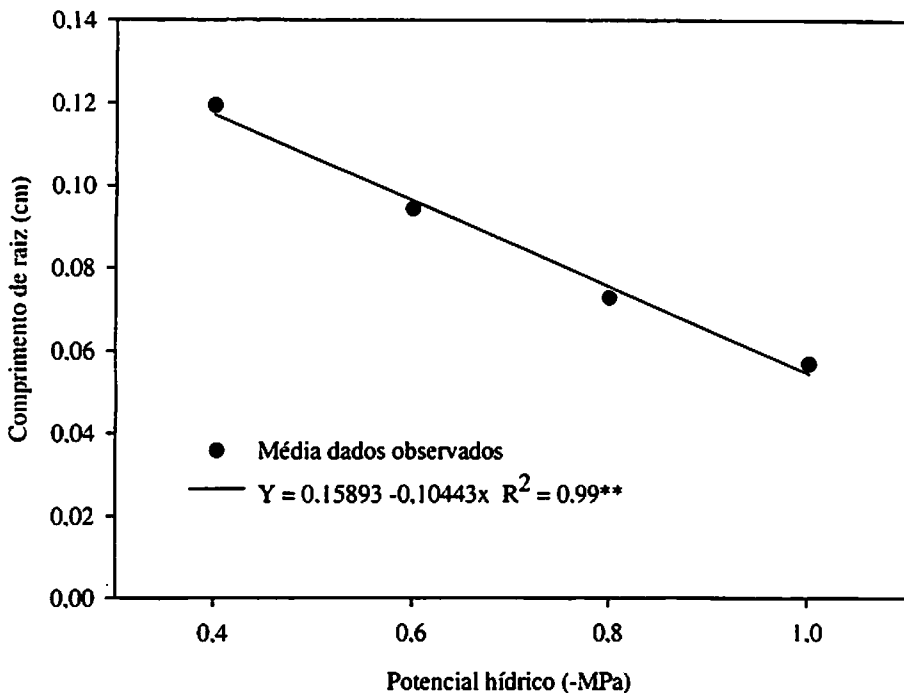


FIGURA 11 - Comprimento médio de raiz, de plântulas oriundas de sementes de sorgo do lote 2 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelos solutos manitol, NaCl e manitol + NaCl, em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em $\sqrt{\frac{x}{100}}$.

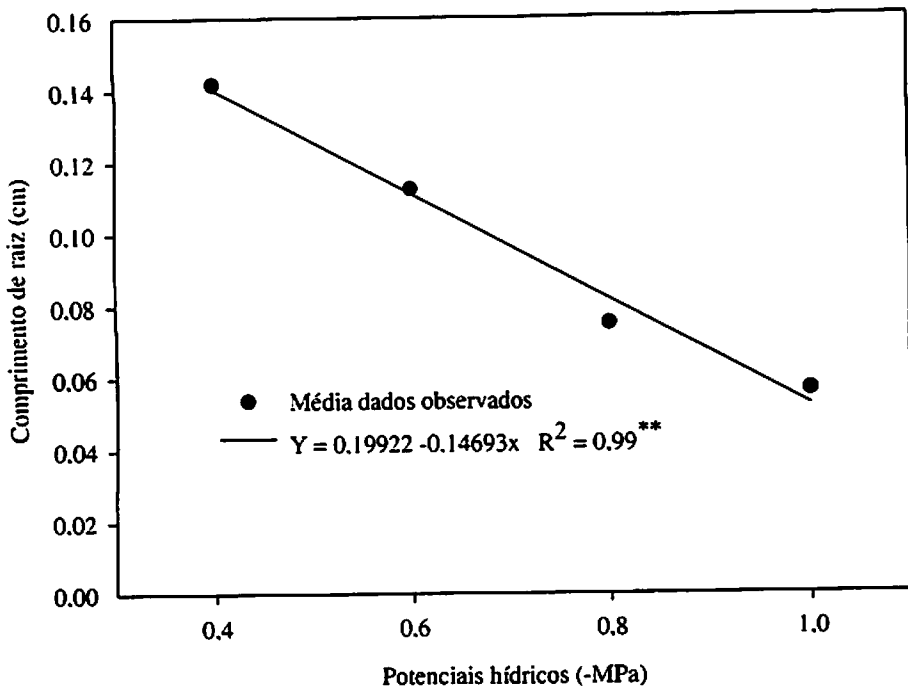


FIGURA 12 - Comprimento médio de raiz, de plântulas oriundas de sementes de sorgo do lote 3 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelos solutos manitol, NaCl e manitol + NaCl, em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em $\sqrt{\frac{x}{100}}$.

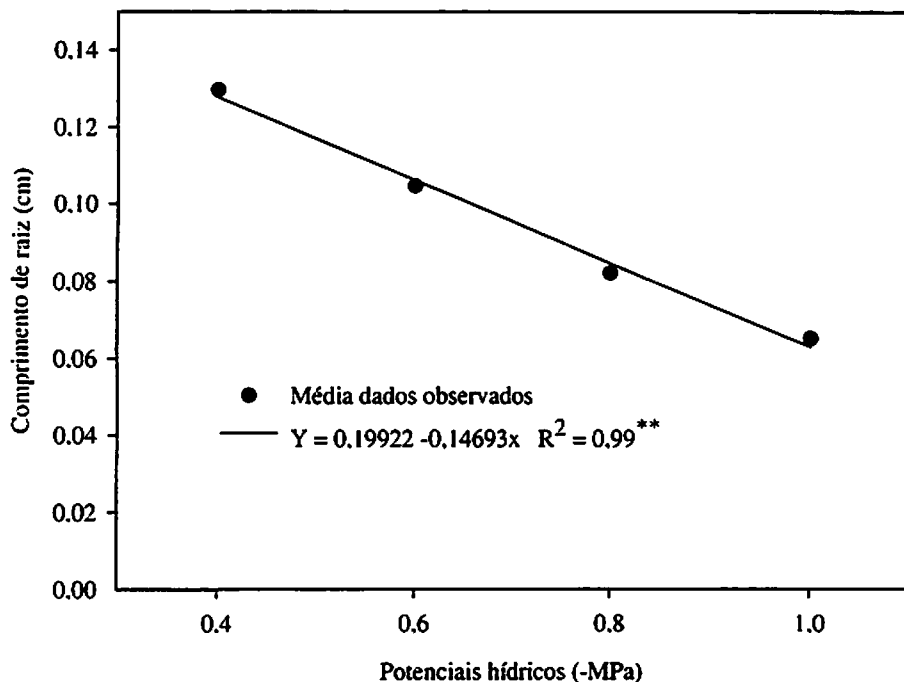


FIGURA 13 - Comprimento médio de raiz, de plântulas oriundas de sementes de sorgo do lote 4 submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro com restrição hídrica proporcionada pelos solutos manitol, NaCl e manitol + NaCl, em diferentes níveis de potencial osmótico. Dados transformados em arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$.

A redução acentuada da germinação de sementes em maiores concentrações de soluções osmóticas tem sido atribuída à redução da quantidade de água absorvida pelas sementes em meio salino, em decorrência da redução do potencial osmótico das soluções (Braccini et al., 1996). Segundo Van Der Moezel & Bell (1987), o soluto NaCl pode afetar a germinação, pelo efeito osmótico, dificultando a absorção de água pelas sementes, pelo efeito iônico, devido à penetração de solutos nas células, em níveis tóxicos, ou pela combinação de ambos. De acordo com Campos & Assunção (1990), a aparente inibição da síntese e/ou atividade de enzimas hidrolíticas necessárias à germinação das sementes é provocada pelos sais em altas concentrações.

Vários autores verificaram resultados semelhantes quanto à redução da germinação e comprimento de raiz com o uso de restrição hídrica no método de incubação em substrato de papel para diversas espécies, como trigo (Celano, 2003), algodão (Machado, 2002), arroz e feijão (Coutinho, 2000) milho (Gravena et al., 2002) e soja (Alves et al., 2002), quando utilizaram potenciais em torno de -1,0 Mpa.

Dessa forma, a restrição hídrica pode constituir uma alternativa eficiente ao congelamento em teste de incubação em substrato de papel para sementes de sorgo.

5.3 Incidência de fungos em sementes de sorgo submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica

Foram detectados os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma sorghina*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes.

Os resultados referentes à incidência dos fungos detectados nos lotes de sementes de sorgo pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos, estão apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e de 3A a 12A.

Em relação ao contraste entre o tratamento-testemunha e o método de incubação com congelamento, pode-se observar que foi significativo para *D. turcica* no lote 2 ($P \leq 0,05$), *A. alternata* e *F. moniliforme* no lote 3 ($P \leq 0,05$) e *Cladosporium cladosporioides* no lote 4 ($P \leq 0,01$), sendo que o método de incubação com congelamento apresentou valores mais altos de incidência.

Para o fungo *D. turcica* verificaram-se efeitos significativos para solutos nos lotes 1 ($P \leq 0,01$) e 2 ($P \leq 0,05$). No lote 1 os tratamentos com o soluto NaCl tiveram maior incidência (26,4%), enquanto manitol (20,3%) e manitol + NaCl (18,8%) não diferiram entre si. No lote 2 os tratamentos com o soluto NaCl com incidência de 11,3%, e com o soluto manitol (9,6%) apresentaram maiores valores médios de incidência.

O contraste entre os valores médios dos tratamentos adicionais (tratamento-testemunha + método de incubação com congelamento) e os valores médios dos demais (método de incubação com restrição hídrica induzida pela adição de manitol, NaCl e manitol + NaCl em vários potenciais hídricos) foi significativo para *F. moniliforme* nos lotes 1, 2 e 3 ($P \leq 0,05$), *E. purpurencens* no lote 1 ($P \leq 0,01$), *C. cladosporioides* no lote 2 ($P \leq 0,05$) e *A. Alternata* nos lotes 1 e 3 ($P \leq 0,01$). Nesses casos, maiores valores médios de incidência foram observados nos tratamentos adicionais (tratamento-testemunha + método de incubação com congelamento) em comparação com os demais (método de incubação com restrição hídrica induzida pela adição de manitol, NaCl e manitol + NaCl em vários potenciais hídricos), exceto para *C. cladosporioides* no lote 2, em que ocorreu o inverso.

A maioria dos fungos estudados não foi afetada em relação à incidência quando comparados ao método de incubação com congelamento (controle) (Dunnet $P < 0,05$), exceto *A. Alternata* nos lotes 1 e 2, *C. cladosporioides* no lote 4 e *F. moniliforme* no lote 3 (Tabelas 9A, 10A 11A e 12A)

TABELA 4 - Porcentagem de incidência de fungos em sementes de sorgo, lote 1, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ^{1,2} | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|------|------|------|------|-----------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 16,5 | - | - | - | - | 16,5 A | 13,0 A |
| | Congelamento | 9,5 | - | - | - | - | 9,5 A | |
| | Manitol | - | 14 | 9,5 | 11 | 13 | 11,9 | 12,0 A |
| | NaCl | - | 16 | 12 | 11 | 12 | 12,4 | |
| | Manitol + NaCl | - | 8,5 | 14 | 13 | 12 | 11,8 | |
| | Médias | | | 12,8 | 11,8 | 11,7 | 12,3 | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 53,5 | - | - | - | - | 53,5 A | 56,3 A |
| | Congelamento | 59 | - | - | - | - | 59 A | |
| | Manitol | - | 52 | 42 | 51 | 56 | 49,9 | 50,0 A |
| | NaCl | - | 56 | 49 | 55 | 41 | 50,2 | |
| | Manitol + NaCl | - | 49 | 53 | 48 | 50 | 49,8 | |
| | Médias | | | 52,3 | 48,0 | 51,3 | 49,0 | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 23 | - | - | - | - | 23,0 A | 24,0 A |
| | Congelamento | 25 | - | - | - | - | 25,0 A | |
| | Manitol | - | 27 | 17 | 17 | 21 | 20,3 b | 21,8 A |
| | NaCl | - | 31 | 28 | 26 | 21 | 26,4 a | |
| | Manitol + NaCl | - | 15 | 22 | 23 | 16 | 18,8 b | |
| | Médias | | | 24,3 | 22,3 | 22,0 | 19,3 | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 16 | - | - | - | - | 16,0 A | 15,5 A |
| | Congelamento | 15 | - | - | - | - | 15,0 A | |
| | Manitol | - | 9 | 8 | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 10,0 B |
| | NaCl | - | 9 | 8,5 | 10 | 14 | 10,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 16 | 10 | 8,5 | 11 | 11,3 | |
| | Médias | | | 11,3 | 8,8 | 9,0 | 11,2 | |
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 22,5 | - | - | - | - | 22,5 A | 24,0 A |
| | Congelamento | 25,5 | - | - | - | - | 25,5 A | |
| | Manitol | - | 28 | 24 | 21 | 32 | 26,0 | 25,3 A |
| | NaCl | - | 27 | 29 | 26 | 18 | 24,6 | |
| | Manitol + NaCl | - | 25 | 31 | 20 | 25 | 25,2 | |

...continua...

TABELA 4, Cont.

| Médias | | 26.7 | 28.0 | 22.3 | 25.0 | | |
|-------------------------------|----------------|------|------|------|------|--------|------|
| <i>Epicoccum purpurencens</i> | Testemunha | 26 | - | - | - | 26 A | 22.3 |
| | Congelamento | 18.5 | - | - | - | 18.5 A | A |
| | Manitol | - | 18 | 12 | 13 | 14.5 | 13.9 |
| | NaCl | - | 21 | 9.5 | 11 | 13.0 | B |
| | Manitol + NaCl | - | 12 | 14 | 18 | 14 | 14.3 |
| Médias | | | 17.0 | 11.8 | 14.0 | 13.0 | |
| <i>Alternaria Alternata</i> | Testemunha | 7.5 | - | - | - | 7.5 A | 7.5 |
| | Congelamento | 7.5 | - | - | - | 7.5 A | A |
| | Manitol | - | 3.5 | 2 | 2 | 0 | 1.9 |
| | NaCl | - | 4 | 6 | 2.7 | 2.5 | 3.8 |
| | Manitol + NaCl | - | 3 | 3.3 | 4.5 | 1 | 3.0 |
| Médias | | | 3.5 | 3.8 | 3.1 | 1.2 | |

¹Médias com a mesma letra minúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

²Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

TABELA 5 - Porcentagem de incidência de fungos em sementes de sorgo, lote 2, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ^{1,2} | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|------|------|------|------|-----------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 3 | - | - | - | - | 3,0 A | 1,8 B |
| | Congelamento | 0,5 | - | - | - | - | 0,5 A | |
| | Manitol | - | 1 | 2 | 7 | 4,5 | 3,6 | 4,0 A |
| | NaCl | - | 4,5 | 6,5 | 5,5 | 3 | 4,9 | |
| | Manitol + NaCl | - | 3,5 | 2,5 | 5,5 | 2,5 | 3,5 | |
| | Médias | | 3,0 | 3,7 | 6,0 | 3,3 | | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 2 | - | - | - | - | 2,0 A | 3,0 A |
| | Congelamento | 4 | - | - | - | - | 4,0 A | |
| | Manitol | - | 1,5 | 3,5 | 2,5 | 3,5 | 2,8 | 3,0 A |
| | NaCl | - | 2,5 | 3,5 | 2 | 2,5 | 2,6 | |
| | Manitol + NaCl | - | 3,5 | 4 | 4 | 3 | 3,6 | |
| | Médias | | 2,5 | 3,7 | 2,8 | 3,0 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 5,5 | - | - | - | - | 5,5 B | 9,3 A |
| | Congelamento | 13 | - | - | - | - | 13 A | |
| | Manitol | - | 12 | 10 | 9,5 | 7,5 | 9,6 ab | 9,2 A |
| | NaCl | - | 14 | 11 | 10 | 11 | 11,3 a | |
| | Manitol + NaCl | - | 5 | 9,5 | 6 | 6,5 | 6,8 b | |
| | Médias | | 10,3 | 10,2 | 8,5 | 8,3 | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 22 | - | - | - | - | 22 A | 18,3 A |
| | Congelamento | 14,5 | - | - | - | - | 14,5 A | |
| | Manitol | - | 13 | 16 | 9,5 | 11 | 12,1 | 13,3 B |
| | NaCl | - | 11 | 16 | 16 | 16 | 14,5 | |
| | Manitol + NaCl | - | 16 | 14 | 13 | 11 | 13,3 | |
| | Médias | | 13,3 | 15,3 | 12,8 | 12,7 | | |
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 54,5 | - | - | - | - | 54,5 A | 52,5 A |
| | Congelamento | 50,5 | - | - | - | - | 50,5 A | |
| | Manitol | - | 49 | 46 | 55 | 58 | 52,0 | 54,4 A |
| | NaCl | - | 65 | 69 | 54 | 55 | 60,4 | |
| | Manitol + NaCl | - | 46 | 49 | 54 | 56 | 50,9 | |
| | Médias | | | | | | | |

...continua...

TABELA 5, Cont.

| | | Médias | 53,3 | 54,7 | 54,3 | 56,3 | | |
|--|----------------|--------|------|------|------|------|--------|--------|
| <i>Epicoccum purpurencens</i> | Testemunha | 11 | - | - | - | - | 11,0 A | 12,3 A |
| | Congelamento | 13,5 | - | - | - | - | 13,5 A | |
| | Manitol | - | 13 | 12 | 10 | 14 | 12,3 | 15,3 |
| | NaCl | - | 15 | 17 | 17 | 17 | 16,4 | A |
| | Manitol + NaCl | - | 17 | 14 | 21 | 17 | 17,1 | |
| | | Médias | 15,0 | 14,3 | 16,0 | 16,0 | | |
| ¹¹⁾ <i>Alternaria alternata</i> | Testemunha | 1,0 | - | - | - | - | 1,0 A | 1,8 A |
| | Congelamento | 2,5 | - | - | - | - | 2,5 A | |
| | Manitol | - | 2 | 3 | 4 | 2 | 2,8 | 2,3 |
| | NaCl | - | 1 | 3 | 1 | 1 | 1,5 | A |
| | Manitol + NaCl | - | 3 | 2,5 | 3 | 2 | 2,6 | |
| | | Médias | 2,0 | 2,8 | 2,7 | 1,7 | | |

¹Médias com a mesma letra minúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

²Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em: $(1)\sqrt{x+1}$.

TABELA 6 - Porcentagem de incidência de fungos em sementes de sorgo, lote 3, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ¹ | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|------|------|------|------|---------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 0,5 | - | - | - | - | 0,5 A | 1,3 A |
| | Congelamento | 2,0 | - | - | - | - | 2,0 A | |
| | Manitol | - | 1,0 | 0,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 A |
| | NaCl | - | 0,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | |
| | Manitol + NaCl | - | 0,5 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | |
| | Médias | | 0,5 | 0,3 | 0,7 | 0,7 | | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 7,0 | - | - | - | - | 7,0 A | 6,0 A |
| | Congelamento | 5,0 | - | - | - | - | 5,0 A | |
| | Manitol | - | 8,5 | 6,0 | 6,5 | 5,5 | 6,6 | 6,3 A |
| | NaCl | - | 5,0 | 6,5 | 6,0 | 6,5 | 6,0 | |
| | Manitol + NaCl | - | 5,5 | 5,0 | 11,0 | 3,5 | 6,3 | |
| | Médias | | 6,3 | 5,8 | 7,8 | 5,2 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 28,5 | - | - | - | - | 28,5 A | 26,5 A |
| | Congelamento | 24,5 | - | - | - | - | 24,5 A | |
| | Manitol | - | 18,5 | 15,5 | 23,5 | 25,0 | 20,6 | 21,6 A |
| | NaCl | - | 23,5 | 29,0 | 15,5 | 18,0 | 21,5 | |
| | Manitol + NaCl | - | 26,0 | 28,0 | 21,0 | 15,5 | 22,6 | |
| | Médias | | 22,7 | 24,2 | 20,0 | 19,5 | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 6,0 | - | - | - | - | 6,0 B | 12,5 A |
| | Congelamento | 19,0 | - | - | - | - | 19,0 A | |
| | Manitol | - | 4,5 | 11,5 | 8,5 | 5,0 | 7,4 | 8,1 B |
| | NaCl | - | 7,0 | 11,0 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | |
| | Manitol + NaCl | - | 7,0 | 6,0 | 8,0 | 11,0 | 8,0 | |
| | Médias | | 6,2 | 9,5 | 8,5 | 8,3 | | |
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 42,0 | - | - | - | - | 42,0 A | 39,8 A |
| | Congelamento | 37,5 | - | - | - | - | 37,5 A | |
| | Manitol | - | 42,0 | 42,0 | 46,5 | 45,5 | 44,0 | 41,7 A |
| | NaCl | - | 44,0 | 47,0 | 37,5 | 38,0 | 41,6 | |
| | Manitol + NaCl | - | 41,0 | 51,5 | 34,5 | 31,0 | 39,5 | |
| | Médias | | | | | | | |

...continua...

TABELA 6, Cont.

| | | Médias | 42,3 | 46,8 | 39,5 | 38,2 | | |
|--|----------------|--------|------|------|------|------|--------|--------|
| <i>Epicoccum purpurencens</i> | Testemunha | 14,0 | - | - | - | - | 14,0 A | 16,5 A |
| | Congelamento | 19,0 | - | - | - | - | 19,0 A | |
| | Manitol | - | 13,5 | 12,0 | 13,5 | 12,5 | 12,9 | 13,7 A |
| | NaCl | - | 14,0 | 15,0 | 13,5 | 16,5 | 14,8 | |
| | Manitol + NaCl | - | 14,0 | 20,5 | 8,0 | 11,0 | 13,4 | |
| | | Médias | 13,8 | 15,8 | 11,7 | 13,3 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Alternaria alternata</i> | Testemunha | 4,0 | - | - | - | - | 4,0 B | 11,0 A |
| | Congelamento | 18,0 | - | - | - | - | 18,0 A | |
| | Manitol | - | 1,5 | 5,0 | 4,5 | 2,0 | 3,3 | 4,1 B |
| | NaCl | - | 2,0 | 7,5 | 2,5 | 9,5 | 5,4 | |
| | Manitol + NaCl | - | 2,5 | 3,0 | 4,5 | 4,5 | 3,6 | |
| | | Médias | 2,0 | 5,2 | 3,8 | 5,3 | | |

¹Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em $\sqrt[1]{x+1}$.

TABELA 7 - Porcentagem de incidência de fungos em sementes de sorgo, lote 4, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ¹ | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|------|------|------|------|---------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 52,0 | - | - | - | - | 52,0 B | 69,5 A |
| | Congelamento | 87,0 | - | - | - | - | 87,0 A | |
| | Manitol | - | 62,5 | 54,5 | 63,5 | 63,5 | 61,0 | 62,8 A |
| | NaCl | - | 59,5 | 58,5 | 62,5 | 69,0 | 62,4 | |
| | Manitol + NaCl | - | 60,0 | 68,5 | 63,5 | 68,5 | 65,1 | |
| | Médias | | 60,7 | 60,5 | 63,2 | 67,0 | | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 9,0 | - | - | - | - | 9,0 A | 8,8 A |
| | Congelamento | 8,5 | - | - | - | - | 8,5 A | |
| | Manitol | - | 10,0 | 8,5 | 8,5 | 8,0 | 8,8 | 9,8 A |
| | NaCl | - | 13,5 | 6,5 | 10,5 | 10,0 | 10,1 | |
| | Manitol + NaCl | - | 9,5 | 12,5 | 7,0 | 12,5 | 10,4 | |
| | Médias | | 11,0 | 9,2 | 8,7 | 10,2 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 9,0 | - | - | - | - | 5,5 A | 7,3 A |
| | Congelamento | 5,5 | - | - | - | - | 9,0 A | |
| | Manitol | - | 6,5 | 7,5 | 7,0 | 11,0 | 8,0 | 7,9 A |
| | NaCl | - | 6,0 | 10,0 | 11,0 | 10,0 | 9,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 4,0 | 6,0 | 6,5 | 9,0 | 6,4 | |
| | Médias | | 5,5 | 7,8 | 8,2 | 10,0 | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 3,5 | - | - | - | - | 3,5 A | 5,0 A |
| | Congelamento | 6,5 | - | - | - | - | 6,5 A | |
| | Manitol | - | 6,0 | 4,0 | 7,0 | 5,5 | 5,6 | 5,3 A |
| | NaCl | - | 5,0 | 4,5 | 6,0 | 2,5 | 4,5 | |
| | Manitol + NaCl | - | 3,5 | 6,5 | 6,0 | 6,5 | 5,6 | |
| | Médias | | 4,8 | 5,0 | 6,3 | 4,8 | | |
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 4,5 | - | - | - | - | 4,5 A | 4,8 A |
| | Congelamento | 5,0 | - | - | - | - | 5,0 A | |
| | Manitol | - | 4,0 | 5,5 | 8,0 | 6,5 | 6,0 | 5,3 A |
| | NaCl | - | 7,0 | 4,0 | 4,0 | 5,5 | 5,1 | |
| | Manitol + NaCl | - | 6,0 | 4,0 | 4,0 | 5,0 | 4,8 | |

...continua...

TABELA 7, Cont.

| | | | 5,7 | 4,5 | 5,3 | 5,7 | | |
|-------------------------------|----------------|------|------|------|------|--------|--------|--------|
| <i>Epicoccum purpurencens</i> | Médias | | | | | | | |
| | Testemunha | 61,0 | - | - | - | - | 61,0 A | 66,0 A |
| | Congelamento | 71,0 | - | - | - | - | 71,0 A | A |
| | Manitol | - | 55,5 | 58,5 | 60,5 | 65,5 | 60,0 | 61,8 A |
| | NaCl | - | 52,5 | 69,0 | 63,0 | 68,5 | 63,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 60,5 | 65,5 | 65,0 | 58,0 | 62,3 | |
| | Médias | | 56,2 | 64,3 | 62,8 | 64,0 | | |
| Testemunha | 11,5 | - | - | - | - | 11,5 A | 13,0 A | |
| Congelamento | 14,5 | - | - | - | - | 14,5 A | A | |
| <i>Alternaria alternata</i> | Manitol | - | 5,5 | 9,5 | 10,5 | 8,0 | 8,4 | 9,5 A |
| | NaCl | - | 10,0 | 8,5 | 10,5 | 11,5 | 10,1 | |
| | Manitol + NaCl | - | 6,5 | 10,0 | 11,0 | 13,0 | 10,1 | |
| | Médias | | 7,3 | 9,3 | 10,7 | 10,8 | | |

¹Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

5.4 Área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos detectados nos lotes de sementes de sorgo pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos

Os resultados referentes à área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico, dos fungos detectados nos lotes de sementes de sorgo pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão, com congelamento e com restrição hídrica induzida por manitol, NaCl e manitol + NaCl em diferentes potenciais hídricos, estão apresentados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

Nos lotes testados pode-se observar que o contraste entre o tratamento-testemunha e o método de incubação com congelamento foi significativo para *D. turcica* no lote 2 ($P \leq 0,05$), Tabelas 9 e 3A; *F. moniliforme* no lote 3 ($P \leq 0,05$) Tabela 10 e 6A; e *Cladosporium cladosporioides* no lote 4 ($P \leq 0,05$), Tabela 11 e 3A.

O contraste entre os valores médios dos tratamentos adicionais (tratamento-testemunha + método de incubação com congelamento) e os valores médios dos demais (método de incubação com restrição hídrica induzida pela adição de manitol, NaCl e manitol + NaCl em vários potenciais hídricos) foi significativo ($P \leq 0,05$) para *C. graminicola* e *F. moniliforme*, ambos no lote 1 (Tabela 8).

Para *D. turcica*, no lote 1, verificaram-se efeitos significativos para solutos nos métodos de incubação modificados com restrição hídrica, apresentando os tratamentos com NaCl maior área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico em relação aos tratamentos com manitol e com manitol + NaCl ($P \leq 0,05$) (Tabela 8).

Para o fungo *C. graminicola* no lote 4, verificaram-se efeitos significativos para a interação entre potenciais hídricos e solutos ($P \leq 0,01$) (Tabela 11), mas apenas efeitos significativos para o soluto NaCl foram

constatados ($P \leq 0,05$), porém os parâmetros das equações não foram significativos, não sendo confiáveis para explicar esta relação.

Verificaram-se ainda efeitos significativos para solutos no potencial $-0,6$ MPa ($P \leq 0,05$), porém pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) não foram detectadas diferenças em relação à área superficial das sementes coberta pelo inóculo fúngico.

TABELA 8 - Área superficial das sementes coberta pelos inóculos fúngicos, no lote 1, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (Mpa) | | | | | Média ^{1,2} | |
|--|----------------|---------------------------|------|------|------|------|----------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 4,4 | - | - | - | - | 4,4 A | 3,5 A |
| | Congelamento | 2,5 | - | - | - | - | 2,5 A | |
| | Manitol | - | 3,5 | 2,4 | 3,1 | 3,5 | 3,1 | 3,2 A |
| | NaCl | - | 4,4 | 3 | 2,7 | 3,1 | 3,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 2,4 | 3,8 | 3,3 | 3,1 | 3,2 | |
| | Médias | | 3,4 | 3,1 | 3,0 | 3,2 | | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 15,9 | - | - | - | - | 15,9 A | 18,0 A |
| | Congelamento | 20,1 | - | - | - | - | 20,1 A | |
| | Manitol | - | 14,9 | 12,4 | 16,9 | 16,9 | 15,3 | 15,1 B |
| | NaCl | - | 16 | 13,6 | 16,3 | 11,8 | 14,4 | |
| | Manitol + NaCl | - | 15,3 | 16,7 | 14,8 | 15,6 | 15,6 | |
| | Médias | | 15,4 | 14,2 | 16,0 | 14,8 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 8,0 | - | - | - | - | 8,0 A | 8,8 A |
| | Congelamento | 9,6 | - | - | - | - | 9,6 A | |
| | Manitol | - | 10 | 6,1 | 6 | 7,1 | 7,3 b | 8,4 A |
| | NaCl | - | 10,5 | 9,6 | 13,7 | 9,3 | 10,8 a | |
| | Manitol + NaCl | - | 6,1 | 7,8 | 8,9 | 5,5 | 7,1 b | |
| | Médias | | 8,9 | 7,8 | 9,5 | 7,3 | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 8,4 | - | - | - | - | 8,4 A | 8,9 A |
| | Congelamento | 9,3 | - | - | - | - | 9,3 A | |
| | Manitol | - | 6 | 4,9 | 4,5 | 4,3 | 4,9 | 5,8 B |
| | NaCl | - | 4,3 | 6,4 | 5,2 | 7,4 | 5,8 | |
| | Manitol + NaCl | - | 7,6 | 6,2 | 5,8 | 7,4 | 6,8 | |

...continua...

TABELA 8, Cont.

| Médias | | 6.0 | 5.8 | 5.2 | 6.4 | | |
|-----------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------|
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 6.4 | - | - | - | - | 6.4 A |
| | Congelamento | 9.6 | - | - | - | - | 9.6 A |
| | Manitol | - | 8.1 | 8 | 5.8 | 9.3 | 7.8 |
| | NaCl | - | 7.3 | 8 | 7.3 | 4.4 | 6.8 |
| | Manitol + NaCl | - | 6.8 | 9 | 5.3 | 6.9 | 7.0 |
| | Médias | | 7.4 | 8.3 | 6.1 | 6.9 | |
| | | | | | | | 8.0 A |

¹Médias com a mesma letra minúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

²Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em: ⁽¹⁾ arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$.

TABELA 9 - Área superficial das sementes coberta pelos inóculos fúngicos, no lote 2, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ¹ | |
|--|----------------|---------------------------|------|------|------|------|---------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 1,1 | - | - | - | - | 1,1 A | 0,7 A |
| | Congelamento | 0,3 | - | - | - | - | 0,3 A | |
| | Manitol | - | 0,3 | 0,5 | 2,0 | 1,1 | 1,0 | 1,1 A |
| | NaCl | - | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 0,8 | 1,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 1,3 | 0,6 | 1,5 | 0,6 | 1,0 | |
| | Médias | | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 0,8 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 0,9 | - | - | - | - | 0,9 A | 1,0 A |
| | Congelamento | 1,1 | - | - | - | - | 1,1 A | |
| | Manitol | - | 0,4 | 1,1 | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,8 A |
| | NaCl | - | 0,6 | 0,9 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | |
| | Manitol + NaCl | - | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | |
| | Médias | | 0,6 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 3,0 | - | - | - | - | 3,0 B | 6,1 A |
| | Congelamento | 9,1 | - | - | - | - | 9,1 A | |
| | Manitol | - | 6,9 | 5,0 | 4,9 | 3,8 | 5,2 | 4,9 A |
| | NaCl | - | 6,9 | 5,3 | 5,4 | 6,0 | 5,9 | |
| | Manitol + NaCl | - | 2,9 | 5,3 | 4 | 2,8 | 3,8 | |
| | Médias | | 5,6 | 5,2 | 4,8 | 4,2 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 13,5 | - | - | - | - | 13,5 A | 10,7 A |
| | Congelamento | 7,9 | - | - | - | - | 7,9 A | |
| | Manitol | - | 7,9 | 10,3 | 6,1 | 5,6 | 7,5 | 8,6 A |
| | NaCl | - | 6,0 | 10,0 | 10,8 | 9,3 | 9,0 | |
| | Manitol + NaCl | - | 10,5 | 10,8 | 8,9 | 6,4 | 9,2 | |

...continua...

TABELA 9, Cont.

| Médias | | 8,1 | 10,4 | 8,6 | 7,1 | | | |
|-----------------------|----------------|------|------|------|------|--------|--------|------|
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 19,4 | - | - | - | 19,4 A | 19,8 A | |
| | Congelamento | 20,1 | - | - | - | 20,1 A | A | |
| | Manitol | - | 19,4 | 16,5 | 23,5 | 18,8 | 19,6 | 20,2 |
| | NaCl | - | 22,8 | 25,4 | 19,6 | 19,6 | 21,9 | A |
| | Manitol + NaCl | - | 15,8 | 18,8 | 19,6 | 22,4 | 19,2 | |
| | Médias | | 19,3 | 20,2 | 20,9 | 20,3 | | |

¹Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em: $(1)\sqrt{x+0.5}$.

TABELA 10 - Área superficial das sementes coberta pelos inóculos fúngicos, no lote 3, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ¹ | |
|-------------------------------------|----------------|---------------------------|------|------|------|------|---------------------|-----------|
| | | 0.0 | -0.4 | -0.6 | -0.8 | -1.0 | | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 0.1 | - | - | - | - | 0.1 A | 0.3 A |
| | Congelamento | 0.5 | - | - | - | - | 0.5 A | |
| | Manitol | - | 0.5 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 A |
| | NaCl | - | 0 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | |
| | Manitol + NaCl | - | 0.1 | 0 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | |
| | Médias | | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | | |
| <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 2.4 | - | - | - | - | 2.4 A | 2.0 A |
| | Congelamento | 1.5 | - | - | - | - | 1.5 A | |
| | Manitol | - | 2.6 | 1.6 | 1.6 | 1.5 | 1.8 | 1.8 A |
| | NaCl | - | 1.5 | 1.6 | 2 | 1.8 | 1.7 | |
| | Manitol + NaCl | - | 1.8 | 1.3 | 3.5 | 1.1 | 1.9 | |
| | Médias | | 2.0 | 1.5 | 2.4 | 1.5 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 11,8 | - | - | - | - | 11,8 A | 12.0 A |
| | Congelamento | 12,1 | - | - | - | - | 12,1 A | |
| | Manitol | - | 8,3 | 5,9 | 10,1 | 10,4 | 8,7 | 9,2 A |
| | NaCl | - | 8,9 | 13,6 | 7,1 | 7,6 | 9,3 | |
| | Manitol + NaCl | - | 12,3 | 12,4 | 8,6 | 5,1 | 9,6 | |
| | Médias | | 9,8 | 10,6 | 8,6 | 7,7 | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 4,4 | - | - | - | - | 4,4 B | 8,4 A |
| | Congelamento | 12,3 | - | - | - | - | 12,3 A | |
| | Manitol | - | 3,6 | 9,4 | 6,4 | 4,5 | 6,0 | 6,3 A |
| | NaCl | - | 6 | 8,1 | 6,3 | 6,1 | 6,6 | |
| | Manitol + NaCl | - | 5,4 | 5 | 6,3 | 8,4 | 6,3 | |

...continua...

TABELA 10, Cont.

| Médias | | 5.0 | 7.5 | 6.3 | 6.3 | | |
|-----------------------|----------------|------|------|------|------|--------|--------|
| | Testemunha | 18.6 | - | - | - | 18.6 A | 17.4 A |
| | Congelamento | 16.1 | - | - | - | 16.1 A | |
| <i>Phoma sorghina</i> | Manitol | - | 16.3 | 15.9 | 17 | 17.4 | 16.7 |
| | NaCl | - | 17.4 | 19.1 | 16.6 | 14.6 | 16.9 A |
| | Manitol + NaCl | - | 15.3 | 21.1 | 14.1 | 13.1 | 15.9 |
| | Médias | | 16.3 | 18.7 | 15.9 | 15.0 | |

¹Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

TABELA 11 - Área superficial das sementes coberta pelos inóculos fúngicos, no lote 4, submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em papel de filtro padrão, papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| Fungos | Tratamentos | Potenciais hídricos (MPa) | | | | | Médias ^{1,2} | |
|--|----------------|---------------------------|------|-------|------|------|-----------------------|-----------|
| | | 0,0 | -0,4 | -0,6 | -0,8 | -1,0 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Testemunha | 17,1 | - | - | - | - | 17,1 B | 22,6 A |
| | Congelamento | 28,1 | - | - | - | - | 28,1 A | |
| | Manitol | - | 20,1 | 17,8 | 19 | 19,1 | 19,0 | 20,1 A |
| | NaCl | - | 18,4 | 18,4 | 21 | 21,8 | 19,9 | |
| | Manitol + NaCl | - | 19,8 | 23,9 | 19,8 | 21,6 | 21,3 | |
| | Médias | | 19,4 | 20,0 | 19,9 | 20,8 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Colletotrichum graminicola</i> | Testemunha | 3,6 | - | - | - | - | 3,6 A | 3,1 A |
| | Congelamento | 2,6 | - | - | - | - | 2,6 A | |
| | Manitol | - | 3,4 | 2,4 a | 3,6 | 2,4 | 3,0 | 3,5 A |
| | NaCl | - | 5,5 | 2,3 a | 3,9 | 3,3 | 3,8 | |
| | Manitol + NaCl | - | 3,8 | 4,6 a | 2,3 | 3,9 | 3,7 | |
| | Médias | | 4,2 | 3,1 | 3,3 | 3,2 | | |
| <i>Drechslera turcica</i> | Testemunha | 2,9 | - | - | - | - | 2,9 A | 4,0 A |
| | Congelamento | 5,0 | - | - | - | - | 5,0 A | |
| | Manitol | - | 3,8 | 3,6 | 4,4 | 5,8 | 4,4 | 4,5 A |
| | NaCl | - | 3,3 | 6,1 | 6,6 | 6,4 | 5,6 | |
| | Manitol + NaCl | - | 2,1 | 2,9 | 3,9 | 4,9 | 3,5 | |
| | Médias | | 3,1 | 4,2 | 5,0 | 5,7 | | |
| ⁽¹⁾ <i>Fusarium moniliforme</i> | Testemunha | 2,0 | - | - | - | - | 2,0 A | 2,6 A |
| | Congelamento | 3,1 | - | - | - | - | 3,1 A | |
| | Manitol | - | 2,9 | 2,3 | 3,6 | 3 | 3,0 | 2,5 A |
| | NaCl | - | 2 | 2,3 | 2,9 | 1,4 | 2,2 | |
| | Manitol + NaCl | - | 1,4 | 2,6 | 2,4 | 3,1 | 2,4 | |

...continua...

TABELA 11, Cont.

| Médias | | 2.1 | 2.4 | 3.0 | 2.5 | | | |
|-----------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|
| <i>Phoma sorghina</i> | Testemunha | 1.4 | - | - | - | 1.4 A | 1.4 A | |
| | Congelamento | 1.3 | - | - | - | 1.3 A | | |
| | Manitol | - | 1.3 | 1.5 | 3.4 | 1.8 | 2.0 | 1.7 |
| | NaCl | - | 1.9 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.6 | A |
| | Manitol + NaCl | - | 1.9 | 1 | 1.1 | 1.5 | 1.4 | |
| | Médias | | 1.7 | 1.3 | 2.0 | 1.6 | | |

¹Médias com a mesma letra minúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

²Médias com a mesma letra maiúscula na coluna, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Dados transformados em $(1)\sqrt{x+0.5}$.

Para a maioria das variáveis avaliadas em relação à incidência e à área superficial das sementes coberta pelos inóculos fúngicos as análises estatísticas foram não significativas, o que significa que o uso da restrição hídrica em testes de sanidade não interfere na detecção dos referidos fungos associados às sementes de sorgo.

Celano (2003) verificou que o uso da restrição hídrica induzida pelos solutos manitol e NaCl não interferiu na detecção dos principais fungos associados à sementes de trigo. Coutinho (2000) também constatou que a restrição hídrica não interferiu na detecção de fungos em sementes de arroz.

MACHADO, A.Q. Uso da restrição hídrica em teste de sanidade de sementes de algodoeiro. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, J. da C. Tratamento de sementes no controle de doença. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MICHEL, B.E; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, Madison, v.87, n.1, p.126-130, Jan./Feb. 1995.

NEEGAARD, P. Seed pathology. London: Macmilan, 1979. v.2, 839p.

PINTO, N.F.J. de A. Patologia de sementes de sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1999. 62p. (Circular Técnica, 32).

SAS Institute. SAS technical report SAS/STAT software: changes and enhancement release 607. Cary Nc: SAS Institute, 1992.

VAN DER MOEZEL, P.G.; BELL, D.T. The effect of salinity on the germination of some Western Australian *Eucalyptus* and *Melaleuca species*. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.15, n.1, p.239-246, 1987.

CAPÍTULO 3

APPLICATION OF WATER RESTRICTON TECHNIQUE IN STUDIES ON INTERACTION BETWEEN *Fusarium verticillioides* AND MAIZE SEEDS

1 RESUMO

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Aplicação da técnica de restrição hídrica em estudos sobre a interação entre *Fusarium verticillioides* e sementes de milho. In:_____. Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações. 2005. Cap. 3, p.75-92. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Este trabalho foi conduzido para avaliar a potencialidade da técnica de restrição hídrica como uma ferramenta para estudar a relação entre *Fusarium verticillioides* e sementes naturalmente infectadas de milho. As sementes foram inicialmente incubadas em papel mata-borrão osmoticamente modificado por incorporação de manitol suficiente para propiciar um potencial de -1,0 MPa, por um período de 7 dias. Em seguida, as sementes foram classificadas e separadas em cinco classes de acordo com uma escala estabelecida com base na densidade de inóculo de *F. verticillioides* desenvolvido em sementes não germinadas. As sementes foram semeadas em substrato de solo e as plantas, cultivadas em condições controladas durante 25 dias. Todas as variáveis estudadas, taxa de germinação, velocidade de emergência, altura de planta e peso, foram inversamente afetadas pela densidade de inóculo do fungo associado às sementes. O efeito mais severo do fungo ocorreu no sistema radicular, no potencial de inóculo mais elevado.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Renato Mendes Guimarães - UFLA

2 ABSTRACT

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Application of water restriction technique in studies on interaction between *Fusarium verticillioides* and maize seeds. In:_____. **Water restriction in seed pathology: new applications**. 2005. Cap. 3, p.75-92. Thesis (Doctoral in Phytopathology)-Federal University of Lavras, Lavras.*

This work was conducted to evaluate the potential of the water restriction technique as a tool to study the relationship between *Fusarium verticillioides* and naturally infected seeds of maize. Seeds were initially incubated on blotters osmotically modified by incorporation of mannitol sufficient to provide potential of -1.0 MPa for 7 days. Seeds were classified and separated into five classes according to a grading system that was established based on the inoculum density of *F. verticillioides* developed on ungerminated seeds. Seed were sowed in soil substrate and plants were grown under controlled conditions for 25 days. All variables used, germination rate, emergence speed, plant heights and weights were inversely affected by the inoculum density of the fungi associated with seeds. The most severe effect of the fungus occurred on the root systems at the highest inoculum potential.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Renato Mendes Guimarães - UFLA

3 INTRODUCTION

The interaction between *Fusarium verticillioides* (Syn. *F. moniliforme*) and seeds of maize is an old and conflicting matter under discussion by plant pathologists. To some researchers, the fungus is a weak pathogen to maize that reduces seed germination and to other workers, it is responsible for significant losses to farmers by causing stalk rot in the field (De Léon, 1984; Fernandes & Oliveira, 1997). Contrarily, that species of *Fusarium* is also able to produce toxins when associated with grains that causes a big concern under quality control of food stuff used by humans and animals (Neergaard, 1979; Singh et al., 1991; Lazzari, 1997). According to the experience of the authors of this paper and based on available reports, *F. verticillioides* is commonly found in association with seeds and grains at high levels, mostly close to 100% (Neergaard, 1979; Richardson, 1990). Under the Brazilian conditions, *F. verticillioides* is associated mostly to pre-emergence death of seeds and seedling damping-off in maize (Fernandes & Oliveira, 1997).

To understand the real relationship between fungi and seeds of susceptible species, different tools or methodology can be employed (Popp, 1951; Aulakh et al., 1974; Colhoun, 1983; Cunfer, 1983; Shah et al., 2002). In general, the available techniques are not able to follow the individual development of the disease from a naturally infected seeds with different inoculum potentials. If the infected seedlings are developed under the seed health testing conditions and transferred to a seeding substrate, then the status of the seedlings can be followed. For most of the cases, artificial methods of seed inoculation are normally required in studies aimed to evaluate the effects of pathogens from seeds. In the present study, the use of a water restriction technique was investigated to evaluate the effects of *F. verticillioides* in maize

seeds at the initial stages of plant development. The motivation for this approach was that the water restriction technique has proved very promising in seed health testing and it has been used to infect seeds in several cases. In ongoing studies at the Federal University of Lavras, Brazil, it has been demonstrated that the water restriction technique can be a very useful tool to get seed infection with different inoculum potentials and as a mean to control the seed germination process during blotter test incubation in several cases (Carvalho, 1999; Boueri et al., 2000; Coutinho, 2000; Machado et al., 2004).

4 MATERIALS AND METHODS

4.1 Description of the water restriction technique

The principle of this technique, as used in seed technology, is based on the control of water uptake by seeds by modification of the osmotic potential of the water solution. By control of the osmotic potential of a solution, seeds are allowed to uptake water sufficient to initiate the germination process but insufficient to cause radicle protrusion (Heydecker et al., 1975; Bewley & Black, 1994). This means that seed development goes on to the pre-phase of radicle protrusion. In the present case, maize seeds were initially submitted to the standard blotter test. That is, the paper substrate (filter paper pads) were moistened with a mannitol solution with osmotic potential of -1.0 MPa. Seeds on blotters in Petri dishes of 15 cm diameter, 25 seeds/dish, were maintained in an incubator with day-light (photoperiod of 12h) and controlled temperature (20 ± 2 °C), for 7 days.

According to the inoculum density, that was based on typical mycelium of *F. verticillioides* developed on ungerminated seeds (Figure 1), these were grouped in to five categories, as follows: 1- seeds with no visible fungal mycelium; 2- mycelium covering 1 to 25 % of the seed surface; 3- mycelium on 26 to 50% of the seed; 4- mycelium covering 51-75% of the seeds, and 5- mycelium present on over 75% of the seed surface.

One hundred seeds for each inoculum density (category), were singly sowed in seeding boxes, 25 seeds per box. All boxes were kept in a growth room with day-light (16 h light/ 8 h dark) and temperature (25 °C) controlled for 25 days. Controlled irrigation was done daily throughout the experiment period.

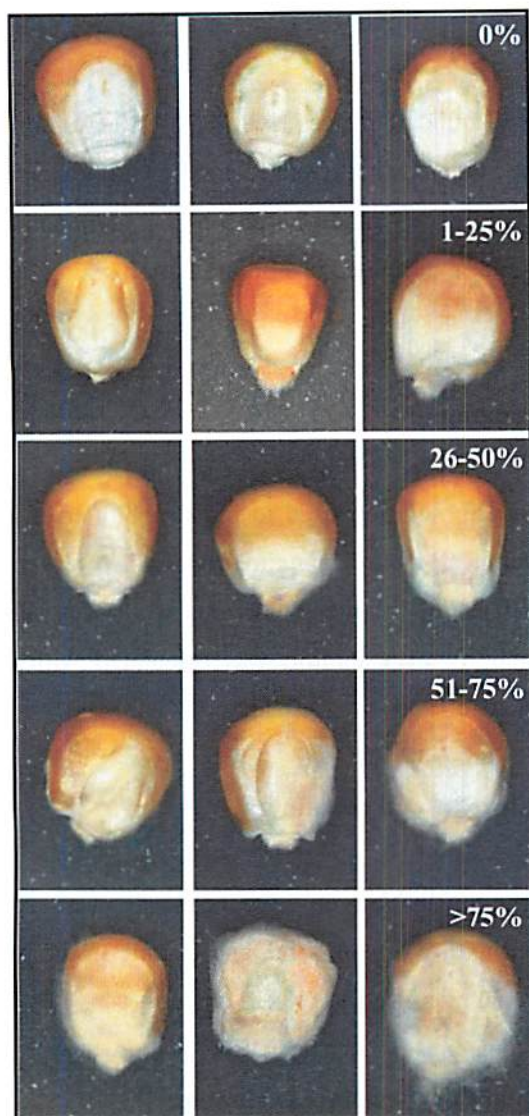


FIGURE 1 - Plated seeds of maize on blotter osmotically modified by mannitol, showing different inoculum densities of *Fusarium verticillioides* after 6 days incubation (1- Seeds with no visible fungal mycelium; 2- Mycelium covering 1 to 25 % of the seed surface; 3- Mycelium on 26 to 50% of the seed; 4- Mycelium covering 51-75% of the seeds, and 5- Mycelium present in over 75% of the seed surface).

4.2 Seed sample

One seed bulk of maize, Hybrid 30 F80, was drawn from a seed lot produced in the State of Minas Gerais, Brazil in the season 1999/2000. Selection of the seed sample was made based on the germination rate and level of *F. verticillioides* as determined in a preliminary freezing blotter test (Neergaard, 1979).

4.3 Osmotic compound

The osmotic solution used to moisten blotters was prepared with the addition of technically pure mannitol to distilled water so as to provide a potential of -1.0 MPa, following previous work (Carvalho, 1999; Coutinho, 2000). The quantity of mannitol, was calculated with the software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995).

4.4 Seeding substrate and containers

After the incubation on blotters, seeds were sowed in a substrate composed by a mixture of soil, sand, and manure in the proportion of 1:1:1 in wooden boxes that measured 45x38x12 cm.

4.5 Seed and plant performance evaluation

The effects of *F. verticillioides* on the performance of seed and young plants of maize were evaluated by making records of: i, germination and plant population (stand) at 7 and 25th days after sowing; ii, rate of speed seedling emergence according to Maguire (1962), and plant height on the 15th day; and

iii, weights of dry and fresh above-ground portion and root system of plants on the 25th day after sowing. The weight of dry plant material was measured after a drying period in a circulating air incubator at 40 °C for 72 h.

4.6 Experimental design and statistical analysis

The experiment was designed in randomized treatments with four replicates, each replicate represented by one seeding box with 25 seeds. Data were submitted to variance and regression analysis and by determining correlations between classes of inoculum density and all variables considered in this trial.

5 RESULTS AND DISCUSSION

The seed lot used in this study initially had a high incidence (70.5%) of *F. verticillioides* and a high percentage of germination (97.0 %) in the laboratory. That profile can be considered as representative of the seed quality of a large number of lots of maize commercialized in Brazil in some seasons. Under normal weather conditions, the damaging effects by *F. verticillioides* in the developing crop are hardly observed, neither on seed germination nor on the developing crop in the field. However, the results shown in Figures 2, 3, 4, 5, 6 and 7, provide clear evidence that *F. verticillioides* can be severely damaging to maize at the initial stage of plant development when inoculum potential in seeds is initially high. The percentage of germination declines significantly when the fungus is present at inoculum levels higher than category 4 (Fig. 2); reduction of around 60 % in the germination rate occurs when inoculum density of the fungus is more than 75% according to the grading system used in this work. Plant population (stands) was reduced on a linear slope for both trials at 15 and 25 days after sowing. For both features of germination and plant stands, the correlation coefficients (R^2) were high.

For the other variables of index of seedling emergence and plant heights and weights, the effects of the fungus follow the same trend as recorded for germination and stands with little variation between averages. An interesting aspect was the severe effect of *F. verticillioides* on the weight of the root system of maize. The dry weight of the root system was reduced to almost nill when seeds, used for planting, were covered by the fungal mycelium at proportions higher than 75% (Figure 7).

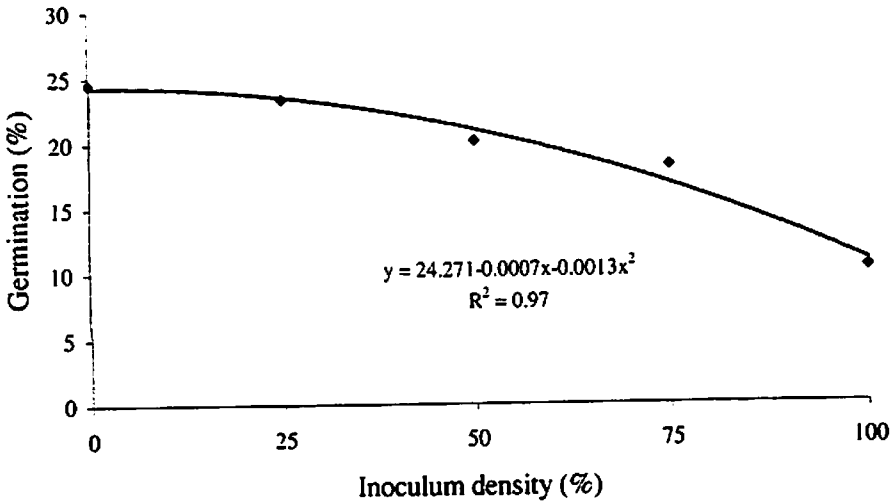


FIGURE 2 - Correlation between germination of maize seeds and inoculum density of *Fusarium verticillioides*.

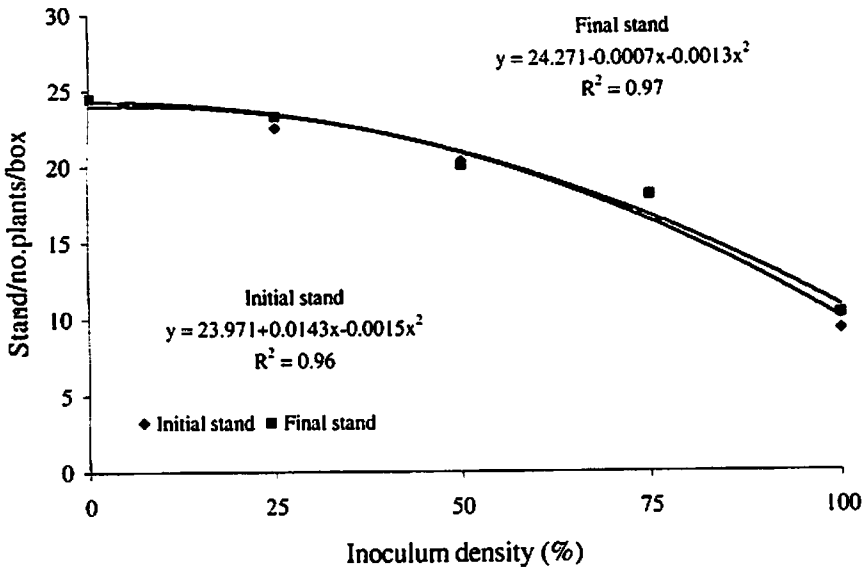


FIGURE 3 - Correlation between plant population (stand) and inoculum density of *Fusarium verticillioides* in maize seeds.

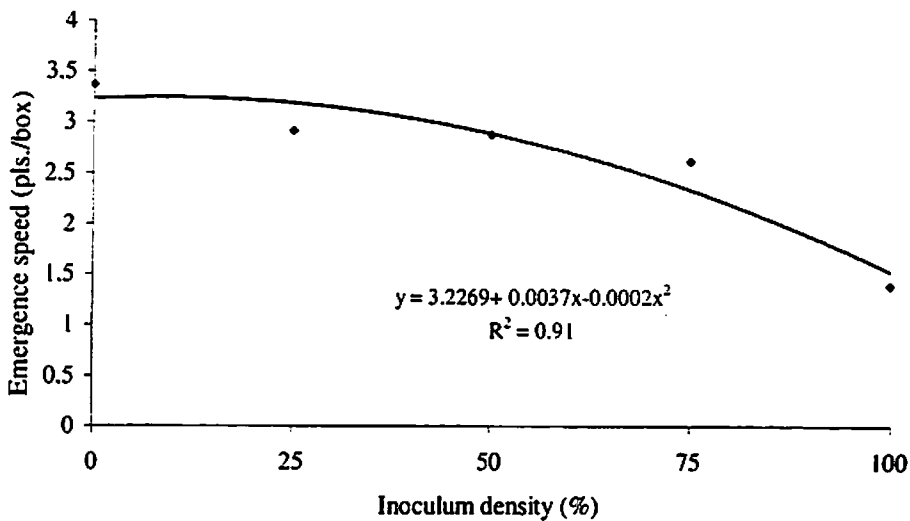


FIGURE 4 - Correlation between emergency speed index of maize seeds and inoculum density of *Fusarium verticillioides*.

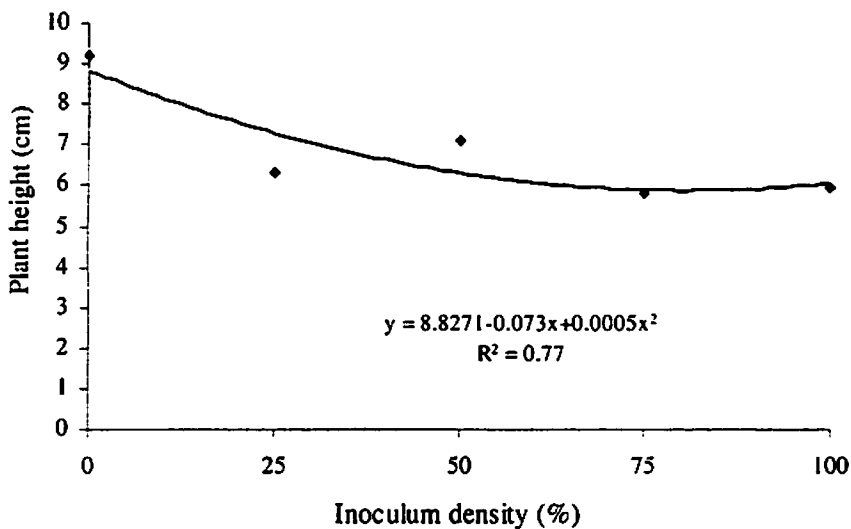


FIGURE 5 - Correlation between plant height and inoculum density of *Fusarium verticillioides* in maize seeds.

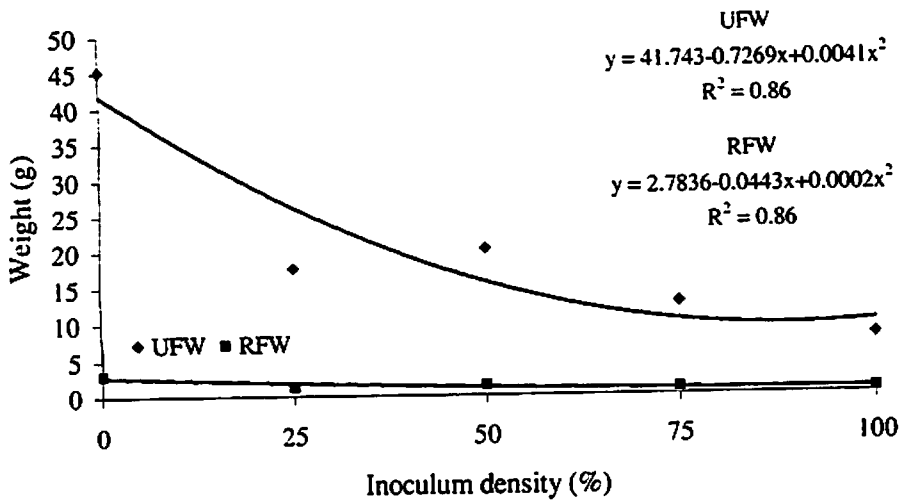


FIGURE 6 - Correlation between fresh weights of plant material and inoculum density of *Fusarium verticillioides* in maize seeds.

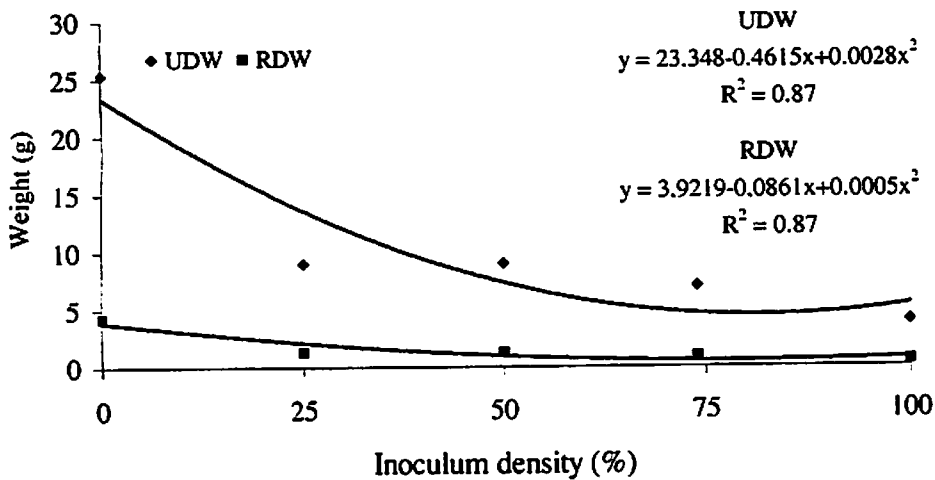


FIGURE 7 - Correlation between dry weights of plant material and inoculum density of *Fusarium verticillioides* in maize seeds.

It is also relevant to note that necrotic symptoms on the roots caused by *F. verticillioides* were seen. Except for the rate of germination, the effects of *F. verticillioides* on the development of young plants of maize for all variables considered was proportionally inverse to the initial inoculum density of the pathogen in seeds.

From these results, it is clear that the inoculum density of *F. verticillioides* may play an important role in the interaction between this organism and seeds of maize. The higher the inoculum density in seeds, the more severe the effects on the performance of seeds and seedlings. The advantage of the water restriction technique in comparison with other technologies is that by this technique, classification of seeds according to levels of inoculum density of a fungus can be made easily and safely on ungerminated seeds. In addition, seeds can be dried back and stored for later use. By other techniques as discussed by Machado & Carvalho (1975), Colhoun (1983), Cunfer (1983), and Machado et al. (2004), studies focused on the relation between seed infection and disease development in the field do not take into consideration the position and inoculum potentials in ungerminated seeds but only levels of incidence (percentage) by using different seed lots. In that case several sources of variation may take place such as fungal races, origin of the lot and genetic purity of the host, thus making it difficult to interpret the results. Contrarily, inoculation of seeds by the soaking process, that means imbibition of seeds in a conidial suspension, or by dry mixing seeds with inoculum, deals with initial contamination rather than with infection. Seeds of some species submitted to the soaking treatment may be also physically injured.

By means of water restriction technology, only one seed lot is required and the chances to get infection by the fungus at different levels of inoculum potential, are quite high. In addition, for fungi such as *F. verticillioides*, all kinds

of inoculum, like mycelium, conidia, and chlamidospores may be present in the interaction with seeds.

In cases where the incidence of fungi in seed samples is quite low naturally, an alternative to the present technique is to follow the procedure reported by Machado et al. (2004). That is different potentials of fungal inoculum can be obtained by keeping seeds in contact with developing colonies, osmotically modified, for different periods of incubation. Time of exposure in those cases stand for different inoculum potentials, as it has been demonstrated in previous work (Carvalho, 1999; Prado et al., 2002).

Another important issue to be considered is that when seeds are kept on an osmotic substrate, as it is the case of water restriction technique, would be a factor that causes stress to seeds and therefore it makes the seeds more susceptible to the associated pathogens. This can be interpreted as the osmotic pre-conditioning of seeds. This technique is largely used by seed technologists with the objective to improve the rate of germination rate and to obtain uniformity of stand in the field (Heydecker et al., 1975). When fungi are present in the seed lot before priming, interference of some species can be suppressed by the incorporation of antifungal compounds to the osmotic solution or to other pre-conditioning substrates (Maude, 1996; Magalhães, 2000).

6 REFERENCES

- AULAKH, K.S.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Comparison of seed-borne infection of *Drechslera oryzae* as recorded on blotter and in soil. **Seed Science and Technology**, Norway, v.2, n.3, p.385-391, 1974.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.
- BOUERI, M. A. et al. Metodologia de restrição hídrica visando à inibição da germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine Max* L.) e Algodão (*Gossypium* spp) no teste de sanidade. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS (CICESAL), 13., 2000, Lavras. Anais... Lavras: ESAL, 2000. p.254.
- CARVALHO, J.C.B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science)- Federal University of Lavras, Lavras.
- COLHOUN, J. Measurement of inoculum per seed and its relation to disease expression. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.11, n.3, p.665-671, 1983.
- COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology)- Federal University of Lavras, Lavras.
- CUNFER, B.M. Epidemiology and control of seed-borne *Septoria nodorum* of wheat. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.11, n.3, p.707-718, 1983.
- De LÉON, C. **Enfermedades del maíz - una guía para su identificación en el campo**. 3.ed. México: CIMMYT; 1984. 114p.
- FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1997. 80 p. (Circular Técnica, 26).

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds?
Seed Science and Technology, Norway, v.3, n.3, p.881-888, 1975.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Edição do Autor, 1997. v.1, 148p.

MACHADO, J. da C.; CARVALHO, M.G. Comportamento de cultivares de soja (*Glycine max.* L.) diante de isolamentos de *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore e transmissão do patógeno pelas sementes em função da época de infecção de planta. **Experientiae**, Viçosa, v.19, n.7, p.119-148, 1975.

MACHADO, J. da C. et al. Use of water restriction technique in seed pathology. **Seed Testing International**, Zürich, n.128. p.14-18. Oct. 2004.

MAGALHÃES, F.H.L. **Desempenho de sementes de cenoura infectadas por espécies de *Alternaria* após condicionamento fisiológico**. 2000. 45p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology)-Federal University of Lavras, Lavras.

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

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, n.1, p.126-130, Jan./Feb.1995.

MAUDE, R.B. **Seedborne diseases and their control: principles and practice**. Wallingford: CAB International, 1996. 280p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: McMillan, 1979. 2v.,1191p.

POPP, W. Infection in seeds and seedlings of wheat and barley in relation to development of loose smut. **Phytopathology**, Lancaster, v.41, n.3, p.261-275, Mar. 1951.

PRADO, P.E.R. et al. Eficácia do tratamento químico de sementes de algodoeiro em relação ao potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p.52

RICHARDSON, M.J. An annotated list of seed-borne diseases. 4.ed.
Zürich: International Seed Testing Association, 1990. Not paginated.

SHAH, D.A.; BERGSTROM, G.C.; SORRELLS, M.E. Relationship between wheat seed infection by *Stagonospora nodorum* and seed weight. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.30, n.2, p.339-346, 2002.

SINGH, K. et al. An illustrated manual on identification of some Seed-borne *Aspergilli, Fusaria, Penicillia* and their toxins. Hellerup, DK: Danish Gov. Inst. Seed Pathol. for Developing Countries, 1991. 133p.

CAPÍTULO 4

EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Sclerotinia sclerotiorum* NAS CONDIÇÕES DO TESTE NEON

1 RESUMO

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Efeitos da restrição hídrica no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* nas condições do teste Neon. In:_____. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações.** 2005. Cap.4, p.93-109. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O objetivo neste trabalho foi avaliar a possibilidade de modificação do meio Neon e do meio Neon-sementes por meio da restrição hídrica induzida por manitol visando à inibição da germinação das sementes durante o período de teste para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em substituição ao 2,4-D. Utilizaram-se dois isolados, o isolado 1, procedente de Cristalina-GO, e o isolado 2, de Paracatu-MG, ambos coletados no ano de 2001. Observou-se que a restrição hídrica proporcionada por manitol nos potenciais de -1,0 MPa e -1,2 MPa, tanto em ambiente de incubação com fotoperíodo de 12 horas quanto em ambiente em escuro contínuo, pode ser utilizada em substituição ao uso de 2,4-D para testes de detecção de *S. sclerotiorum* em meio Neon. Nestas condições a mudança de cor do substrato, de azul para amarelo, não foi afetada pelos tratamentos com restrição hídrica.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Renato Mendes Guimarães - UFLA

2 ABSTRACT

MAGALHÃES, Flávio Henrique Linhares. Effects of water restriction on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* under conditions of the Neon seed health test. In: _____. **Water restriction in seed pathology: new applications.** 2005. Cap.4. p.93-109. Thesis (Doctoral in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras, Lavras.*

The objective in this work was to evaluate the possibility of modifying the agar medium developed to detect *Sclerotinia sclerotiorum* by means of water restriction induced by mannitol aimed at the inhibition of seed germination during the test period for detection of that fungus in the place of 2,4-D. Two isolates, one from Cristalina-Go and the other from Paracatu-MG, both collected in the year of 2001 were used. It was found that water restriction provided by mannitol at the potentials of -1.0 MPa and -1.2 MPa under incubation with 12-hour photoperiod and in continuous dark may be used in the place of 2,4-D for detection of *S. sclerotiorum* in Neon medium. Under those circumstances change in color, from blue to yellow, of the substrate was not affected by the water restriction treatment.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Renato Mendes Guimarães - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Entre os fungos transmitidos por sementes *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que causa mofo branco em soja e feijão irrigado, é um dos patógenos mais prejudiciais, causando grandes perdas. As perdas mais significativas de rendimento de feijão desde os anos 80 no Brasil foram causadas por *S. sclerotiorum* especialmente nos “cerrados”, onde a área de feijão irrigado aumentou (Peres et al., 2002).

O uso de sementes sadias tem sido a principal medida para evitar a entrada do patógeno em novas áreas de plantio; dessa forma, torna-se importante a aplicação de testes de sanidade visando à detecção prévia de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes destinados ao plantio.

Os testes oficiais para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes, recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Método do Papel de Filtro e Método do Rolo de Papel (Brasil, 1992), demandam 37 dias, incluindo 30 dias de incubação das sementes no escuro a 5-7 °C para formação de escleródios, caso o patógeno esteja presente.

Alguns trabalhos em que se utilizaram meios de cultura semi-seletivos contendo o indicador de pH azul de bromofenol mostraram ser possível reduzir o tempo de detecção (Steadman et al., 1994; Nasser et al., 1999; Napoleão, 2001; Peres et al., 2002).

Nasser et al. (1995) desenvolveram um meio de cultura para avaliar a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*, denominado Meio Neon (1 litro de BDA autoclavado + 150 mg de azul de bromofenol + 150 mg de penicilina G + 150 mg de estreptomicina, ácido clorídrico (HCl) q.s.p. pH 4,7), o qual foi utilizado por Napoleão (2001) e Peres et al. (2002) para detectar o patógeno em sementes. Este meio apresenta a inconveniência de, logo após a sua

esterilização, ser necessário adicionar o azul de bromofenol e os antibióticos e ajustar o pH para 4,7, o que é dificultado pela presença do ágar como agente solidificante, aumentando a probabilidade de contaminação, e também por não conter o ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) como inibidor da germinação de sementes.

O meio Neon, desenvolvido para verificar a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, sofreu modificações, Neon-S (sementes), com objetivo de facilitar o seu preparo e introduzir o ácido 2,4-D para sua utilização na detecção deste patógeno em sementes. Selecionou-se um antibiótico de amplo espectro e uma forma do ácido 2,4-D que suportasse a autoclavagem. Verificaram-se a concentração ideal de azul de bromofenol e as condições ideais de luminosidade e de temperatura para a incubação das sementes sobre este meio. Todos os ingredientes do novo meio foram adicionados antes da autoclavagem e o ajuste de pH foi dispensado (¹Napoleão, 2004 - Comunicação pessoal).

Nos testes de sanidade de sementes de algumas espécies vegetais, realizados pelos métodos de incubação em papel de filtro e em meio agarizado, a germinação rápida das sementes dificulta a identificação dos fungos e pode comprometer a validade desses métodos pela possibilidade de contaminações secundárias entre as sementes e o exterior do recipiente. Para inibir a germinação das sementes ou reduzir o comprimento das plântulas, esses métodos são realizados com algumas modificações, como o uso de 2,4-D ou do congelamento das sementes incubadas. No entanto, esses procedimentos devem ser usados com cautela, pois o 2,4-D, dependendo da concentração utilizada, pode ser fungitóxico e o congelamento pode favorecer contaminações por

¹Reginaldo Lamberti Napoleão - Prof. Dr. em Fitopatologia
Faculdades Federais Integradas de Diamantina.
Diamantina-MG.

bactérias e fungos saprofíticos (Limonard, 1968). Por ser um produto carcinogênico, o 2,4-D constitui também um risco para os usuários do laboratório (Coutinho, 2000).

O método de incubação em papel de filtro com 2,4-D foi incluído no capítulo de Patologia de Sementes das Regras de Análises de Sementes da ISTA (International Seed Testing Association), 1976, para testes de sanidade em sementes de brássicas. A concentração desse produto a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ tem sido utilizada para reduzir o comprimento de plântulas de algodoeiro, feijoeiro e soja em testes de sanidade de sementes (Machado, 1988; Machado & Langerak, 1993).

Dessa forma, objetivou-se verificar o efeito da restrição hídrica, proporcionada pelo soluto manitol, no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* no teste Neon.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período compreendido entre os meses de outubro e dezembro de 2004.

4.1 Obtenção dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Dois isolados foram usados nesse trabalho. Os isolados foram obtidos de escleródios presentes em vagens de feijão cultivar pérola cultivado sob pivô central. O isolado 1 foi procedente de Cristalina-GO e o isolado 2, de Paracatu-MG, ambos coletados no ano de 2001. As vagens contendo os esclerócios foram conservadas em câmara fria e seca até o início dos experimentos.

Os escleródios foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 1 minuto; após a secagem, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram mantidas em câmara com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz negra (comprimento de onda próximo a ultravioleta). Após o crescimento da colônia, discos de 5 mm de diâmetro foram cortados das bordas das colônias em crescimento, transferidos para placas de Petri contendo BDA e mantidos em incubação da mesma forma como feito para o isolamento, com a finalidade de obter colônias puras de ambos os isolados.

4.2 Preparo do meio Neon padrão, Neon sementes e ambos com restrição hídrica

Para o preparo do meio Neon padrão (Nasser et al., 1995; Peres, 1996) utilizaram-se, para 1 litro de meio BDA, 150 mg de sulfato de estreptomicina, 150 mg de penicilina G e 150 mg de azul de bromofenol.

Os antibióticos foram adicionados ao meio após autoclavagem, quando o mesmo, após resfriamento, atingiu 50 °C; o azul de bromofenol foi adicionado antes da autoclavagem do meio, quando se ajustou o pH para 4,7 utilizando-se ácido clorídrico e hidróxido de sódio a 1N.

O meio Neon sementes (Napoleão, 2004) foi preparado utilizando, para 1 litro de meio BDA, 50 mg de clorafenicol, 50 mg de 2,4-D ácido livre e 50 mg de azul de bromofenol, todos os componentes foram adicionados ao meio antes da autoclavagem, não sendo necessária a correção do pH.

A modificação dos meios por adição do soluto manitol foi realizada apenas adicionando 74,79g e 89,67g de manitol (por litro de água) no meio Neon padrão para se obterem os potenciais hídricos equivalentes a -1,0 MPa e -1,2 MPa.

Para o Neon sementes, retirou-se o 2,4-D e adicionou-se o manitol 74,79g e 89,67g (por litro de água) proporcionando potencial hídrico de -1,0 MPa e -1,2 MPa; nesse caso foi necessária a correção do pH antes da autoclavagem.

4.3 Comportamento do fungo em meio Neon

Discos miceliais das margens dos isolados fúngicos com 3 dias de crescimento em meio BDA foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo as seguintes combinações de meios Neon:

- 1) Neon padrão
- 2) Neon padrão -1,0 MPa
- 3) Neon padrão -1,2 MPa

4) Neon sementes

5) Neon sementes -1,0 MPa

6) Neon sementes -1,2 MPa

As placas contendo ambos os isolados e todas as combinações de meio Neon acima citadas, em número de 3 repetições, foram mantidas em duas câmaras do tipo B.O.D a 20 °C, uma em escuro contínuo e outra com fotoperíodo de 12 horas.

As placas foram então avaliadas para mudança de cor do meio Neon ao redor do disco micelial do fungo. Foram utilizadas 3 repetições por isolado para cada combinação dos meios Neon e regime de luz; o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

Realizaram-se duas leituras, às 36 e 48 horas após a montagem dos ensaios, medindo-se dois diâmetros ortogonais do halo amarelado que se formou devido ao crescimento micelial do fungo, provocando a mudança de cor do meio Neon.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento dos isolados foi acompanhado pela mudança de coloração inicial do meio Neon em todas as combinações testadas, tanto nas incubadas no escuro contínuo ou com fotoperíodo de 12 horas.

Com 12 horas de incubação já foi possível notar uma pequena mudança na coloração dos meios Neon, mas não permitia uma perfeita distinção do limite do halo amarelado. Dessa forma, optou-se por realizar a primeira leitura após 36 horas, o que permitiu distinguir claramente o delineamento do contorno do halo amarelado produzido pela mudança de cor dos meios Neon em todas as combinações de tratamentos (Figura 1). Efetuou-se mais uma leitura às 48 horas, quando o crescimento micelial estava próximo de atingir os 9,0 cm de diâmetro da placa de Petri. Após 60 horas, todas as placas com ambos os isolados haviam mudado da cor azul para a amarela (Figura 2).

Para o isolado 1 o diâmetro médio do halo amarelado do meio Neon padrão foi maior em relação aos demais tratamentos, quando incubado em 12 horas de fotoperíodo; no escuro os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para ambas as leituras, 36 e 48 horas (Tabela 1 e 1B).

Em relação ao isolado 2, o diâmetro médio do halo amarelado do meio Neon padrão, para ambas as leituras (36 e 48 horas) e condições de incubação (fotoperíodo de 12 horas e no escuro), foi maior em relação aos demais tratamentos (Tabela 1 e 2B).

A troca de cor do azul de bromofenol presente no meio Neon ocorre devido a uma alteração do pH do meio, denotando a produção de um composto ácido pelo fungo. Isso ocorre como resultado da produção de ácido oxálico pelo patógeno (Suton & Deverall, 1983).

TABELA 1 - Diâmetro médio (cm) do halo amarelado, oriundo da mudança de coloração do meio Neon, devido ao crescimento micelial de dois isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* cultivados em meio Neon padrão, Neon sementes e em ambos com restrição hídrica proporcionada pelo soluto manitol, nos potenciais hídricos de -1,0 MPa e -1,2 MPa, em dois modos de incubação e em dois tempos de medição.

| Isolado 1 | luz | | escuro | |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 36 horas | 48 horas | 36 horas | 48 horas |
| Neon padrão | 5,3 a* | 7,5 a | 4,8 a | 7,0 a |
| Neon padrão -1,0 MPa | 4,5 b | 6,5 b | 4,8 a | 6,6 a |
| Neon padrão -1,2 MPa | 4,7 b | 6,6 b | 4,5 a | 6,7 a |
| Neon sementes | 4,8 b | 6,7 b | 4,5 a | 6,5 a |
| Neon sementes -1,0 MPa | 4,6 b | 6,2 c | 4,5 a | 6,4 a |
| Neon sementes -1,2 MPa | 4,5 b | 6,3 c | 4,4 a | 6,2 a |

| Isolado 2 | luz | | Escuro | |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 36 horas | 48 horas | 36 horas | 48 horas |
| Neon padrão | 4,9 a | 7,0 a | 4,8 a | 7,1 a |
| Neon padrão -1,0 MPa | 4,5 b | 6,3 c | 4,0 b | 6,0 b |
| Neon padrão -1,2 MPa | 4,5 b | 6,4 b | 4,2 b | 6,3 b |
| Neon sementes | 4,6 b | 6,6 b | 4,2 b | 6,4 b |
| Neon sementes -1,0 MPa | 4,4 b | 6,2 c | 4,3 b | 6,2 b |
| Neon sementes -1,2 MPa | 4,4 b | 6,1 c | 4,3 b | 6,3 b |

*Letras iguais após as médias para cada coluna, em cada um dos isolados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Peres et al. (2002), outros gêneros de fungos também podem provocar a mudança de coloração do meio; dessa forma, o meio Neon pode ser considerado um meio semi-seletivo para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja e feijão. O azul de bromofenol é um indicador ácido-básico atuando na faixa de pH de 2,8 a 4,6 (Vogel, 1960).

A troca de cor ocorre no meio Neon de azul para amarela devido à interação do indicador com íons H^+ liberados para o meio pela produção de ácido oxálico, induzindo processos de isomeria. Estes H^+ ligados ao indicador formam um isômero de cor amarelada, denotando a presença do patógeno. O ajuste do pH para 4,7 pode possibilitar maior sensibilidade ao meio Neon para detectar fungos, produzindo baixa quantidade de ácido. Para outras espécies fúngicas que não *S. sclerotiorum*, que provocam a troca de cor do substrato Neon, a incubação com fotoperíodo de 12 horas sob luz negra (comprimento de onda próximo a ultravioleta) pode ser recomendada para facilitar a identificação dessas espécies por meio de estímulo da esporulação (Peres, et al., 2002).

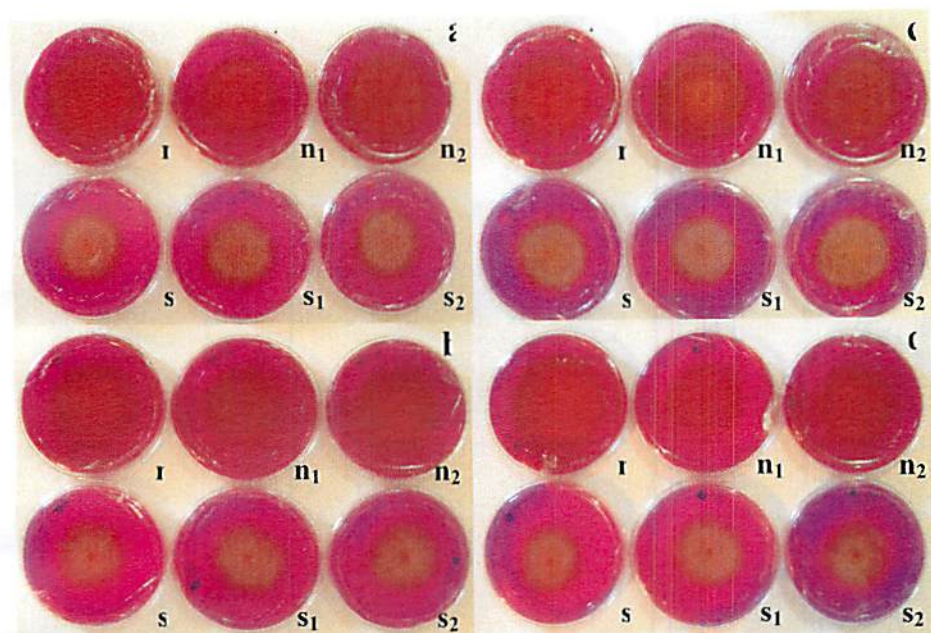


FIGURA 1 - Coloração dos meios Neon padrão (n) Neon padrão -1,0 MPa (n_1), Neon padrão -1,2 MPa (n_2), meio Neon sementes (s), Neon sementes -1,0 MPa (s_1) e Neon sementes -1,2 MPa (s_2). a) Isolado 1 em fotoperíodo de 12 horas, b) Isolado 2 em fotoperíodo de 12 horas, c) Isolado 1 no escuro e d) Isolado 2 no escuro. Após 36 horas de incubação.

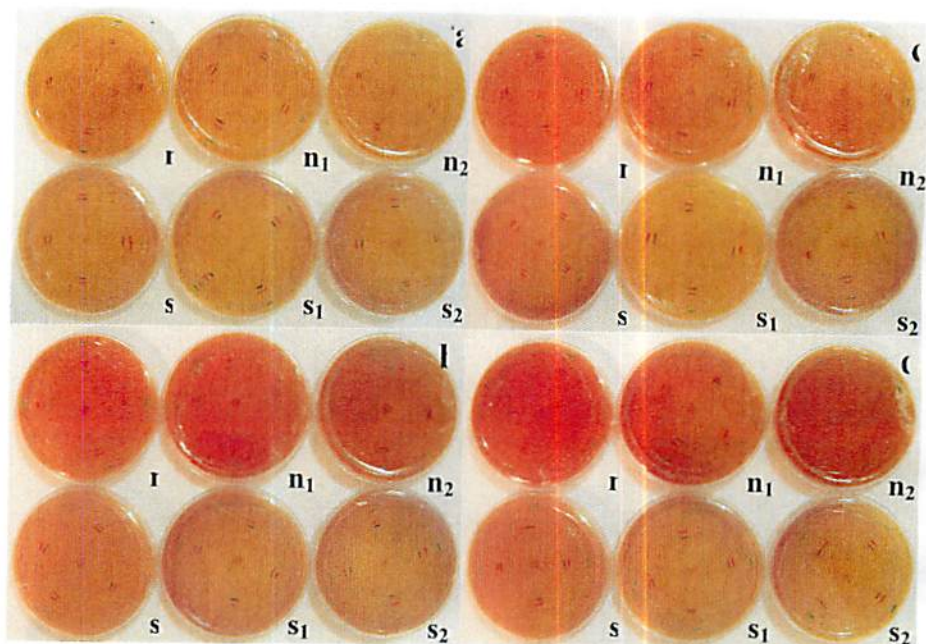


FIGURA 2 - Coloração dos meios Neon padrão (n) Neon padrão -1,0 MPa (n_1), Neon padrão -1,2 MPa (n_2), meio Neon sementes (s), Neon sementes -1,0 MPa (s_1) e Neon sementes -1,2 MPa (s_2). a) Isolado 1 em fotoperíodo de 12 horas, b) Isolado 2 em fotoperíodo de 12 horas, c) Isolado 1 no escuro e d) Isolado 2 no escuro. Após 60 horas de incubação.

6 CONCLUSÕES

A adição de manitol como restritor hídrico no substrato do meio Neon não interfere no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, e nem na mudança de coloração do meio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNDA/MA, 1992. 365p.

COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.4, n.1, p.3-49, 1976.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. **Proceedings of International Seed Testing Association**, Wagenigen, v.33, n.3, p.343-513, 1968.

MACHADO, J da C.; LANGERAK, C.J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: **ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**, 1., 1993, **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-58.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

NAPOLEÃO, R.L. **Efeito do sistema de plantio, da irrigação e do espaçamento sobre o mofo-branco do feijoeiro, causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. 2001. 72p. Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília, Brasília.

NASSER, L.C.B., ARANCIBIA, R.C., NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.309, 1999. Resumo.

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Meio semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.376, 1995. Resumo.

PERES, A.P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill):**

desenvolvimento de metodologias. 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitossanidade)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PERES, A.P.; NASSER, L.C.B.; MACHADO, J. da C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.123-127, Mar./Abr. 2002.

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

SUTTON, D.C.; DEVERALL, B.J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Oxford, v.32, n.3, p.251-261, 1983.

VOGEL, A.I. **Química analítica quantitativa**. Buenos Aires: Editorial Kapelusz, 1960.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento de novas tecnologias de pesquisa tem sido uma preocupação constante no mundo científico, tendo em vista que, dependendo do método utilizado em determinados estudos, os resultados nem sempre são confiáveis.

A evolução da Fitopatologia, a exemplo do que ocorre com outras Ciências Biológicas, tem sido marcada pela disponibilidade de novas técnicas de investigação, e a complexidade que envolve a interação patógeno e hospedeiro, em um determinado ambiente, tem feito com que alguns aspectos neste contexto ainda careçam de aperfeiçoamentos ou desenvolvimento de novas alternativas metodológicas.

Em Patologia de Sementes, que trata das implicações que decorrem da associação dos patógenos com sementes, considerando toda a cadeia de produção deste insumo, o desenvolvimento de novas metodologias de pesquisa pode ser considerado lento ou ainda pouco explorado. Algumas das dificuldades de se desenvolverem determinados estudos envolvendo, por exemplo, diagnose, controle de patógenos via tratamento de sementes, estudos das relações patógeno x sementes, entre outros, têm sido a disponibilidade de sementes infectadas por determinados patógenos em níveis e em épocas adequadas e os meios para facilitar a detecção de alguns fungos em análises sanitárias em laboratório. Estudos mais conclusivos nesses aspectos requerem um controle e conhecimento mais rigoroso da condição das sementes utilizadas nas pesquisas.

Desta forma, uma preocupação que ainda permanece junto aos pesquisadores em patologia de sementes diz respeito à disponibilização de processos artificiais de obtenção de sementes infectadas por determinados patógenos como alternativa ao uso de sementes infectadas naturalmente. É

oportuno ressaltar que a disponibilidade de sementes infectadas naturalmente depende de fatores como sazonalidade e facilidade de se encontrarem os tipos e níveis dos patógenos alvos e os potenciais de inóculo satisfatórios para determinados estudos.

Nesta Tese, tendo como um dos alvos principais explorar novas possibilidades do uso da tecnologia do pré-condicionamento de sementes em complemento aos trabalhos já conduzidos na Universidade Federal de Lavras por alguns anos, foi possível ampliar o leque de aplicabilidade desta tecnologia.

No capítulo 2, os resultados revelaram que o uso de restritores hídricos, incorporados ao substrato de papel pelo teste de incubação (“blotter test”), pode inibir ou reduzir satisfatoriamente a germinação de sementes de sorgo em substituição à técnica do congelamento. Para a quase totalidade dos fungos que se associam às sementes do sorgo, o efeito dos restritores hídricos testados foi equiparável aos efeitos da técnica do congelamento. Estes resultados fazem com que o uso da restrição hídrica possa ser adotado em testes de sanidade de sementes para a referida gramínea com vantagens já conhecidas do ponto de vista econômico e operacional. De acordo com as normas internacionais sobre validação de métodos ou testes de detecção de patógenos, a incorporação desta nova tecnologia no sistema de controle de qualidade de sementes requer como passo seguinte a condução de testes de aferição onde o julgamento da eficácia do método é feito por laboratórios já credenciados para este tipo de análise.

No capítulo 3, graças à aplicação da técnica do pré-condicionamento controlado de sementes com restritores hídricos, foi revelado que para um mesmo lote de sementes é possível separar as sementes de milho naturalmente infectadas por *Fusarium verticillioides* em diferentes classes de inóculo deste organismo, de acordo com o potencial ou densidade visual das estruturas fúngicas produzidas em um período de incubação. Por meio desta metodologia é possível obter, portanto, diferentes classes de sementes e a partir daí acompanhar

os efeitos desses níveis em condições diversas e para diferentes finalidades. Por este estudo percebe-se que é possível também recuperar sementes sadias a partir de um lote que estaria condenado do ponto de vista de altos níveis de infecção por determinados patógenos. Em se tratando de pequenos volumes de sementes, o pré-condicionamento conforme aplicado neste trabalho pode substituir com vantagens outros métodos de recuperar sementes, como é o caso da termoterapia, visando obter sementes de milho livres de fungos.

No capítulo 4, nos estudos utilizando a restrição hídrica ao meio Neon, observou-se que a restrição hídrica proporcionada por manitol pode ser utilizada em substituição ao uso de 2,4-D para testes de detecção de *S. sclerotiorum* em meio Neon.

ANEXOS

| | Página |
|-----------|--|
| ANEXO A | |
| TABELA 1A | Resumo da análise de variância dos dados de germinação de sementes e comprimento de raiz de plântulas de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica..... 117 |
| TABELA 2A | Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando incubação em papel de filtro com restrição hídrica e a testemunha-papel de filtro padrão, nas avaliações de germinação de sementes e comprimento de raiz de plântulas de sorgo (Lotes 1, 2, 3 e 4)..... 118 |
| TABELA 3A | Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica..... 119 |
| TABELA 4A | Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo <i>Colletotrichum graminicola</i> associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica..... 120 |
| TABELA 5A | Resumo da análise de variância dos dados de |

incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Drechslera turcica* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.....121

TABELA 6A Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Fusarium moniliforme* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.....122

TABELA 7A Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Phoma sorghina* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.....123

TABELA 8A Resumo da análise de variância dos dados de incidência dos fungos *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.....124

TABELA 9A Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium*

cladosporioides, Colletotrichum graminicola, Drechslera turcica, Fusarium moniliforme, Phoma sorghina, Epicoccum purpurencens e Alternaria alternata associados às sementes de sorgo (Lote 1)..... 125

TABELA 10A Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides, Colletotrichum graminicola, Drechslera turcica, Fusarium moniliforme, Phoma sorghina, Epicoccum purpurencens e Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 2)..... 126

TABELA 11A Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides, Colletotrichum graminicola, Drechslera turcica, Fusarium moniliforme, Phoma sorghina, Epicoccum purpurencens e Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 3)..... 127

TABELA 12A Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides, Colletotrichum graminicola, Drechslera turcica, Fusarium moniliforme, Phoma sorghina, Epicoccum purpurencens e Alternaria*

alternata associados às sementes de sorgo (Lote
4)..... 128

TABELA 1A - Resumo da análise de variância de dados de germinação de sementes e comprimimento de raiz de plântulas de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com resstição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L.1) | | | | Quadrado Médio (L.2) | | | | Quadrado Médio (L.3) | | | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Comprimen ⁽¹⁾ (cm) | Germinação ⁽¹⁾ (%) | Comprimen ⁽²⁾ (cm) | Germinação ⁽²⁾ (%) | Comprimen ⁽¹⁾ (cm) | Germinação ⁽¹⁾ (%) | Comprimen ⁽²⁾ (cm) | Germinação ⁽²⁾ (%) | Comprimen ⁽¹⁾ (cm) | Germinação ⁽¹⁾ (%) | Comprimen ⁽²⁾ (cm) | Germinação ⁽²⁾ (%) |
| (Tratamentos) | (12) | 25,1398572 ** | 0,013590 ** | 4,5973392 ** | 0,0487393 ** | 0,1703021 ** | 0,08824947 ** | 0,35763976 ** | 0,10578229 ** | 0,03865400 ** | 0,73410769 ** | 0,04439967 ** | 0,0002519 ns |
| Solitos | 2 | 2,2687321 ns | 0,0003390 ns | 0,20947089 ns | 0,00871696 ** | 0,00960297 ns | 0,00002519 ns | 0,13721304 ** | 0,00023172 ns | 0,00939365 ** | 0,89176011 ** | 0,001753013 ** | 0,00032553 ns |
| Potenciais híbridos | 3 | 57,6342982 ** | 0,00172727 ** | 16,45877677 ** | 0,04880979 ** | 0,46112516 ** | 0,01753013 ** | 0,89176011 ** | 0,00939365 ** | 0,00034818 ns | 0,10131051 ** | 0,00035357 | 0,00034818 ns |
| Solitos x Pot. híbridos | 6 | 10,0735054 ** | 0,00017535 ns | 0,20216978 ns | 0,00020392 ns | 0,041329203 ** | 0,00032553 ns | 0,10131051 ** | 0,00034818 ns | 0,00034818 ns | 0,10131051 ** | 0,00035357 | 0,00034818 ns |
| Erro | 39 | 69,3296755 | 0,00037763 | 0,39932869 | 0,00009723 | 0,01286398 | 0,00035357 | 0,01074354 | 0,00025615 | 0,00025615 | 0,01074354 | 0,00035357 | 0,00025615 |
| (Vt%) | | 24,40 | 35,17 | 7,57 | 10,63 | 11,47 | 17,94 | 11,08 | 15,50 | | | | |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

$$\text{Dados transformados em : } \sqrt[3]{x+0,5}, \quad (2) \quad \sqrt{\frac{x}{100}}, \quad \text{arco seno} \left(\sqrt{\frac{x}{100}} \right)$$

TABELA 2A - Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando incubação em papel de filtro com restrição hídrica e a testemunha-papel de filtro padrão, nas avaliações de germinação de sementes e comprimento de raiz de plântulas de sorgo (Lotes 1, 2, 3 e 4).

| | Lote 1 | | Lote 2 | | Lote 3 | | Lote 4 | |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | Germinação (%) ⁽¹⁾ | Comprimento (cm) ⁽²⁾ | Germinação (%) ⁽¹⁾ | Comprimento (cm) ⁽²⁾ | Germinação (%) ⁽¹⁾ | Comprimento (cm) ⁽²⁾ | Germinação (%) ⁽¹⁾ | Comprimento (cm) ⁽¹⁾ |
| Manitol -0,4 MPa | ns | ns | ns | *** | ns | *** | ns | *** |
| Manitol -0,6 MPa | ns | *** | ns | *** | *** | *** | *** | *** |
| Manitol -0,8 MPa | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Manitol -1,0 MPa | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | *** | ns | *** | *** | *** |
| NaCl -0,6 MPa | *** | *** | ns | *** | ns | *** | *** | *** |
| NaCl -0,8 MPa | *** | *** | ns | *** | *** | *** | *** | *** |
| NaCl -1,0 MPa | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Manitol + NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | *** | ns | *** | ns | *** |
| Manitol + NaCl -0,6 MPa | ns | *** | ns | *** | ns | *** | *** | *** |
| Manitol + NaCl -0,8 MPa | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Manitol + NaCl -1,0 MPa | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Testemunha | - | - | - | - | - | - | - | - |

***significativo a 5% de probabilidade

ns = não significativo

Dados transformados em: ⁽¹⁾ $\sqrt{x+0,5}$, ⁽²⁾ $\sqrt{\frac{x}{100}}$, ⁽³⁾arco seno $\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$

TABELA 3A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Cladosporium cladosporioides* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L.1) | | Quadrado Médio (L.2) | | Quadrado Médio (L.3) | | Quadrado Médio (L.4) | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|
| | | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência |
| (Tratamentos) | (13) | 1,6955632 ns | 21,596917 ns | 0,210670 ns | 0,02007400 * | 0,112980 ns | 1,14285714 ns | 32,581044 * | 276,879121 * |
| Adicionais vs Fatorial | 1 | 0,42857143 ns | 6,6670503 ns | 0,222566 ns | 0,04318675 * | 0,145833 ns | 3,44047619 ns | 45,761904 ns | 304,761905 ns |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 7,031250 ns | 98,000000 ns | 0,283996 ns | 0,02518048 ns | 0,281250 ns | 4,50000000 ns | 242,000000 ** | 2450,000000 ** |
| Solutos | 2 | 0,136875 ns | 2,0106021 ns | 0,119734 ns | 0,01393513 ns | 0,020833 ns | 0,08333333 ns | 20,583333 ns | 70,583333 ns |
| Potenciais hídricos | 3 | 0,400833 ns | 3,1193521 ns | 0,286975 ns | 0,02671417 ns | 0,041667 ns | 0,30555556 ns | 4,138889 ns | 110,444444 ns |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 2,184375 ns | 27,1189354 ns | 0,188626 ns | 0,01409701 ns | 0,145833 ns | 0,97222222 ns | 13,701389 ns | 62,027778 ns |
| Erro | 42 | 2,1642262 | 27,515873 | 0,116011 | 0,010002058 | 0,114583 | 1,19047619 | 16,083333 | 121,666667 |
| CV(%) | | 45,64 | 43,15 | 28,88 | 62,72 | 180,53 | 169,7250 | 19,64 | 17,29 |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

Dados transformados em: $\sqrt[1]{x+0,5}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 4A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Colletotrichum graminicola* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L1) | | Quadrado Médio (L2) | | Quadrado Médio (L3) | | Quadrado Médio (L4) | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------|----------------------|---------------|---------------------|---------------|----------------------|---------------|
| | | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência |
| (Tratamentos) | (13) | 17,230384 ns | 105,891173 ns | 0,043484 ns | 2,76923077 ns | 1,552197 ns | 12,8846154 ns | 0,229372 ns | 17,2582418 ns |
| Adicionais vs Fatorial | 1 | 58,333333 * | 272,6282012 ns | 0,034983 ns | 0,000000 ns | 0,090029 ns | 0,5833333 ns | 0,028948 ns | 6,8571429 ns |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 36,125000 ns | 60,5000000 ns | 0,058168 ns | 8,0000000 ns | 1,531250 ns | 8,0000000 ns | 0,165755 ns | 0,5000000 ns |
| Solutos | 2 | 5,623333 ns | 0,6206021 ns | 0,097319 ns | 4,7500000 ns | 0,145833 ns | 1,5833333 ns | 0,166534 ns | 12,2500000 ns |
| Potenciais hídricos | 3 | 6,971666 ns | 51,0835806 ns | 0,054647 ns | 2,88888889 ns | 2,241319 ns | 15,4166667 ns | 0,217684 ns | 13,0000000 ns |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 16,229166 ns | 148,1608493 ns | 0,018928 ns | 1,63888889 ns | 1,923611 ns | 18,2500000 ns | 0,300169 * | 25,5833333 ns |
| Erro | 42 | 9,990119 | 78,007937 | 0,109264 | 6,7619048 | 1,139880 | 13,1666667 | 0,123187 | 14,7380952 |
| CV(%) | | 20,39 | 17,37 | 29,59 | 86,67 | 58,05 | 58,05 | 18,15 | 39,96 |

120

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

Dados transformados em: $\sqrt[1]{x+0,5}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 5A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Drechslera turcica* associado às sementes de sorgo (Lote 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (1.1) | | | Quadrado Médio (1.2) | | | Quadrado Médio (1.3) | | | Quadrado Médio (1.4) | | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|----------------|--------------|----------------------|--------------|----------------|----------------------|---------------|-------|----------------------|--|--|
| | | ASCIF (n) | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | | |
| (Tratamentos) | (13) | 0,006301 ns | 93,565934 ns | 12,737637 ns | 29,6483516 ns | 27,698145 ns | 97,802198 ns | 8,210164 ns | 19,4945055 ns | | | | |
| Adensação vs Fatorial | | 0,000993 ns | 33,4403762 ns | 9,165710 ns | 0,0119048 ns | 51,857152 ns | 165,7619048 ns | 1,935367 ns | 2,6765714 ns | | | | |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 0,001990 ns | 8,0000000 ns | 75,031250 ** | 112,5000000 * | 0,281250 ns | 32,0000000 ns | 9,031250 ns | 24,5000000 ns | | | | |
| Solutovs | 2 | 0,019613 ** | 261,0833333 ** | 19,171875 ns | 83,0833333 * | 3,703125 ns | 16,0833333 ns | 18,703125 ns | 33,2500000 ns | | | | |
| Potenciais hídricos | 3 | 0,003345 ns | 41,4166667 ns | 4,171875 ns | 10,0833333 ns | 19,743055 ns | 58,7777778 ns | 15,116319 ns | 40,9722222 ns | | | | |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 0,004446 ns | 88,0833333 ns | 5,088541 ns | 12,7500000 ns | 40,217014 ns | 144,1944444 ns | 2,168402 ns | 6,1388889 ns | | | | |
| Erro | 42 | 0,003645 | 49,795714 | 6,883928 | 16,283714 | 27,078669 | 94,190476 | 6,574404 | 14,8571429 | | | | |
| CV(%) | | 20,92 | 31,91 | 51,73 | 43,79 | 54,31 | 43,54 | 36,36 | 49,50 | | | | |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

Dados transformados em: $\arcsen\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Fusarium moniliforme* associado às sementes de sorgo (Lotes 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L.1) | | Quadrado Médio (L.2) | | Quadrado Médio (L.3) | | Quadrado Médio (L.4) | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------|
| | | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência |
| (Tratamentos) | (13) | 9,962582 ns | 35,6483516 ns | 0,543545 ns | 42,4615385 ns | 20,997252 ns | 54,4230769 ** | 0,177761 ns | 7,8021978 ns |
| Adicionais vs Fatorial | 1 | 61,800029 * | 207,4285714 * | 0,792163 ns | 168,5833333 * | 28,292410 ns | 131,2500000 * | 0,000020 ns | 0,42857143 ns |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 1,531250 ns | 2,0000000 ns | 1,152349 ns | 112,5000000 ns | 124,031250 ** | 338,0000000 ** | 0,366673 ns | 18,0000000 ns |
| Solutos | 2 | 13,325833 ns | 31,0000000 ns | 0,640989 ns | 22,5833333 ns | 1,734375 ns | 10,7500000 ns | 0,278953 ns | 6,7500000 ns |
| Potenciais hídricos | 3 | 2,970208 ns | 19,3333333 ns | 0,502770 ns | 16,9722222 ns | 12,519097 ns | 23,6388889 ns | 0,149784 ns | 6,3333333 ns |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 5,103333 ns | 22,3333333 ns | 0,388547 ns | 29,1388889 ns | 13,269097 ns | 24,3055556 ns | 0,156158 ns | 8,41666667 ns |
| Erro | 42 | 12,510952 | 39,380952 ns | 0,518565 | 40,380952 | 13,636904 | 18,309524 | 0,433215 | 14,4761905 |
| CV(%) | | 56,69 | 58,18 | 24,24 | 45,39 | 56,19 | 48,90 | 40,62 | 72,96 |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

Dados transformados em: $(1)\sqrt{x+0,5}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 7A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo *Phoma sorghina* associado às sementes de sorgo (Lotes 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L1) | | Quadrado Médio (L2) | | Quadrado Médio (L3) | | Quadrado Médio (L4) | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------|---------------------|---------------|---------------------|----------------|---------------------|---------------|
| | | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência |
| (Tratamentos) | (13) | 9,309780 ns | 67,6842249 ns | 27,335164 ns | 169,142857 ns | 17,571772 ns | 117,516484 ns | 1,309409 ns | 6,57142857 ns |
| Adicionais vs Fatorial | 1 | 4,809642 ns | 11,1945503 ns | 1,190476 ns | 25,190476 ns | 5,375744 ns | 26,2976190 ns | 0,761904 ns | 2,01190476 ns |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 21,125000 ns | 18,0000000 ns | 1,125000 ns | 32,000000 ns | 12,500000 ns | 40,5000000 ns | 0,031250 ns | 0,50000000 ns |
| Solutos | 2 | 4,808125 ns | 7,6206021 ns | 34,411458 ns | 431,083333 ns | 4,473958 ns | 81,0833333 ns | 1,442708 ns | 6,58333333 ns |
| Potenciais hídricos | 3 | 10,542500 ns | 71,1051854 ns | 5,347222 ns | 17,000000 ns | 29,546875 ns | 176,3055556 ns | 0,909722 ns | 3,63000000 ns |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 8,974791 ns | 103,6906021 ns | 44,696180 ns | 204,750000 ns | 18,828125 ns | 128,3055556 ns | 1,760097 ns | 9,80555556 ns |
| Erro | 42 | 8,472738 | 72,730159 | 41,369048 | 226,28571 | 34,477679 | 158,238095 | 1,349702 | 11,4285714 |
| CV(%) | | 39,97 | 33,98341 | 31,98 | 27,78353 | 35,33 | 30,36376 | 72,69 | 64,83375 |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 8A - Resumo da análise de variância dos dados de incidência dos fungos *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lotes 1, 2, 3 e 4) submetidas à análise sanitária pelos métodos de incubação em papel de filtro padrão (testemunha), papel de filtro com congelamento e papel de filtro com restrição hídrica.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio (L1) | | Quadrado Médio (L2) | | Quadrado Médio (L3) | | Quadrado Médio (L4) | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------|
| | | <i>Epicoccum</i> | <i>Alternaria</i> | <i>Epicoccum</i> | <i>Alternaria</i> ⁽¹⁾ | <i>Epicoccum</i> | <i>Alternaria</i> ⁽¹⁾ | <i>Epicoccum</i> | <i>Alternaria</i> |
| (Tratamentos) | (13) | 86,253456 ** | 19,8317709 ** | 32,7087912 ns | 0,27194145 ns | 38,9010989 ns | 2,14276072 ** | 113,978022 ns | 22,8406593 ns |
| Adicionais vs Fatorial | 1 | 477,7870503 ** | 146,6783714 ** | 61,7142857 ns | 0,22035079 ns | 55,0476190 ns | 9,40748855 ** | 119,0476190 ns | 82,01190476 ns |
| Testemunha vs Congelamento | 1 | 112,5000000 ns | 0,0000000 ns | 12,5000000 ns | 0,25124043 ns | 50,0000000 ns | 8,98584139 ** | 200,0000000 ns | 18,0000000 ns |
| Solutos | 2 | 10,9568521 ns | 14,7805563 ns | 110,2500000 ns | 0,59464411 ns | 15,0833333 ns | 0,65566791 ns | 44,3333333 ns | 16,3333333 ns |
| Potenciais hídricos | 3 | 54,7499076 ns | 16,6249389 ns | 8,5555556 ns | 0,28119714 ns | 35,3333333 ns | 1,21807680 ns | 176,2222222 ns | 31,41666667 ns |
| Solutos x Potenciais hídricos | 6 | 57,4740743 ns | 5,2830868 ns | 17,4722222 ns | 0,17179466 ns | 44,0833333 ns | 0,74949887 ns | 90,8888889 ns | 11,66666667 ns |
| Erro | 42 | 33,015873 | 6,1984131 | 75,547619 | 0,36228368 | 73,095238 | 0,57148200 | 114,380952 | 23,5000000 |
| CV(%) | | 38,06 | 70,41 | 58,64 | 35,47 | 60,75 | 33,32 | 17,13 | 48,30 |

*teste F significativo a 5% de probabilidade

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

Dados transformados em: $\sqrt[1]{x+1}$

TABELA 9A - Teste de Dunnet, (P < 0,05) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma sorghina*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 1).

| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | | <i>Cladosporium graminicola</i> | | <i>Drechslera turcica</i> | | <i>Fusarium moniliforme</i> | | <i>Phoma sorghina</i> | | <i>Epicoccum purpurencens</i> | | <i>Alternaria alternata</i> | |
|--------------------------|-------------------------------------|------------|---------------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência |
| Maniitol -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Maniitol -0,6 MPa | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** |
| Maniitol -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** |
| Maniitol -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Maniitol + NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Maniitol + NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Maniitol + NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Maniitol + NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** |
| Congelamento | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Testemunha | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

***significativo a 5% de probabilidade

ns = não significativo

(1) $\left(\sqrt{\frac{y}{100}} \right)$
 Dados transformados em: arco seno

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 10A - Teste de Dunnet (P < 0,05) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma sorghina*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 2).

| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | | <i>Drechslera turcica</i> | | <i>Fusarium moniliforme</i> | | <i>Phoma sorghina</i> | | <i>Epicoccum purpurencens</i> | <i>Alternaria alternata</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | Incidência | Incidência ⁽²⁾ |
| Manitol -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -0,8 MPa | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,6 MPa | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Congelamento | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Testemunha | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

***significativo a 5% de probabilidade

ns = não significativo

Dados transformados em: ⁽¹⁾ $\sqrt{x+0,5}$, ⁽²⁾ $\sqrt{x+1}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 11A - Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma sorghina*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 3).

| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | | <i>Drechslera turcica</i> | | <i>Fusarium moniliforme</i> | | <i>Phoma sorghina</i> | | <i>Epicoccum purpurencens</i> | <i>Alternaria alternata</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF | Incidência | Incidência | Incidência ⁽¹⁾ |
| Manitol -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | *** | ns | ns | ns | *** |
| NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol + NaCl -0,4 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol + NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol + NaCl -0,8 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | *** |
| Manitol + NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** |
| Congelamento | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Testemunha | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | *** | ns | ns | ns | *** |

***significativo a 5% de probabilidade

ns = não significativo

Dados transformados em: $\frac{(1)}{\sqrt{x+1}}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

TABELA 12A - Teste de Dunnet ($P < 0,05$) para o contraste entre médias dos tratamentos utilizando os métodos de incubação em papel de filtro com restrição hídrica, papel de filtro padrão (testemunha) e a testemunha-papel de filtro com congelamento, nas avaliações de incidência e área superficial das sementes coberta pelo inóculo dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Drechslera turcica*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma sorghina*, *Epicoccum purpurencens* e *Alternaria alternata* associados às sementes de sorgo (Lote 4).

| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | | <i>Drechslera turcica</i> | | <i>Fusarium moniliforme</i> | | <i>Phoma sorghina</i> | | <i>Epicoccum purpurencens</i> | <i>Alternaria alternata</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | ASCIF ⁽¹⁾ | Incidência | ASCIF | Incidência | Incidência | Incidência |
| Manitol -0,4 MPa | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -0,6 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -0,8 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol -1,0 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,4 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,6 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -0,8 MPa | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,4 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,6 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -0,8 MPa | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Manitol + NaCl -1,0 MPa | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Congelamento | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Testemunha | *** | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

***significativo a 5% de probabilidade

ns = não significativo

Dados transformados em: $\sqrt[1]{x+0,5}$

ASCIF = área superficial das sementes coberta pelo inóculo do fungo

| | | |
|-----------|---|-----|
| TABELA 1B | Resumo da análise de variância dos dados do diâmetro médio do halo amarelado, oriundo da mudança de coloração do meio Neon, devido ao crescimento micelial do fungo <i>S. sclerotiorum</i> , isolado 1, em dois ambientes de incubação e em dois períodos de tempo..... | 130 |
| TABELA 2B | Resumo da análise de variância dos dados do diâmetro médio do halo amarelado, oriundo da mudança de coloração do meio Neon, devido ao crescimento micelial do fungo <i>S. sclerotiorum</i> , isolado 2, em dois ambientes de incubação e em dois períodos de tempo..... | 131 |

TABELA 1B - Resumo da análise de variância dos dados do diâmetro médio do halo amarelado, oriundo da mudança de coloração do meio Neon, devido ao crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum*, isolado I, em dois ambientes de incubação e em dois períodos de tempo.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio | | Quadrado Médio | | Quadrado Médio | |
|-------------|--------------------|----------------|------------|------------------------|------------------------|----------------|--|
| | | C36h | C48h | E36h | E48h | | |
| Tratamentos | 5 | 0,306854** | 0,780167** | 0,148854 ^{ns} | 0,321937 ^{ns} | | |
| Erro | 18 | 0,029757 | 0,049097 | 0,099896 | 0,122188 | | |
| CV(%) | | 3,65 | 3,34 | 6,92 | 5,32 | | |

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

C = Fotoperíodo 12 horas

E = Escuro contínuo

TABELA 2B - Resumo da análise de variância dos dados do diâmetro médio do halo amarelado, oriundo da mudança de coloração do meio Neon, devido ao crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum*, isolado 2, em dois ambientes de incubação e em dois períodos de tempo.

| FV | Graus de liberdade | Quadrado Médio C36 h | Quadrado Médio C48 h | Quadrado Médio E36 h | Quadrado Médio E48 h |
|-------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Tratamentos | 5 | 0,112937** | 0,476167** | 0,285687** | 0,559417** |
| Eito | 18 | 0,024549 | 0,018264 | 0,041007 | 0,045903 |
| CV(%) | | 3,45 | 2,10 | 4,70 | 3,34 |

**teste F significativo a 1% de probabilidade

ns = teste F não significativo a 5% de probabilidade

C = Fotoperíodo 12 horas

E = Escuro contínuo