



FABIANA DOMINGOS BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E TRANSMISSÃO DE
ISOLADOS DE *Bipolaris* EM SEMENTES DE *Brachiaria*
brizantha cv. Marandu**

**LAVRAS - MG
2019**

FABIANA DOMINGOS BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E TRANSMISSÃO DE ISOLADOS DE *Bipolaris* EM
SEMENTES DE *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título Mestre.

Prof. PhD. José da Cruz Machado
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Barros, Fabiana Domingos.

Avaliação dos efeitos e transmissão de isolados de *Bipolaris* em
sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu / Fabiana Domingos
Barros. - 2019.

43 p. : il.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Coorientador(a): Carolina da Silva Siqueira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Patologia de sementes. 2. Potencial de inóculo. 3. Transmissão.
I. Machado, José da Cruz. II. Siqueira, Carolina da Silva. III. Título.

FABIANA DOMINGOS BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E TRANSMISSÃO DE ISOLADOS DE *Bipolaris* EM
SEMENTES DE *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

**EVALUATION OF EFFECTS AND TRANSMISSION OF *Bipolaris* ISOLATES IN
SEEDS OF *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título Mestre.

APROVADA em 29 de Outubro de 2019.

Dra. Maria Luiza Nunes Costa
Dr. Renato Mendes Guimarães

UFMS
UFLA

Prof. PhD. José da Cruz Machado
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

*Aos meus pais, Maria Madalena e Trajano
e toda a minha família, com todo carinho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa conquista, por me iluminar e dar forças durante essa jornada.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao professor PhD Dr. José da Cruz Machado, pela orientação, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

À Dr^a Carolina da Silva Siqueira, pela atenção, pelos ensinamentos, colaboração nos trabalhos pelas valiosas sugestões.

À Dr^a Iara Eleutéria Dias, pelos ensinamentos, colaboração nos trabalhos, pela atenção e sugestões.

À Dr^a Maria Luiza Nunes Costa, pelos ensinamentos, pela atenção e valiosas sugestões.

À Marina, pelos ensinamentos, paciência e colaboração na execução do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: Ângela, Manoel, Sueny, Any e aos estagiários do laboratório, pela amizade, colaboração nos trabalhos e pela convivência.

À minha amiga Sandra pelo apoio na execução do trabalho, incentivo, compreensão, ensinamentos, paciência e conselhos nos momentos em que me encontrava em grandes dificuldades a beira de desistir da caminhada.

Ao meu amigo Huarlen pela amizade, ensinamentos, conselhos, pela ajuda no trabalho.

À minhas amigas da graduação Maria, Françoise e Ana Flávia que me apoiaram e ajudaram desde o início dessa trajetória.

À minha amiga Layza pelo apoio, paciência, incentivo e ajuda na execução do trabalho.

Às minhas amigas Ângela, Fiorita, Nathália, Melina e Sílvia pela amizade, companheirismo e pela agradável convivência.

À minha mãe, Maria Madalena, meu pai Trajano e meu irmão Wagner, por todo amor, incentivo e compreensão no período de realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente Adriana, Angélica e Helenice, pelo carinho e amizade.

A todos os colegas de pós-graduação com os quais eu convivi durante estes anos, principalmente àqueles que, de certa forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O Brasil ocupa a posição de maior produtor, consumidor e exportador de sementes forrageiras no mundo, porém encontra dificuldades na comercialização deste insumo com outros países devido às barreiras fitossanitárias. De acordo com a literatura há poucas informações sobre a qualidade sanitária de sementes forrageiras produzidas e comercializadas no Brasil. Portanto, o objetivo neste trabalho foi avaliar os efeitos e transmissão de dois isolados de *Bipolaris*, que representam a população mais frequente deste gênero em lotes de sementes que têm sido comercializados no Brasil. Foram avaliados efeitos destes isolados na germinação e vigor das sementes de *B. brizantha* cv. Marandu e a sua transmissão de sementes a plantas sob condições controladas. Os dois isolados de *Bipolaris*, LAPS808 e LAPS809, procedentes de regiões distintas no Brasil foram caracterizados em paralelo por meio de análises morfológicas e moleculares com a finalidade de confirmação de sua identidade e patogenicidade em sementes de *B. brizantha* em diferentes níveis de potencial de inóculo. Pelas avaliações realizadas observou-se diferenças significativas de comportamento entre os dois isolados, sendo a temperatura, a condutividade elétrica e nível de potencial de inóculo dos fungos fatores que influenciaram no desempenho das sementes infectadas pelos isolados em foco. Foram avaliadas as variáveis, vigor (IVE), peso de plantas, taxa de germinação e incidência dos fungos. Por este estudo foi possível verificar diferenças de agressividade entre os dois isolados e concluir que se enquadram na espécie *Bipolaris gossypina*. Ambos isolados são transmitidos de sementes a plantas em variáveis taxas e causam danos crescentes e proporcionais aos aumentos dos níveis de potencial de inóculo inicial nas sementes.

Palavras-chave: Patologia de sementes; potencial de inóculo; transmissão.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer, consumer and exporter country of forage seeds in the world, but faces difficulties in the international market due to phytosanitary barriers. According to the literature there is little information on the sanitary quality of forage seeds produced and offered to farmers in Brazil. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects and transmission of two isolate of *Bipolaris*, which represent the most frequent population of this genus in seed lots which have been commercialized in Brasil. Effects of these isolates on germination and vigor of *B. brizantha* cv. Marandu and its seed transmission to plants were evaluated under controlled conditions. The two selected isolates of *Bipolaris*, LAPS808 and LAPS809, collected in different regions in Brazil were also characterized in parallel by morphological and molecular analysis with the purpose of determining their identities and pathogenicity in *B. brizantha* seeds at different levels of inoculum potential. The evaluations showed significant differences in behavior between the two isolates, being the temperature, electrical conductivity and fungal inoculum potential factors that influenced the performance of seeds infected by the isolates in focus. The germination rate, vigor (emergence speed index and electrical conductivity), plant weight were reduced at variable levels by the pathogens. The effects were proportional to the amount of initial inoculum of both isolates in seeds. Both isolates are seed transmitted at variable rates according to the inoculum potential in both cases. By this study it was possible to detect differences in aggressiveness between the two isolates and to verify that they are members of the species *Bipolaris gossypina*. Both isolates are transmitted from seed to plants at variable rates and cause increasing damage and proportional to increases in seed initial seed potential levels.

Keywords: Seed Pathology; inoculum potential; transmission.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Qualidade de sementes de forrageiras.....	10
2.2 Fitopatógenos fúngicos associados às sementes de forrageiras	11
2.3 Características morfológicas e moleculares das espécies de <i>Bipolaris</i> associados às sementes e sua detecção nesta interação.....	13
2.4 Estudos sobre os efeitos e transmissão de patógenos em sementes de forrageiras	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção de isolados de <i>Bipolaris</i> sp. e perfil das sementes de <i>Brachiaria brizantha</i>	15
3.2 Instalação e condução dos ensaios visando à avaliação de efeitos e transmissão dos isolados de <i>Bipolaris</i> em sementes de <i>B. brizantha</i>	17
3.2.1 Obtenção de sementes infectadas pelos isolados fúngicos em estudo	17
3.2.2 Teste de germinação.....	17
3.2.3 Teste de sanidade.....	17
3.2.4 Teste de condutividade elétrica.....	18
3.2.5 Teste de emergência em substrato sólido (composto orgânico e areia)	18
3.2.6 Índice de dano.....	19
3.2.7 Avaliação da transmissão dos isolados de <i>Bipolaris</i> por sementes de <i>B. brizantha</i>	19
3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXO A – Caracterização morfológica dos isolados de <i>Bipolaris</i> utilizados neste trabalho	37
ANEXO B – Caracterização molecular e confirmação genética da identidade dos isolados de <i>Bipolaris</i> utilizados neste estudo.....	39
ANEXO C – Teste de patogenicidade.....	43

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de sementes forrageiras tropicais, sendo considerado, também, maior consumidor e exportador de sementes de gramíneas forrageiras (FERREIRA, 2016).

A área ocupada pelas pastagens plantadas no Brasil é da ordem de 111 milhões de hectares (IBGE, 2018). Esses cultivos são destinados à produção de sementes para comercialização, alimentação animal, recuperação de áreas degradadas, consórcio com outras culturas, como na Integração-Lavoura-Pecuária (ILP) e Integração-Lavoura-Pecuária-Floresta (ILPF), bem como palhada para o plantio direto de outras espécies.

As gramíneas do gênero *Brachiaria*, originárias do continente africano, são amplamente cultivadas em grande parte do território brasileiro, principalmente devido às condições edafoclimáticas favoráveis. Dentre as espécies mais plantadas do gênero *Brachiaria* destacam-se *B. brizantha* cv. Marandu, que ocupam aproximadamente 50 milhões de hectares (JANK et al., 2014).

O sistema de colheita das sementes de gramíneas forrageiras no Brasil é realizado por meio de varredura do solo, o que tem comprometido negativamente a qualidade dos lotes de sementes. Isso se dá, principalmente, devido ao grande volume de impurezas associadas às sementes no momento da colheita, como: palha, torrões, sementes de plantas daninhas e agentes fitopatogênicos. A associação de fitopatógenos com essas sementes pode influenciar na qualidade fisiológica e sanitária das mesmas, na transmissão de doenças para futuras plantas e conseqüentemente na disseminação de doenças a novas áreas.

A exemplo do que ocorre com a maioria das espécies agrícolas, o cultivo de forrageiras é dependente de sementes cujo padrão de qualidade é estabelecido por critérios técnicos sob a coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os parâmetros de qualidade são avaliados em laboratórios com base nas Regras para Análise de Sementes, fundamentadas em padrões internacionais.

A área de conhecimento sobre sanidade de sementes forrageiras é pouco investigada, principalmente com relação à identificação das espécies de fungos que mais afetam essas culturas. A escassez de informações pode dificultar tomada de decisões em relação a diversos aspectos, como tratamento de sementes adequado e manejo ideal da cultura, e conseqüentemente acarretando perdas na produção e comercialização para o mercado interno e externo. Vale destacar que, as legislações fitossanitárias vigentes em alguns países importadores de sementes de gramíneas forrageiras do Brasil constituem um empecilho para a

comercialização deste insumo, visto que a presença de alguns fungos patogênicos nestas estruturas pode ocasionar rejeição dos lotes afetados (VECHIATO; APARECIDO, 2008).

Por meio de análises sanitárias de sementes realizadas ao longo dos últimos anos na Universidade Federal de Lavras, foi possível observar que existe uma grande diversidade de fungos associados às gramíneas forrageiras, havendo predominância de fungos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Drechslera*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum*, *Phoma*, e *Colletotrichum*.

A ocorrência desses fungos nas sementes ou nas plantas podem influenciar a formação das pastagens e conseqüentemente afetar o sistema de produção animal, além de constituir se fonte de inóculo para outras culturas. Dessa forma, estudos aprofundados sobre a interação destes fungos com sementes de forrageiras hospedeiras tornam-se uma grande necessidade nas condições brasileiras. Com base em análises anteriores, a sanidade de sementes de *Brachiaria* realizadas no Brasil tem chamado atenção a crescente frequência de espécies de *Bipolaris*, em sementes desta gramínea ressaltando-se que estes fungos são normalmente causadores de manchas foliares em plantas hospedeiras.

Neste trabalho o objetivo foi avaliar o grau de interação biológica de dois isolados representativos de *Bipolaris*, que ocorrem com maior frequência em lotes de sementes de *B.brizantha* cv. Marandu e a sua transmissão a partir de sementes infectadas a progênie correspondente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade de sementes de forrageiras

A qualidade das sementes é expressa com base em atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, os quais indicam a capacidade da semente gerar plântulas com maiores chance de superar as condições edafoclimáticas adversas, tornarem-se plantas adultas, e estabelecimento adequado e uniforme da lavoura (FRANÇA NETO et al., 2010).

Os padrões mínimos de qualidade e normas para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical no Brasil foram estabelecidos oficialmente pela criação da Lei nº 10.711 de 2003 e Instrução Normativa nº 30 de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003; 2008).

De acordo com a literatura há poucas informações sobre a qualidade sanitária de sementes forrageiras produzidas e comercializadas no Brasil, o que provavelmente contribui para o aumento da incidência de doenças em áreas de pastagens (VECHIATO, 2004). A associação de patógenos com sementes representa um risco significativo no estabelecimento de estande, no desenvolvimento das plantas, na produção de sementes, na persistência das forrageiras no campo e, conseqüentemente, na produção de leite e carne. Além disso, a presença de patógenos nas sementes constitui entraves para a sua exportação (FERNANDES, 2004, 2005).

Entre os principais fungos já detectados em lotes de sementes de forrageiras estão espécies de *Drechslera*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Phoma*, *Rhizoctonia* e *Colletotrichum gloeosporioides* (MARCHI et al., 2006). A presença desses patógenos nas sementes de forrageiras não somente reduz a produtividade, como também, à qualidade da forragem.

Sobre qualidade sanitária de sementes de forrageiras no Brasil observa-se, portanto, que inúmeros aspectos que podem comprometer a produção de sementes de alta qualidade, são ainda pouco esclarecidos (MALLMANN et al., 2013).

2.2 Fitopatógenos fúngicos associados às sementes de forrageiras

As sementes, além de sofrerem diretamente com o processo infeccioso dos patógenos, exercem um papel importante na disseminação de patógenos de plantas forrageiras, constituindo um mecanismo eficiente de introdução de inóculo nas regiões do Brasil que são produtoras de forragens (MALLMANN et al., 2013).

De acordo com a literatura, dentre os principais fitopatógenos que podem ser encontrados em sementes de forrageiras destacam-se os gêneros: *Claviceps* sp., *Sphacelia* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. (VECHIATO et al, 2008; VECHIATO, 2004; FERNANDES et al., 2005; MARCHI et al., 2006).

Em sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam), Lucca Filho (1999) detectou grande número de fungos reduzindo o número de plantas por área, dentre eles: *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera oryzae* e *Pyricularia grisea*. Alguns desses organismos como *Phoma* sp e *Fusarium* sp. são potencialmente patogênicos,

interferem na germinação das sementes e conseqüentemente podem promover a morte de plantas (MENTEN, 1995; MALLMANN et al., 2013).

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

Em trabalho realizado por Mallmann et al. (2013), a análise sanitária indicou elevada incidência de fungos em sementes de *Brachiaria* sp. e *Panicum maximum*, com predominância de *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. Estes constituem os fungos mais comuns nos campos de produção de sementes de forrageiras nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Importante salientar que a omissão dos nomes das espécies dos fungos detectados em análises sanitárias nestes trabalhos constitui um sério entrave para um melhor entendimento das reais relações destes organismos com sementes dos hospedeiros estudados.

Registros da ocorrência de fungos causadores de manchas foliares em *B. brizantha* cv. Marandu, atribuídos a *Drechslera incurvata* tem sido relatados no estado de Minas Gerais assim como de *Pyricularia grisea* e *Pythium perillum* associado à *Rhizoctonia solani* como causadores de morte de *B. brizantha* cv. Marandu no estado do Pará (NERY et al., 2012; VERZIGNASSI et al., 2012).

A presença de alguns fungos potencialmente patogênicos associados às sementes de gramíneas forrageiras como *Pyricularia grisea*, *Claviceps* sp. e *Phoma medicaginis* dentre outros representa barreiras fitossanitárias para os principais países importadores de sementes forrageiras do Brasil (MARCHI et al., 2010a; VECHIATO; APARECIDO, 2008).

De maneira geral, os altos níveis de incidência de fungos em sementes de espécies forrageiras são reconhecidos como causas importantes da perda de viabilidade das sementes deste grupo de planta (NEERGAARD, 1979). Diante da escassez de estudos mais pormenorizados sobre as relações de patógenos com sementes de espécies forrageiras, conclui-se que maior atenção deve ser dedicada em novos estudos levando-se em consideração abordagens e metodologias específicas preconizadas no escopo da Patologia de

Sementes. O problema torna-se ainda mais crítico em relação às sementes de forrageiras tropicais (VECHIATO, 2004).

2.3 Características morfológicas e moleculares das espécies de *Bipolaris* associados às sementes e sua detecção nesta interação

As espécies do gênero *Bipolaris* foram primeiramente descritas no gênero *Helminthosporium*, havendo posteriormente mudanças na nomenclatura principalmente em função de caracteres morfológicos relacionados aos conídios e polos de germinação (ALCORN 1988). Posteriormente, após inúmeros estudos taxonômicos do gênero, *Helminthosporium* foi então desmembrado em outros gêneros, conhecidos como: *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum* (SIVANESAN, 1987).

De acordo com alguns estudos o gênero *Bipolaris* é composto por aproximadamente 40 espécies já identificadas (MARIN-FELIX et al. 2017). Dentre as espécies referenciadas nas condições brasileiras, a espécie *B. sorokiniana* tem sido a mais comum principalmente por se tratar de uma região de clima tropical (PRATES et al., 2001) . Esta espécie tem como características morfológicas conidióforos septados, normalmente retos a flexuosos, pálidos a marrom escuros, além disso, apresentam septação ao longo do conidióforo, com apenas uma cicatriz de ligação (acropleurógena). Quanto aos conídios, esses apresentam coloração marrom-oliva-escuro, possui formas curvadas, fusiformes ou elipsoides, com ápices arredondados e a germinação ocorre nos polos dos conídios (ELLIS, 1971; SIVANESAN, 1985, 1987).

A identificação e a classificação das espécies de *Bipolaris* até a década de 90 eram feitas com base nas características morfológicas (SIVANESAN, 1987). Com advento da biologia molecular Berbee et al. (1999) realizaram estudos por meio de análise filogenética de 32 espécies de *Bipolaris* através da combinação das regiões gênicas ITS e GPDH para elucidar as características semelhantes compartilhada entre as espécies. Embora a identificação taxonômica por meio da caracterização molecular apresente resultados confiáveis, é importante ressaltar que a combinação das técnicas moleculares com a caracterização morfológica garante informações mais precisas.

Sobre a diagnose de espécies de *Bipolaris* em sementes de forrageiras em geral são seguidos métodos aplicados para outras espécies de natureza necrotrófica. De forma análoga ao que se aplica para fungos de outros grupos de sementes de espécies cultivadas, os testes para detecção de fungos em sementes de forrageiras tropicais devem ser simples, rápidos,

econômicos, apresentar repetibilidade dentro e entre as amostras, e ser sensível o suficiente para detectar traços do patógeno na amostra analisada (NEERGAARD, 1979a; TAYLOR et al., 2001b; BLAKEMORE; REEVES, 2002). Os atuais testes de sanidade de sementes são baseados nos métodos descritos pela International Seed Testing Association (ISTA) (TAYLOR et al., 2001b; BLAKEMORE; REEVES, 2002).

A escolha do método para a detecção de espécies de *Bipolaris* em sementes do gênero *Brachiaria* segue os protocolos recomendados para outras espécies de gramíneas conforme descrição no Manual para Análise Sanitária de Sementes no Brasil e em outros países (ISTA, 1976; BRASIL, 2009b). Os principais testes utilizados de acordo com o Manual para Análise Sanitária de Sementes (2009b) são: método de incubação em substrato de papel (“blotter test”) ou meio sólido agarizado, exame de embrião, exame de suspensão de lavagem das sementes.

2.4 Estudos sobre os efeitos e transmissão de patógenos em sementes de forrageiras

A transmissão de patógenos por sementes de plantas hospedeiras pode ser entendida como a transferência do patógeno presente na semente para as plantas que serão originadas em circunstâncias favoráveis para este processo e, por outro lado, como sendo o acesso do patógeno presente nos tecidos de uma planta contaminada ou infectada às sementes que serão produzidas no ciclo biológico correspondente. A transmissão só ocorrerá se de fato houver interação do patógeno com a planta (NEERGAARD, 1979).

De acordo com a literatura, a transmissão de espécies de *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. por sementes de algumas espécies forrageiras, como *Brachiaria brizantha* cv. Piatã tem sido observada nas condições brasileiras (SBALCHEIRO et al., 2015; SANTOS et al., 2014). Porém a quantificação deste processo não tem sido objeto de estudos nas condições brasileiras.

Informações sobre efeitos dos patógenos no desempenho de sementes de cultivares de *B. brizantha* bem como os mecanismos e taxa de transmissão destes agentes a partir das sementes ainda não têm sido investigados com a devida atenção e profundidade que estes aspectos requerem.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados de *Bipolaris* sp. e perfil das sementes de *Brachiaria brizantha*

A seleção de dois isolados de *Bipolaris* para este estudo foi realizada analisando-se amostras de sementes de *Brachiaria* procedentes de diferentes regiões produtoras desta forrageira no Brasil (Tabela 1). O alvo nestas análises foi à detecção de isolados com características de espécies do gênero *Bipolaris*. Com base em indicadores morfológicos, foram obtidos inicialmente 30 isolados em culturas puras com característica do referido gênero. Após a obtenção das culturas puras dos isolados fúngicos das amostras de sementes, procedeu-se a seleção de dois isolados, tendo como base as características típicas de *Bipolaris* e a procedência geográfica de origem dos mesmos. Neste sentido foi escolhido um isolado oriundo da região de Campo Grande, Mato Grosso e outro da região de Guaíra, São Paulo. Os dois isolados foram registrados como, LAPS808 e LAPS809, na coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA, posteriormente a esse registro foram realizadas as etapas seguintes deste estudo.

A confirmação da identidade dos dois isolados da espécie estabelecida foi feita por meio de PCR convencional conforme o protocolo já existente para estes casos, seguidos de sequenciamento dos produtos da PCRs. Os procedimentos e resultados encontram se descritos em Anexos desta dissertação.

Tabela 1 – Espécies de *Brachiaria brizantha*, cultivar e origem das amostras.

Espécie	Cultivar	Origem	Nº Amostras	Safra
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	São Sebastião do Paraíso/MG	1	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	São Sebastião do Paraíso /MG	2	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	São Sebastião do Paraíso /MG	3	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	São Sebastião do Paraíso /MG	4	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	São Sebastião do Paraíso/MG	5	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Campo Grande/MS	6	2010
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Patos de Minas/MG	7	-
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Guaíra/SP	8	-
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Guaíra /SP	9	-

<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Guaíra/SP	10	-
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Unaí/MG	11	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Ribeirão Preto /SP	12	2017
<i>Brachiaria brizantha</i>	Marandu	Luiz Ed. Magalhães/ BA	13	2018

O perfil fisiológico e sanitário das sementes de cada amostra utilizada neste estudo foi determinado por meio de testes de germinação e sanidade descritos nas Regras de Análise de Sementes e no Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009a; 2009b).

O teste de patogenicidade foi realizado utilizando os dois isolados de *Bipolaris* obtidos das sementes de *Brachiaria*. A avaliação foi produzida nas plantas *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, com intuito de verificar a capacidade do fungo em causar doenças nas plantas de forrageira em estudo.

As sementes foram distribuídas em copinhos com capacidade 80 mL contendo uma mistura de areia e substrato comercial autoclavados na proporção 1:1. Após 28 dias à semeadura das sementes, uma suspensão de conídios de *Bipolares* sp. na concentração 1×10^6 conídios mL⁻¹, ajustado na Câmara de Neubauer, foi pulverizada nas folhas das plantas por meio de um borrifador manual, já as plantas saudas, ou seja, a testemunha foi pulverizada com água destilada autoclavada. Para manter a umidade as plantas foram cobertas com plástico em bandejas contendo vários copos com água algodão. As plantas inoculadas e as plantas saudas permaneceram em câmara de cultivo vegetal sem luz e com temperatura de 25 ± 2 °C por 36 horas. Passado um período 10 dias todas as plantas foram avaliadas quanto à patogenicidade do fungo em estudo.

Para a condução dos ensaios de inoculação visando aos estudos de interação entre os fungos e as sementes de *Brachiaria* foi utilizado um lote *B. brizantha* cv. Marandu proveniente de Unaí - MG da safra de 2017. As sementes apresentam germinação de 60% e a elas estavam associados os fungos *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. em níveis 1%, 2%, 1%, 8% e 17% respectivamente.

3.2 Instalação e condução dos ensaios visando à avaliação de efeitos e transmissão dos isolados de *Bipolaris* em sementes de *B. brizantha*

A partir dos testes realizados preliminarmente foi selecionado amostras de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu que apresentavam menores incidências de fungos fitopatogênicos, para inoculação das sementes com os dois isolados *Bipolaris*.

3.2.1 Obtenção de sementes infectadas pelos isolados fúngicos em estudo

Os isolados de *Bipolaris* foram repicados para placas de Petri de 9 cm contendo meio Malte acrescido de manitol, com potencial osmótico de -1,2 Mpa de acordo com cálculo realizado no software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995), e incubados em BOD por 7 dias, na temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, as sementes, foram depositadas em camada simples, de maneira uniforme, em contato com colônia fúngica, por 0, 36, 72, 108 e 144 horas, sendo estes tempos correspondentes aos diferentes potenciais de inóculo, nomeados P0, P36, P72, P108 e P144, respectivamente. Para avaliar o efeito do restritor hídrico, na ausência do fungo, sementes de ambas as cultivares foram depositadas em placas de Petri contendo somente meio de Malte acrescido de manitol, pelos mesmos períodos de tempo utilizados para a inoculação do fungo.

O ensaio foi conduzido utilizando-se dois isolados de *Bipolaris*, uma cultivar de *B. brizantha* cv. Marandu, 2 temperaturas de cultivo (20 e $27 \pm 2^\circ\text{C}$) e 5 potenciais de inóculo do patógeno.

3.2.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado para cada tratamento e logo após foi realizada a inoculação. Foram utilizadas 50 sementes para cada uma das quatro repetições. As sementes foram distribuídas uniformemente sobre em folhas de papel mata-borrão esterilizado e umedecido com água destilada com 2,5 vezes do seu peso e armazenadas em gerboxes que foram acondicionados em BOD à temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $35 \pm 2^\circ\text{C}$ a noite. A avaliação do teste de germinação foi realizada a partir do sétimo dia conforme as recomendações do manual de Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009a).

3.2.3 Teste de sanidade

O teste de sanidade de sementes foi realizado para detectar e identificar os fungos associados às sementes. As sementes foram distribuídas uniformemente em placas de Petri de

15 cm de diâmetro, sobre três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada a 5% e esterilizadas. Na sequência as placas foram incubadas na câmara à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 24 horas. Para evitar a germinação das sementes, as placas foram mantidas em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de 24 horas e em seguida incubadas novamente com fotoperíodo de 12 horas à temperatura $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, com base Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b).

A identificação das espécies fúngicas, foi avaliada com base nas estruturas morfológicas descritas em literatura específica, principalmente para as espécies do gênero *Bipolaris* (ELLIS, 1971; SIVANESAN, 1987; CHIDAMBARAM et al., 1973).

3.2.4 Teste de condutividade elétrica

Para este teste, foram examinadas 200 sementes, subdivididas em quatro repetições de 50 sementes. Essas amostras foram pesadas e depositadas em recipiente de plástico (capacidade de 200 mL) contendo 75 mL de água deionizada e acondicionadas em BOD por um período de 24 horas a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leituras de condutividade elétrica da solução de cada amostra foram realizadas no condutivímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, sendo este previamente calibrado com uma solução padrão de KCl. Os resultados obtidos foram subtraídos da leitura inicial da água (controle) e divididos pelo peso da amostra. O resultado final foi expresso em $\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999).

3.2.5 Teste de emergência em substrato sólido (composto orgânico e areia)

Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE). Oitenta sementes subdivididas em 4 porções de 20 sementes, foram distribuídas, individualmente, em copos plásticos com capacidade de 80 mL, contendo substrato comercial (Multiplanta tropc) e areia na proporção 1:1 previamente esterilizados. Cada bandeja com 20 copos correspondia uma repetição. O experimento foi conduzido em duas câmaras de cultivo vegetal com as temperaturas ajustadas em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. Foram realizadas contagens diárias da emergência das plantas até a estabilização do estande. As plantas foram cultivadas em até 28 dias após a semeadura (d.a.s.). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

Avaliação do peso de planta fresca. As plantas emergidas aos 28 dias foram retirada de cada repetição e pesadas em balança de precisão de 4 casas decimais.

Avaliação da altura de plantas. Foi medida a parte aérea de 10 plantas por repetição, de cada tratamento, aos 28 dias após sementeira. Os resultados foram expressos em cm.

3.2.6 Índice de dano

Para esta variável, lançou-se mão de uma escala de notas de 0, 1, 2 e 3 onde zero = plantas normais sem sintomas de infecção, 1 = plantas com massa de até 10% menor do que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas, 2= plantas com massa acima de 10% menor do que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas, 3= plantas mortas em pós- emergência e sementes não germinadas. Os valores anotados foram submetidos a fórmula de McKinney (1923) que expressa valores médios percentuais de danos provocados pela doença em avaliação.

3.2.7 Avaliação da transmissão dos isolados de *Bipolaris* por sementes de *B. brizantha*

Para este ensaio, foram utilizadas câmaras de cultivo vegetal ajustadas com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas no escuro. As sementes foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 80 mL contendo substrato comercial e areia na proporção 1:1. A emergência e desenvolvimento das plântulas foram avaliadas diariamente, assim com a presença ou não dos sintomas da doença nas plantas emergidas. As plantas que apresentaram sintomas e sinais do patógeno foram coletadas e incubadas em placa de Petri contendo meio Malte para identificação e confirmação da presença do fungo. Decorridos 28 dias, todas as plantas foram colhidas e desinfestadas em solução de álcool 70% por 30 segundos, depois por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio 1% e em seguida 1 minuto em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as plantas foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm contendo o meio malte e incubadas a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Decorridos 7 dias de incubação, o tecido vegetal das plantas foram avaliadas com auxílio de microscópio estereoscópico, para verificar a possível presença de estruturas características dos patógenos estudados.

3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental para o teste padrão de germinação, sanidade de sementes e condutividade elétrica foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo (2 isolados fúngicos e 5 potenciais de inóculo), com quatro repetição por tratamento.

O delineamento experimental para avaliação do índice de velocidade de emergência (IVE), peso de planta fresca, altura de planta, índice de dano e transmissão foi em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial triplo (2 temperaturas 20 e 27 °C, 2 isolados fúngicos e 5 potenciais de inóculo), com quatro repetição por tratamento. Cada parcela experimental foi composta por 20 copos com uma semente por copo, totalizando 80 sementes por tratamento.

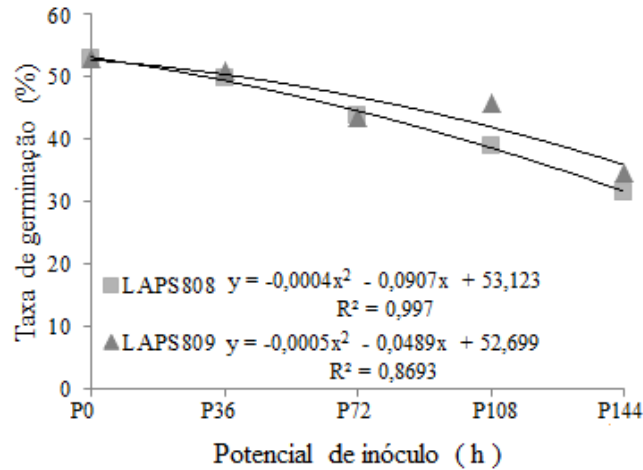
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa R. Os dados foram analisados por meio teste de regressão a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados fornecidos pelos testes laboratoriais percebe-se que foi possível constatar com clareza os efeitos drásticos e variáveis provocados pelos dois isolados de *Bipolaris* utilizados neste trabalho sobre o desempenho fisiológico das sementes inoculadas com estes organismos em diferentes potenciais de inóculo.

Os percentuais de germinação das sementes inoculadas com os dois isolados LAPS808 e LAPS809 foram reduzidos proporcionalmente em razão inversa com o aumento dos potenciais de inóculo (Figura 1). O isolado LAPS808 mostrou-se mais agressivo do que o isolado LAPS809, apresentando uma redução média de 20% do percentual de germinação no potencial de inóculo mais elevado neste estudo. De certa forma estes resultados diferem dos resultados encontrados por Melo (2016), que não verificou reduções na germinação das sementes de *B. brizantha* cv. Marandu na presença de *Bipolaris*. Vale ressaltar que o uso de diferentes metodologias e isolados em ambos trabalhos podem explicar estas discrepâncias de resultados.

Figura 1 – Taxa de germinação de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu inoculadas com isolados de *Bipolaris* - LAPS808 e LAPS809, em diferentes potenciais de inóculo



Em comparação com outros estudos envolvendo diferentes patossistemas fica evidente que os efeitos dos isolados de *Bipolaris* na germinação das sementes da cultivar *B. brizantha* utilizados neste trabalho podem ser considerados relativamente brandos. É importante salientar que inúmeros outros fatores podem interferir nesta relação de patógenos e sementes o que impõe ressalvas a conclusões mais concretas nestes trabalhos. Para um grande numero de casos já estudados envolvendo fungos do gênero *Bipolaris* e similares os efeitos destes agentes na qualidade das sementes são altamente danosos, pois as sementes infectadas por esses fungos podem não germinar ou originar anormalidade em partes dos órgãos vegetais que levam a morte da plântula/planta. Para um grande número de espécies de gramíneas forrageiras a taxa de germinação das sementes é em geral baixa se comparada a outras culturas, conforme os padrões estabelecidos de comercialização (BRASIL, 2008).

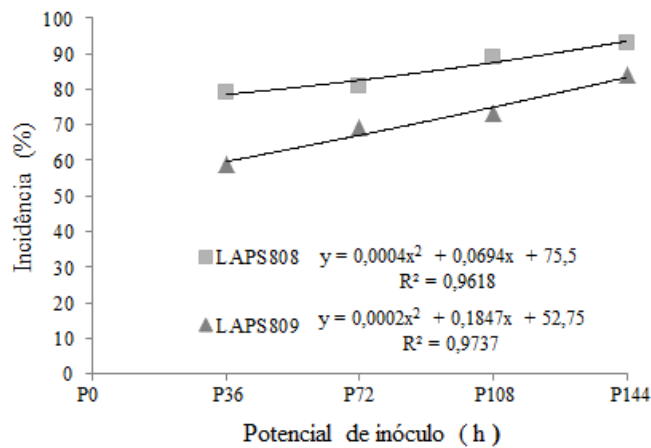
Além dos baixos valores de germinação das sementes inoculadas no presente trabalho, as sementes não inoculadas também apresentaram baixos valores médios de germinação, inferiores a 60% (Figura 1). Isso pode ser atribuído em parte à existência de dormência nesta espécie de forrageiras. Fatores ligados à luz, temperatura, umidade, imaturidade de embriões impermeabilidade a gases, inibidores de germinação podem provocar dormência em condições de cultivo de inúmeras espécies de plantas (CARDOSO, 2009).

Em relação à incidência dos dois isolados fúngicos inoculados artificialmente nas sementes, observou-se que houve um aumento crescente e proporcional com aumento do potencial de inóculo (Figura 2). As sementes inoculadas com o isolado LAPS808 apresentaram maior percentual de incidência do fungo com o aumento do potencial de

inóculo, porém quando o tempo de exposição da semente (potencial de inóculo) foi de 144 horas (P144) não houve diferença significativa entre ambos isolados.

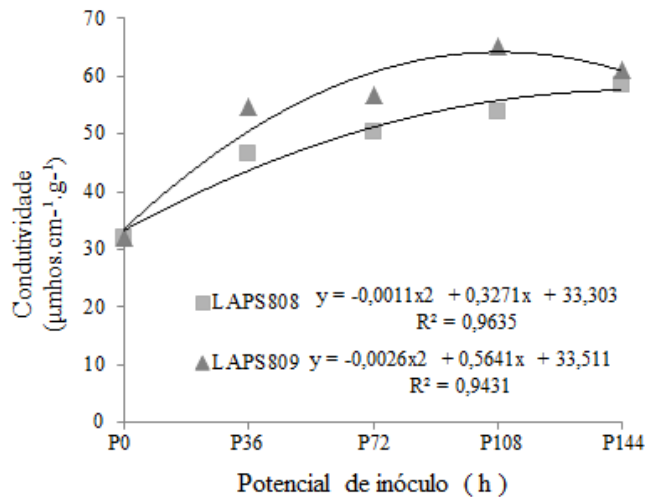
Os percentuais médio da incidência do isolado LAPS808, 79%, 81%, 89% e 93%, para os potenciais de P36, P72, P108 e P144, respectivamente forma superiores aos apresentados pelo isolado LAPS809, 59%, 69%, 73% e 84%, para os mesmos potenciais de inóculo referenciados neste trabalho.

Figura 2 – Incidência de *Bipolaris* – isolados LAPS808 e LAPS809 em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculadas sob quatro potenciais de inóculo (P36, P72, P108 e P144).



Pelo teste de condutividade elétrica (Figura 3), que avalia o nível de vigor das sementes, observou-se que houve aumento dos valores desta variável proporcional ao aumento do potencial de inóculo de patógenos. Estes resultados revelam um efeito significativo e danoso do patógeno no nível de vigor das sementes infectadas. Observa-se que houve um efeito mais pronunciado do isolado LAPS809. Nota-se que no P0h a leitura da condutividade foi à mesma para ambos os isolados (Figura 3). A partir do potencial P36, o valor da condutividade apresentou aumentos gradativos, sendo de 46,5 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ para o isolado LAPS808 e 54,8 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ para o isolado LAPS809. Para os potenciais P72 e P108 os valores de condutividade elétrica foram crescentes para as sementes inoculadas com os 2 fungos, sendo 50,4 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e 56,7 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, respectivamente. No potencial de inóculo mais elevado de P144 os valores de condutividade elétrica foram equivalentes pelos dois isolados em estudo.

Figura 3 – Condutividade elétrica média de soluções provenientes de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu, inoculadas com dois isolados de *Bipolaris* - LAPS808 e LAPS809, em diferentes potenciais de inóculo (P0, P36, P72, P108 e P144).



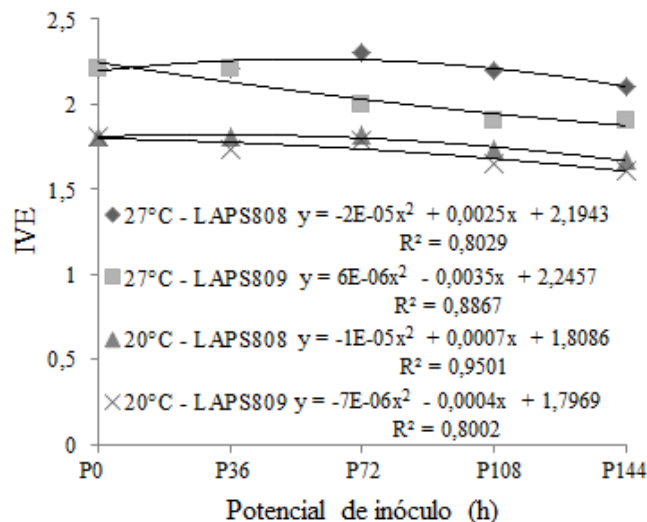
Vale lembrar que os altos valores de condutividade elétrica observados podem estar relacionados com a desestruturação da membrana e conseqüentemente aumento da concentração de exsudados na solução avaliada. (KRZYZANOWKI et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2014).

Em resposta a essas alterações verificadas no teste de condutividade elétrica foi possível comprovar que a qualidade fisiológica das sementes foi afetada em decorrência do decréscimo do percentual de germinação (Figura 1). Em estudos semelhantes realizados com sementes de gramíneas forrageiras observou-se diminuição do potencial fisiológico das sementes com o aumento da condutividade elétrica (MELO et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2013; LOPES; FRANKE, 2010).

O aumento da incidência de fungos observada nas sementes inoculadas com os isolados de *Bipolaris* se correlacionou com os resultados da taxa de germinação e com o de condutividade elétrica. No momento em que se elevou o potencial de inóculo, proporcionou-se maior incidência do fungo nas sementes, resultando no decréscimo do percentual de germinação das sementes e aumento dos valores de condutividade elétrica. Esses resultados corroboram com os realizados por Guimarães et al. (2017) e Siqueira et al. (2014) na inoculação artificial dos isolados de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* nas sementes de milho. Nestes trabalhos os autores observaram decréscimo do potencial germinativo e do vigor das sementes quando se aumentou o tempo de exposição das sementes ao fungo.

O desempenho das plantas originadas das sementes inoculadas, avaliadas pelo índice de velocidade de emergência (IVE), que é um indicador importante de vigor das sementes, mostrou-se diferente apenas em relação às temperaturas utilizadas nas câmaras de cultivo vegetal para avaliação dos testes (Figura 4). Na temperatura de 27 °C o IVE foi maior que na temperatura de 20 °C, tanto para as sementes inoculadas com o isolado LAPS808 quanto para as inoculadas com o LAPS809. Nota-se que não houve proporcionalidade crescente entre os valores de potencial de inóculo estudados neste trabalho.

Figura 4 – Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de *B. brizantha* cv. Marandu provenientes das sementes inoculadas com isolados de *Bipolaris* (LAPS808 e LAPS809), nos diferentes potenciais de inóculo (P36, P72, P108 e P144) e mantidas a 20 °C e 27 °C.



Os baixos valores de IVE observados no presente trabalho podem ter tido influência da dormência das sementes, que é normalmente superada pela utilização de substâncias químicas e tratamentos térmicos (CHIODINI et al., 2013). Porém para o presente estudo estas técnicas de quebra de dormência eram inviáveis, uma vez que poderiam alterar os resultados referentes à associação dos fungos com as sementes.

O índice de velocidade de emergência não diferiu de forma significativa entre os isolados e nem mesmo em relação ao potencial de inóculo nas sementes (Figura 9). No entanto a presença dos fungos nas sementes pode ter comprometido a qualidade fisiológica e o vigor das sementes, pois os valores de IVE foram relativamente baixos. Portanto é recomendável que em trabalhos desta natureza sejam utilizados lotes de sementes de forrageiras com elevada qualidade fisiológica e sanitária. Estes padrões de qualidade se

correlacionam normalmente de forma positiva com o vigor das sementes, conseqüentemente ao índice de velocidade de emergência das plântulas (PESKE et al., 2010).

Em relação ao peso de planta fresca e altura de plantas, a análise de variância obtida por meio de testes estatísticos, não revelou interação tripla significativa entre as variáveis: temperatura, isolado fúngico e potencial de inóculo. Ao analisar os fatores separadamente houve diferença significativa entre as temperaturas. A temperatura de 27 °C proporcionou condições mais favoráveis para o desempenho das plantas, onde os valores de altura (Figura 5) e peso de matéria fresca de planta (Figura 6) foram mais expressivos, em comparação com temperatura de 20 °C.

Figura 5 – Altura de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu provenientes das sementes inoculadas com isolados LAPS808 e LAPS809, com os quatro potenciais de inóculo (P36, P72, P108 e P144), nas temperaturas de 20°C e 27°C.

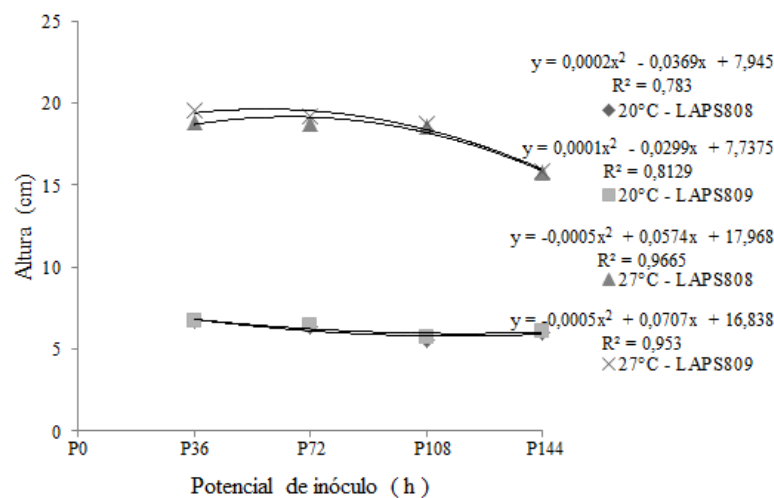
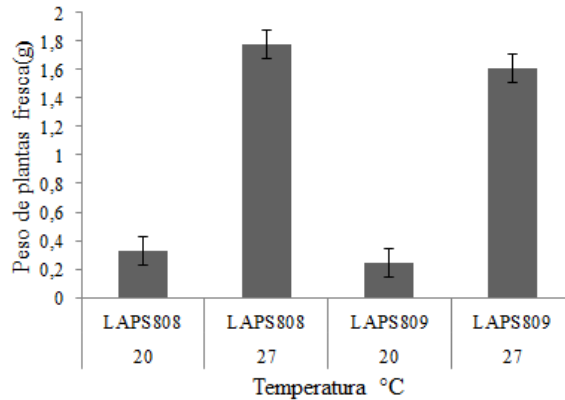


Figura 6 – Peso de planta fresca de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu provenientes das sementes inoculadas com isolados LAPS808 e LAPS809 *B. gossypina* nas temperaturas de 20°C e 27°C.



Entre diversos fatores bióticos e abióticos, sabe-se que luz, temperatura, nutrição, qualidade fisiológica e sanitária dos lotes de sementes exercem importante influencia no desenvolvimento das plantas. No presente estudo a temperatura pode ter afetado o crescimento e produção de massa fresca de planta, pois as temperaturas ajustadas nas duas câmaras de cultivo vegetal não estavam dentro da faixa recomendável para o bom desenvolvimento da *B. brizantha* cv. Marandu segundo Skerman e Riveiros (1992). Além disso, quando a planta sofre algum tipo de estresse, como alterações da temperatura, ela pode desfigurar características fisiológicas, que permitam a sua melhor adaptação às condições disponíveis (PIMENTEL et al., 2016). Segundo Mendonça et al. (2006), as temperaturas que mais favoreceram o desempenho das gramíneas forrageiras em condições de campo situaram-se entre 30 a 35 °C, ao passo que quando as temperaturas variaram entre 12 e 17 °C não houve crescimento das plantas.

No ensaio em que se avaliou o índice de dano causado pelos fungos inoculados nas sementes não verificou-se interação tripla significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura, potencial de inóculo e os isolados de *Bipolaris*. Houve aumento do índice de dano proporcional ao aumento do potencial de inóculo, sendo as maiores taxas de 69,9% e 61,1% observados no P144 para ambos os isolados LAPS809 e LAPS808 respectivamente (Figura 7). De modo geral a temperatura de 27 °C foi a que proporcionou maior taxa de índice de dano para as sementes inoculadas com ambos isolados fúngicos de *Bipolaris* (Figura 8).

As altas taxas de índice de dano registradas neste estudo na fase inicial de desenvolvimento das plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, indicam que a presença deste fungo em associação com sementes desta cultivar é um alto risco para o seu cultivo,

podendo este patógeno reduzir a germinação, produção de massa fresca e seca das forragens nos pastos, além de outros danos como o desencadeamento de alterações bioquímicas nas plantas e na qualidade nutricional das mesmas.

Figura 7 – Índice de dano em plantas de *B.brizantha* cv. Marandu causado pelos isolados de *Bipolaris*, inoculados nas sementes nos diferentes potenciais deste patógeno (P36, P72, P108 e P144).

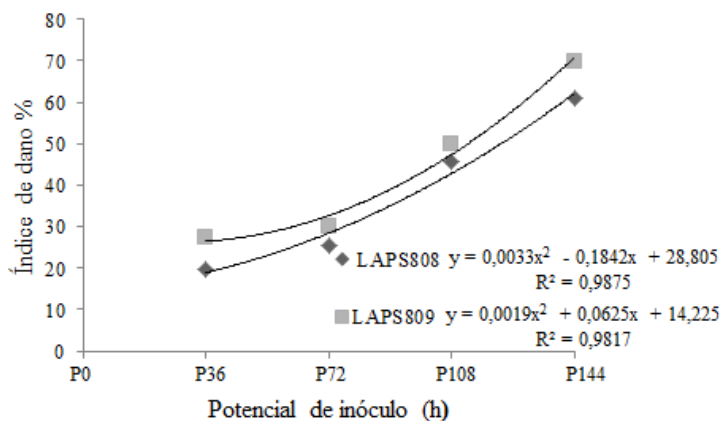
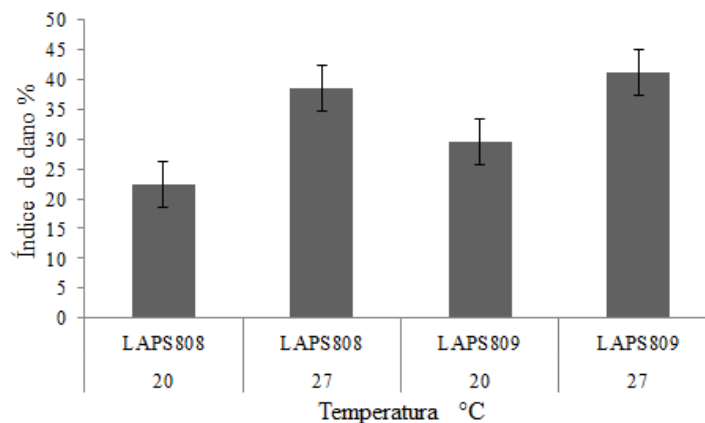


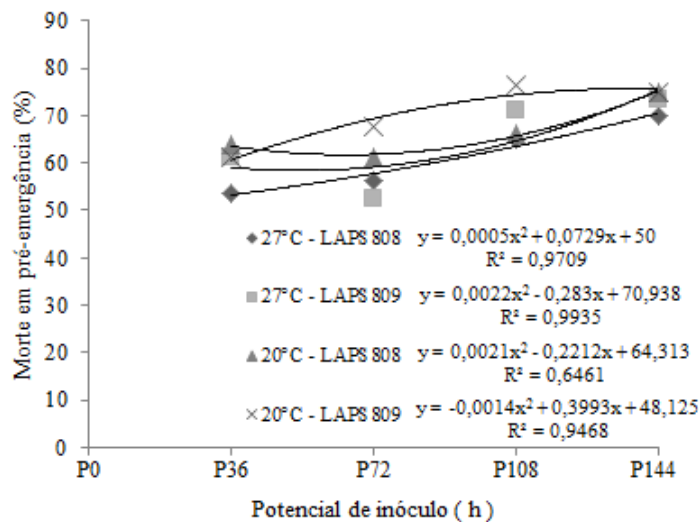
Figura 8 – Índice de dano nas plantas de *B. brizantha* cv. Marandu em diferentes temperaturas de cultivo (20 °C e 27 °C) para os dois isolados fúngicos de *Bipolaris*.



Ao avaliar o número de sementes e plântulas mortas em pré-emergência a partir da análise de variância não observou-se interação tripla significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura, potencial de inóculo e os isolados de *Bipolaris*, porém foi significativo com relação ao potencial de inóculo. À medida em que se elevou o potencial de inóculo houve aumento progressivo no número de sementes/plântulas mortas em pré-emergência (Figura 9). As

maiores taxas de morte em pré-emergência foi observado nos potenciais de inóculo mais elevados (P108 e P144), tanto para semente infectada pelo isolado LAPS808 quanto pelo o isolado LAPS809 sob temperatura de 20 °C. No pontencial de inóculo mais elevado (P144) sob temperatura de 20°C a taxa de morte em pré-emergência foi de 75% para os dois isolados de *Bipolaris*. A menor taxa de sementes/plantulas mortas foi de 53,75%, quando foram infectadas pelo isolado LAPS808 no menor potencial de inóculo (P36) e na temperatura de 27°C.

Figura 9 – Percentual de morte de sementes/plantulas de *B. brizantha* cv. Marandu em pré-emergência causada pelos dois isolados de *Bipolaris* em diferentes potenciais de inóculo (P36, P72, P108, P144) e duas temperaturas de cultivo (20 °C e 27 °C).



A partir do momento em que o fungo coloniza a semente sob diferentes tempos de incubação, ele pode comprometer a integridade das sementes e da futura plantula/planta, através de infecções internas ao tecido do hospedeiro. De modo geral a baixa qualidade fitossanitária e fisiológica das sementes de gramíneas forrageiras, afeta a germinação, o vigor das plantas emergidas assim como a produtividade da cultura (FERNANDES et al., 2005; VECHIATO; APARECIDO, 2008). Variações de suscetibilidade de gramíneas aos fungos do gênero *Bipolaris* sp., podem variar em função do genótipo (BRAZ et al., 2013).

A transmissão dos isolados de *Bipolaris* neste estudo foi observada em plântulas e plantas sintomáticas e assintomáticas por meio de isolamento do fungo realizado pelo plaqueamento e incubação de plântulas/plantas oriundas do teste de emergência. No entanto, de acordo com os resultados observados, e a análise de variância realizada para taxa de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas, não houve interação tripla significativa

($p \leq 0,05$) para os três fatores estudados, temperatura, potencial de inóculo dos isolados de *Bipolaris*.

Os sintomas causados pelos isolados de *Bipolaris* foram pouco visíveis na parte aérea das plantas pelo teste de emergência. No entanto pela análise microscópica, observou-se estruturas fúngicas do fungo, aderidas principalmente às folhas das plantas. Trabalhos semelhantes a esse revelam que os fungos do gênero *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp. são capazes de ser transmitidos da semente para plantas dos gêneros *Brachiaria*, *Crotalaria* e *Panicum* (SANTOS et al., 2014).

A taxa de transmissão de *Bipolaris* a partir de sementes inoculadas às plantas assintomáticas foi crescente proporcionalmente ao aumento do potencial de inóculo (isolado LAPS808) nas sementes. A maior taxa de transmissão de sementes para plantas assintomáticas foi 7,9% na temperatura de 20°C (Figura 10 A) no maior potencial de inóculo, P144.

A taxa de transmissão total observada no presente estudo, que é o somatório das taxas de transmissão em plantas sintomáticas, assintomáticas e morte em pré-emergência de sementes/plântulas não mostrou interação tripla significativa ($p \leq 0,05$). De maneira geral a taxa de transmissão dos dois isolados de *Bipolaris* total foi observada, tanto em ambiente com temperatura de 20°C quanto a 27°C, sendo as maiores taxas registradas na temperatura de 20°C (Figura 10 B).

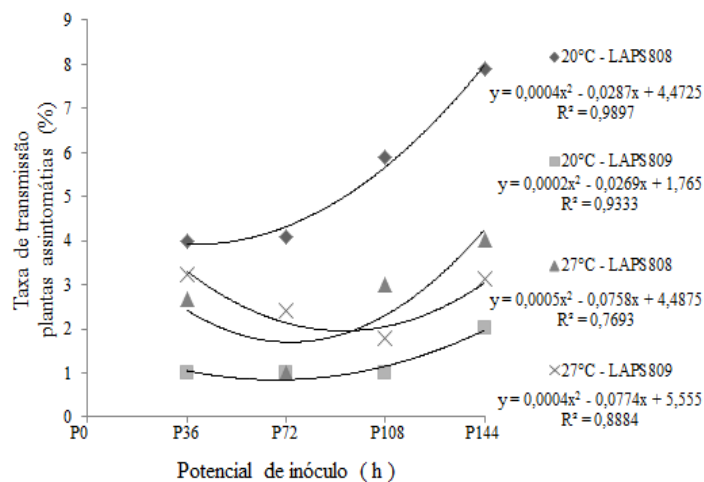
A maior taxa de transmissão de *Bipolaris*, observada neste estudo, cerca de 84,8%, foi proporcionada pelo isolado LAPS808 no maior potencial de inóculo, P144, superior a transmissão proporcionada pelo isolado LAPS809.

Entende-se que sob temperaturas mais baixas, em torno de 20°C, as plantas apresentaram desenvolvimento mais lento, ficando, por conseguinte, mais expostas ao fungo e assim sujeitas a um aumento do processo infeccioso pelo patógeno. Barba et al. (2002) trabalhando com sementes de cevada, verificaram que em condições aclimatadas a faixa ideal de temperaturas na qual observou-se as maiores taxas de transmissão do fungo *Bipolaris sorokiniana* variaram entre 18 e 25°C.

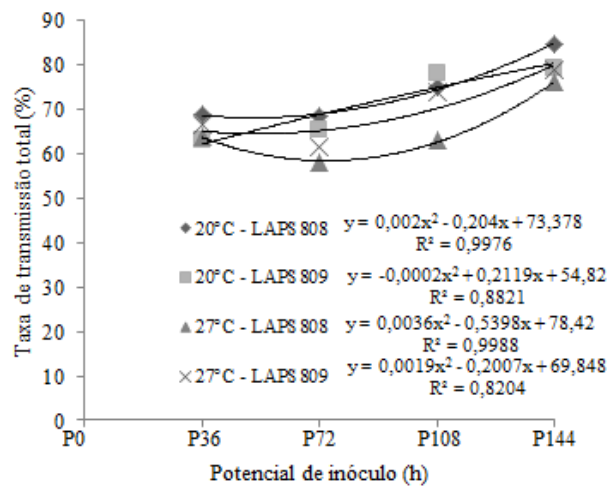
É importante ressaltar que inúmeros outros fatores como, ambiente, temperatura, umidade, resistência genética da planta e a utilização de lotes de sementes contaminados, podem afetar a dinâmica de transmissão de patógenos de sementes a plantas emergidas (MACHADO, 1994). Para a maioria das espécies de forrageiras, a interação de patógenos com sementes é ainda um tema pouco investigado, o que constitui desafio para a formulação

de esquemas de controle de doenças neste grupo de plantas. Estudos mais aprofundados sobre a interação de *B. gossypina* e seu hospedeiro *Brachiaria brizantha* cv. Marandu tornam se portanto necessários nas condições brasileiras.

Figura 10 – Taxa transmissão em plantas assintomáticas (A) dos isolados nos respectivos potencial de inóculo (P36, P72, P108 e P144), nas temperaturas de 20°C e 27°C e taxa de transmissão total (B) dos dois isolados de *B.gossypina* (LAPS808 e LAPS809).



A



B

As avaliações paralelas realizadas para a checagem da identidade dos dois isolados de *Bipolaris* selecionados e utilizados neste trabalho, tendo como base o uso de marcadores morfológicos e moleculares (técnica de PCR, disponibilizada em literatura e referenciada no Apendice desta Dissertação), revelaram que os dois isolados fungicos se enquadram nas descrições apresentadas para a espécie *Bipolaris gossypina*. Neste caso trata-se do primeiro

registro de ocorrência desta espécie em associação com sementes de *Brachiaria* no Brasil. No entanto, para conclusões mais seguras sobre esta constatação é recomendável que novos estudos sejam conduzidos com mais profundidade lançando se mão, por exemplo, de um maior número de isolados do fungo que se enquadram inicialmente na espécie em questão.

5 CONCLUSÕES

A presença de dois isolados de *Bipolaris* em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em diferentes níveis de potencial de inóculo, representando uma população mais frequente nas amostras de sementes analisadas, revelou-se como um fator de redução da taxa de germinação e de vigor das sementes desta forrageira em condições de cultivo controlado. Os efeitos são crescentes e proporcionais ao aumento dos potenciais de inóculo do patógeno nas sementes.

Em condições semelhantes de cultivo, houve comportamento diferenciado dos dois isolados de *Bipolaris* utilizados neste estudo.

Ambos isolados de *Bipolaris*, são transmitidos pelas sementes de *Brachiria brizantha* cv. Marandu, em níveis variados, em ambas temperaturas de cultivo, 20°C e 27°C e em todos níveis de potencial de inóculo inicial dos fungos inoculados nas sementes. A taxa de transmissão do patógeno foi registrada tanto em plantas sintomáticas como em plantas assintomáticas, sendo os maiores valores desta taxa registrados no potencial de inóculo mais elevado.

A constatação da identidade dos dois isolados de *Bipolaris* em sementes de *Brachiaria brizantha* como pertencentes à espécie *B. gossypina* neste estudo constitui o primeiro registro de ocorrência desta espécie em sementes *Brachiaria* no Brasil. Neste sentido estudos adicionais são recomendados para uma checagem final mais concreta.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. R.; AGUIAR, D.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. Antagonismo a fungos associados às sementes de *Paspalum notatum* flügge por *Trichoderma*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17; p. 2013.
- ALCORN, J. L. The taxonomy of “*Helminthosporium*” **Annual Review of Phytopathology** 26: 37-56, 1988.
- BARBA, J. T.; REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. Efeito da temperatura e de fungicida na transmissão de *Bipolaris sorokiniana* da semente para plântulas de cevada. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.5, p.500-507, 2002.
- BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus phylogenetics* and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, p. 964-977, 1999.
- BLAKEMORE, E. J. A.; REEVES, J. C. Perspectives of the use of modern techniques in seed health testing. p. 19-22. In: Machado, J.C.; Langerak, C.J.; Jaccoud Filho, D.S. Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis. **ISTA**, Bassersdorf, Switzerland 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 30, de 21 de maio de 2008. Estabelece normas e padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical, com validade em todo o Território Nacional. Brasília, **Instrução Normativa**, maio de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 399p. 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 200p. 2009b.
- BRAZ, T. G. S.; FONSECA, D. M.; JANK, L.; RESENDE, M. D. V.; MARTUSCELLO, J. A.; SIMEÃO, R. M. Genetic parameters of agronomic characters in *Panicum maximum* hybrids. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 4, p. 231-237, 2013.
- CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 619-631, 2009.
- CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD P. Identification of seed-borne *Drechslera* species. **Friesia**. v. 10, p. 165-207. 1973.
- CHIODINI, B. M.; DA CRUZ-SILVA, C. T. A. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú (Hochst. ex A. Rich.) Stapf (Poaceae). **Varia Scientia Agrárias**, v. 3, n. 2, p. 105-113, 2013.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute (CAB). p. 608, 1971.

FERNANDES, C. D.; JERBA, V. F.; VERZIGNASSI, J. R. Doenças das plantas forrageiras tropicais. In: **Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, 8., João Pessoa. Anais. Londrina: ABRATES, p.51-54. 03. 2004.

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

FERREIRA, S. **Cenário do mercado de sementes de forrageiras no Brasil: da produção ao comércio**. ABRASEM, Anuário, p. 24-29. 2016.

FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**, Viçosa: Editora da UFV, p. 537, 2010.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. A importância do uso de sementes de soja de alta qualidade. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 20, n. 1-2, p. 37-38, 2010.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GUIMARÃES, M. R. F. et al. Avaliação do potencial de inóculo de patógenos em sementes: sua relação com a qualidade fisiológica e quantificação do DNA fúngico por qPCR. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 3, 2017.

KRZYZANOWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, p. 218, 1999.

IBGE. **Monitoramento da cobertura e uso da terra do Brasil**. Rio de Janeiro, 2018. p. 29 Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101625.pdf>>. Acesso em 15 abril. 2019.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 4, n. 1, p. 1-180, 1976.

JANK, L. B., SANZIO C. VALLE, C. B. do; SIMEÃO, R. M.; ALVES, G, F. **The value of improved pastures to Brazilian beef production**. Crop and Pasture Science, Victoria, v. 65, n. 11, p. 1132-1137, 2014.

LOPES, R. R.; FRANKE, L. B. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1 p. 123-130, 2010.

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

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

- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. v. 2; p. 176-177, 1962.
- MALLMANN, G.; VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D.; SANTOS, J. M. dos; VECHIATO, M. H.; INÁCIO, C. A.; BATISTA, M. V.; QUEIROZ, C. A. Fungos e nematóides associados a sementes de forrageiras tropicais. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 201-203, 2013.
- MANAMGODA, D. S. et al. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. **Fungal diversity**, v. 51, n. 1, p. 3-42, 2011.
- MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.
- MANAMGODA, D.S. et al. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. **Phytotaxa**. v. 2012; n. 3, p. 175 – 198, 2015.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; JERBA, V. F.; TRENTIN, R. A.; BUENO, M. L.; GUIMARÃES, L. R. A. ; FABRIS, L. R. Sementes de forrageiras tropicais: patógenos associados e estratégias de controle. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9., 2006, Passo Fundo. [Anais...]. Passo Fundo: UPF, 2006.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; BUENO, M. L.; BATISTA, M. V.; FABRIS, L. R. Microflora fúngica de sementes comerciais de *Panicum maximum* e *Stylosanthes* spp. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 575-584, Jul/Set. 2010.
- MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in mycology**, v. 86, p. 99-216, 2017.
- MARIN-FELIX, Y. et al. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. **Mycosphere**. v. 8, n. 9, p. 1556–1574, 2017.
- MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Semina: Ciências agrárias**, v. 31, p. 863-870, 2010.
- MELO, P. A. F. R. **Testes de vigor e sanidade de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú e Xaraés**. 2016. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. p. 70, Jaboticabal, 2016.
- MENDONÇA, F. C.; RASSINI, J. B. Temperatura-base inferior e estacionalidade de produção de gramíneas forrageiras tropicais. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2006.
- MENTEN, J. O. M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo SP. **CibaAgro**. 1995.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n. 1, p. 131- 136, 1995.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2. ed. London: Macmillan, 1979.

- NERY, M.C.; NERY, F.C.; SILVA, D.R.G.; SOARES, F.P. Produção de sementes forrageiras. **Boletim Técnico**, Lavras n. 88, 47 p., 2012
- NOGUEIRA, J. L. et al. Teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de sementes de aveia preta. **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 896-901, 2013.
- PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A.; SCHUCH, L. O. B. Benefícios e obtenção de sementes de alta qualidade. **Seed News**, Pelotas, v. 14, n. 5, p. 1-3, 2010.
- PIMENTEL, R. M.; BAYÃO, G. F. G.; LELIS, D. L.; CARDOSO, A. J. S.; SALDARRIAGA, F. V.; MELO, C. C. V.; SOUZA, F. B. M. V. Ecofisiologia de plantas forrageiras. **PUBVET**, v. 10, n. 9, p. 666-679, set. 2016.
- PRATES, L. G.; FERNANDES, J. M. C. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 185-191, 2001.
- SANTOS, G. R. et al. Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 54-62, 2014.
- SBALCHEIRO, C. C. et al. Qualidade fisiológica, sanitária e transmissão de fungos associados às sementes de *Brachiaria brizantha* cv. BRS Piatã submetidas a tratamentos térmicos e químicos. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, 2015.
- SIQUEIRA, C. S. et al. Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. **Journal of Seed Science**, Lavras, v. 36, n. 1, p. 79-86, nov. 2014.
- SIVANESAN, A. New species of *Bipolaris*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 84, n. 3, p. 403-421, 1985.
- SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **International Mycological Institute**. p. 261, Wallingford, UK. 1987.
- SKERMAN, P. J.; RIVEROS, F. **Gramíneas tropicales**. Colección FAO: Producción y potencial vegetal. No. 23, FAO, Roma, v. 849, 1992.
- TAN, Y. P.; CROUS, P. W.; SHIVAS, R. G. Eight novel *Bipolaris* species identified from John L. Alcorn's collections at the Queensland Plant Pathology Herbarium (BRIP). **Mycological Progress**, v. 15, n. 10-11, p. 1203-1214, 2016.
- TAYLOR, A. G.; KWIATKOWSKI, J.; BIDDLE, A. J. Polymer film coating decrease water uptake and water vapour movement into seeds and reduce imbibitional chilling injury. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM SEED TREATMENT CHALLENGES AND OPPORTUNITIES**, Proceedings... [S.l.: s.n.], 2001. p. 215-220. 2001
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR. SMEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- VECHIATO, M.H.; APARECIDO, C.C. **Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção**. São Paulo: Instituto Biológico de São Paulo,

Comunicado Técnico, v. 89, 2008. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br>>. Acesso em 15 de abril de 2019.

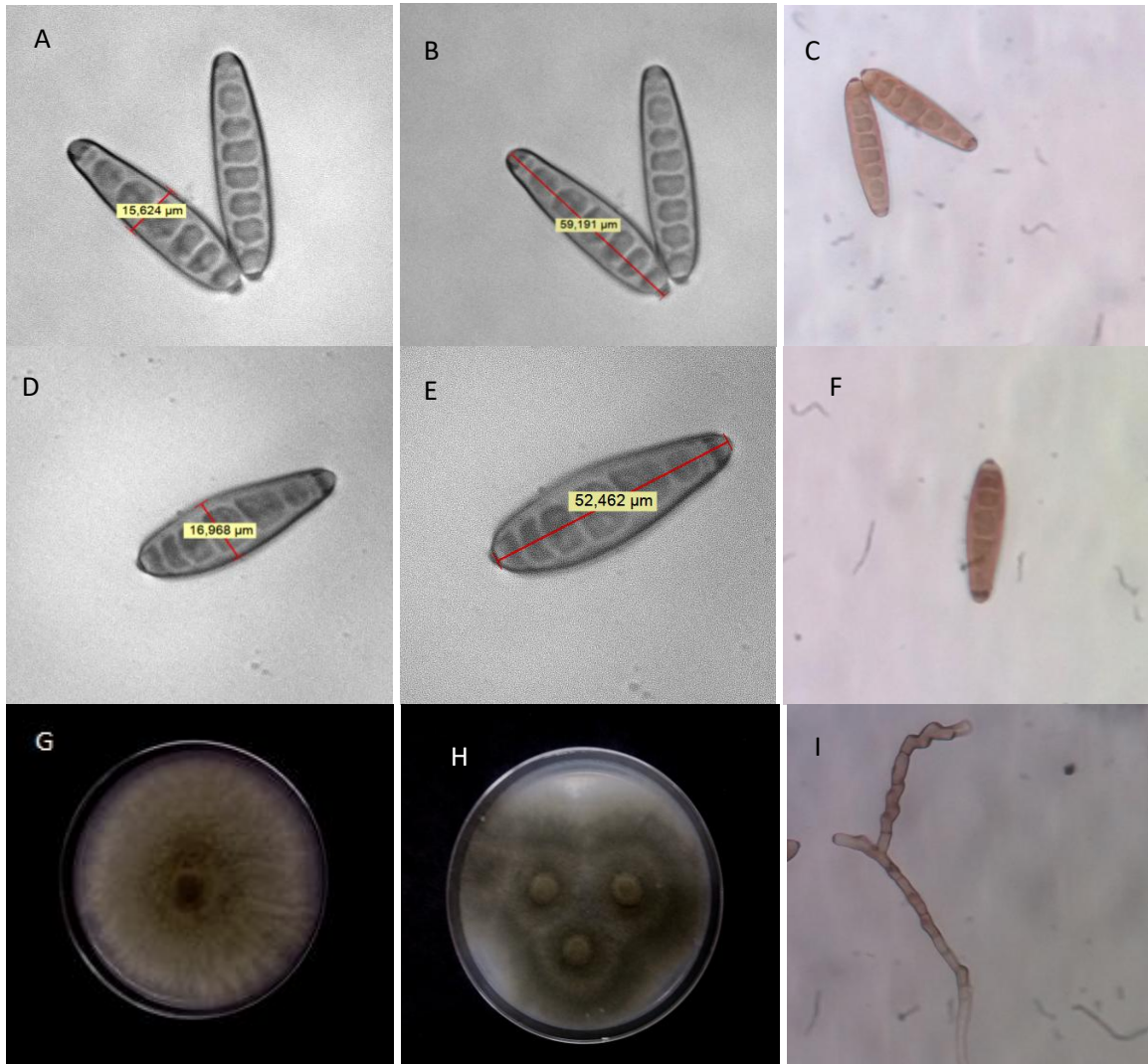
VERZIGNASSI, J. R. et al. *Pyricularia grisea*: novo patógeno em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Pará. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 254-254, 2012.

VECHIATO, M.H. Sanidade de gramíneas forrageiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: UFPB, p. 55-57, 2004.

ANEXO A – Caracterização morfológica dos isolados de *Bipolaris* utilizados neste trabalho

Os dois isolados de amostras de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu foram selecionados e submetidos à caracterização morfológica em cultura pura e teste de patogenicidade visando à determinação da espécie de *Bipolaris*. Para cada isolado foram feitas culturas monospóricas em placas de Petri de 9 cm contendo meio de SNA. Com base em descrição de literatura foram avaliadas estruturas macromorfológicas e micromorfológicas. As colônias dos fungos foram avaliadas com foco em forma, coloração e crescimento micelial. Em relação os conídios foram considerados: tamanho, forma, coloração e septação dos isolados. Parte dos resultados está ilustrado na Figura 1 deste Anexo.

Figura 1 (Anexo A) – Conídios do isolado LAPS808 (A, B e C); conídios dos isolados LAPS809 (D, E e F); colônia do isolado LAPS808 (G); colônia dos isolado LAPS809 (H) e conidióforo dos isolados fúngicos (I).



ANEXO B – Caracterização molecular e confirmação genética da identidade dos isolados de *Bipolaris* utilizados neste estudo

A caracterização morfológica dos dois isolados LAPS808 e LAPS809 de regiões distintas do Brasil foram, portanto complementadas pelas avaliações moleculares.

Para técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram utilizados os *primers* GPDH1 e GPDH2 (Berbee et al., 1999) e ITS1 e ITS4 (Glass e Donaldson, 1995). O protocolo da amplificação foi realizado de acordo com Berbee et al. (1999) e Glass e Donaldson (1995). Para elaboração das árvores filogenéticas, utilizou-se o método de *Máxima Parcimônia*, por meio do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As sequências das espécies tipos são correspondentes aos genes ITS1, ITS4, GPDH1 e GPDH2 estão na tabela abaixo.

Tabela 1 – Espécies Tipo de *Bipolaris* (ITS e GPDH) e Outgroup (*Alternaria alternata*)

Código de Acesso			
Espécie Tipo	ITS	GPDH	Artigo
<i>B. bicolor</i>	KJ909762	KM042893	Manamgoda 2014
	MF490804	MF490826	Marin Felix 2017
<i>B. brachiariae</i>	MF490806	MF490828	Marin Felix 2017
	MF490807	MF490829	
<i>B. crotonis</i>	KJ415526	KJ415420	Tan et al. 2014
<i>B. curvispora</i>	MH864372.1		
<i>B. drechsleri</i>	KF500530		Crous et al. 2013
		KF500533	Manamgoda 2014
<i>B. gossypina</i>	KJ415528	KJ415418	Tan et al. 2014
<i>B. maydis</i>	KM034846	KM093794	Berbee 1999
	AF071325	KM034846	Manamgoda 2014
<i>B. microlaenae</i>	JN601032	JN600974	Manamgoda 2011
<i>B. microstigii</i>	JX089579	JX089575	Crous 2012
	KM230391	KM034819	Manamgoda 2014
<i>B. mediocris</i>			
<i>B. saccharicola</i>	KY905674	KY905686	Marian Felix
	KY905675	KY905687	2017
<i>B. secalis</i>	KJ415537	KJ415409	Tan et al. 2014
<i>B. setariae</i>	EF452444	EF513206	Adrie et al. 2008
<i>B. sorghicola</i>	MH145416.1	LT715777.1	
<i>B. sorokiniana</i>	KJ922381	KM034822	Mnamgoda 2014
	KJ909771	KM034827	
<i>B. subramanianii</i>	KX452457	KX452423	Tan et al. 2016
<i>B. urochloae</i>	KJ922389	KM230396	Manamgoda 2014
<i>B. variabilis</i>	KY905676	KY905688	Marian Felix
	KY905677	KY905689	2017
<i>B. victoriae</i>	KJ909778	KM034811	Manamgoda 2014
<i>B. woodei</i>	KX452458	KX452424	Tan et al. 2016
			Manamgoda 2014
<i>B. yamadae</i>	KJ909779	KM034830	Marian Felix
	KY905673	KY905685	
<i>B. zaeae</i>	KJ415538	KJ415408	Tan et al. 2014
	KJ909786	KM034816	Manamgoda 2014
<i>B. zeicola</i>	KM230398	KM034815	Manamgoda 2014
	KM230397	KM034814	

Figura 2 (Anexo B) – Árvore Filogenética gerada pela análise de Máxima Parcimônia obtida a partir das seqüências parciais do gene GPDH com valores de 95 bootstrap, para ambos isolados (LAPS808 e LAPS809).

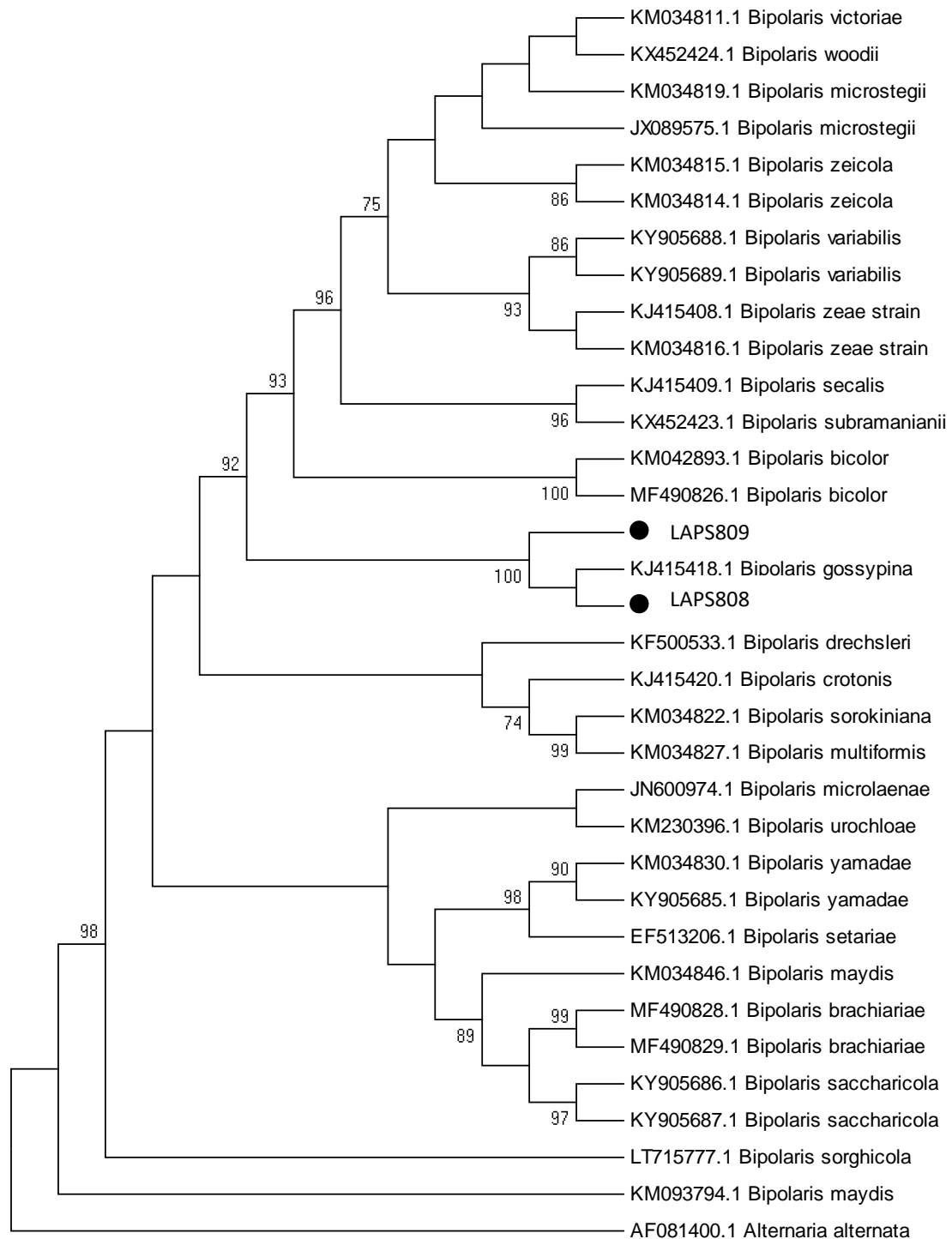
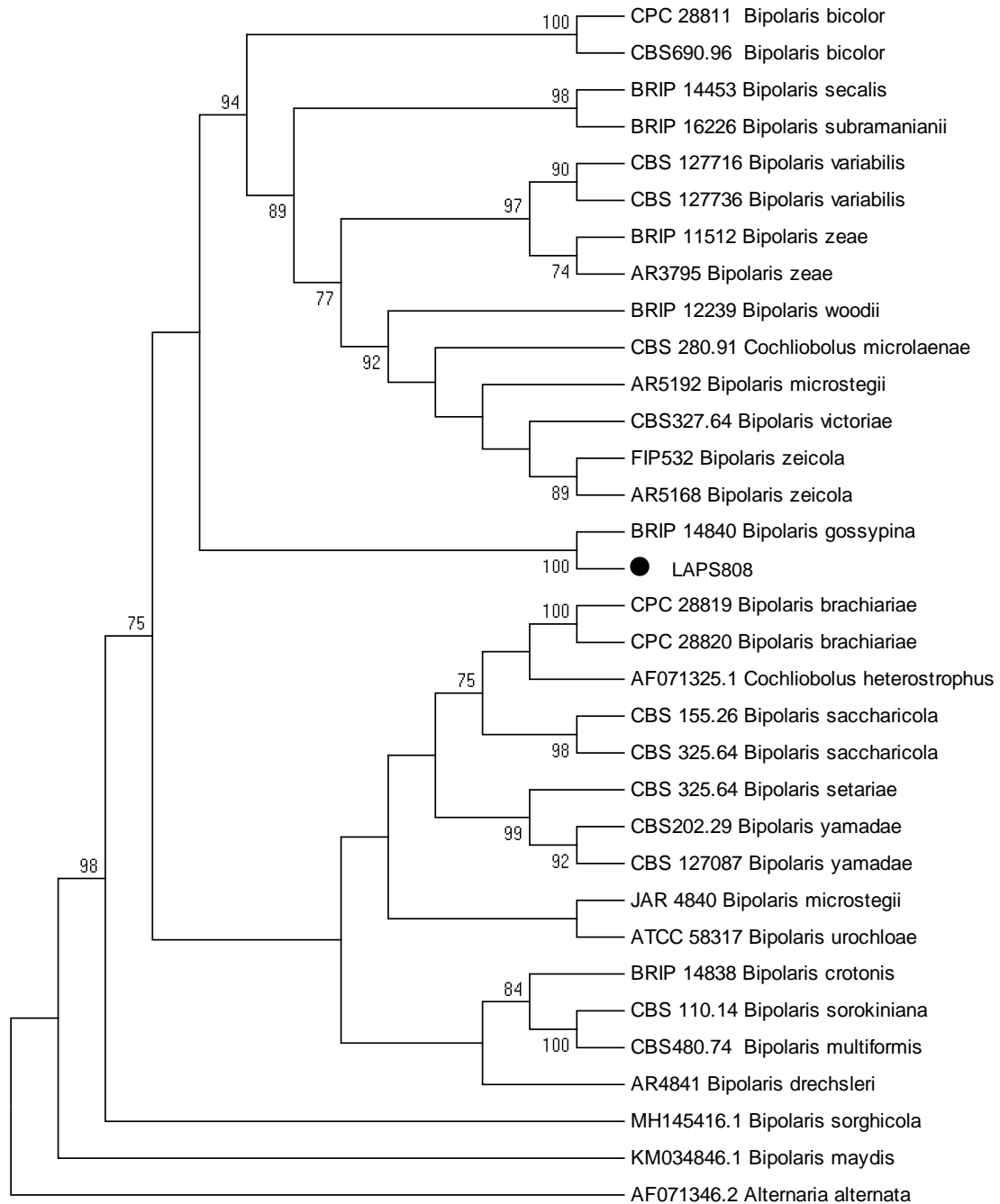


Figura 3 (Anexo B) – Árvore Filogenética gerada pela análise de Máxima Parcimônia a partir de sequências combinadas dos genes ITS e GPDH dos isolados referências das espécies de *Bipolaris*.



ANEXO C – Teste de patogenicidade

Figura 4 (Anexo C) – Sintomas nas plantas de *B. brizantha* cv. Marandu e *P. maximum* cv. Mombaça obtidos a partir da inoculação dos fungos. Folhas de *B. brizantha* (A e B) inoculadas com isolado LAPS808 e LAPS809 respectivamente; folhas de *P. maximum* (C e D) inoculadas com os isolados LAPS808 e LAPS809, respectivamente.

